

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

Probiotica bij pluimvee

Door

Mireille CAPPENDIJK

Promotoren: Dr. Venessa Eeckhaut

Prof. Dr. Filip Van Immerseel

Literatuurstudie in het kader van de Masterproef

©2015 Mireille Cappendijk

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

UNIVERSITEIT GENT

FACULTEIT DIERGENEESKUNDE

Academiejaar 2014-2015

Probiotica bij pluimvee

Door

Mireille CAPPENDIJK

Promotoren: Dr. Venessa Eeckhaut

Prof. Dr. Filip Van Immerseel

Literatuurstudie in het kader van de Masterproef

©2015 Mireille Cappendijk

Voorwoord

Mijn dank gaat in de eerste plaats uit naar mijn eerste promotor; dr. Eeckhaut. Door haar kritische, doch aanmoedigende houding heeft zij het beste in mij naar boven gehaald en heb ik deze literatuurstudie als zeer educatief en uitdagend ervaren. Ook ben ik mijn tweede promotor, professor Van Immerseel, dankbaar. Zonder deze personen was mijn literatuurstudie niet mogelijk geweest.

Een kleine link met de praktijk heb ik kunnen leggen door mijn stage bij Degudap, een pluimvee-praktijk te Izegem. Door deze ervaring ben ik enthousiast geworden voor de pluimveesector en heb ik de praktijkvoorbeelden van probiotica mogen aanschouwen. Ik ben hen dankbaar voor deze leerrijke en leuke ervaring.

Voorwoord

Inhoudsopgave

1. Samenvatting	p. 1
2. Inleiding	p. 2
3. Literatuuroverzicht	p. 3
3.1. <i>Lactobacillus spp.</i>	p. 5
3.2. <i>Enterococcus spp.</i>	p. 6
3.3. <i>Bacillus spp.</i>	p. 7
3.4. <i>Pediococcus spp.</i>	p. 9
3.5. <i>Bifidobacterium spp.</i>	p. 9
4. Bespreking	p. 10
5. Literatuurlijst	p. 12

1. Samenvatting

Probiotica zijn levende micro-organismen die, gebruikt in de juiste dosis, een positieve invloed hebben op de gezondheid van de gastheer.³

Probiotica worden steeds meer gebruikt in de huidige pluimveehouderij als alternatief voor antibiotica. Verschillende bacteriën worden als probioticum ingezet; *Lactobacillus spp.*, *Bacillus spp.*, *Enterococcus spp.*, *Pediococcus spp.* en *Bifidobacterium spp.* worden het meest gebruikt en oefenen hun effect uit via verschillende mechanismen. De mechanismen zijn het stabiliseren van de endogene microbiota (minder kolonisatie van pathogene kiemen mogelijk), competitieve exclusie (pathogene kiemen inhiberen door hun voedingsstoffen af te nemen), melkzuur-productie (pH-daling), productie van bacteriocines (afdoden van andere bacteriën) en de modulatie van de immuniteit van de gastheer (meer en actievere immuun-cellen in de periferie).

Lactobacilli gebruiken competitieve exclusie, immuno-stimulatie en de vorming van bacteriocines, waterstof-peroxide en lactaat als mechanismen om pathogenen tegen te werken.^{5,23,24,25} Inoculatie van lactobacilli *in ovo* had geen effect op de inhibitie van *Salmonella* Enteritidis.⁴³

Enterococci produceren bacteriocines³⁶, moduleren de immuun-respons²⁷ van de gastheer en inhiberen reactieve oxidatieve species.²⁸ Ook stimuleren ze de mucine-kwantiteit wat een betere darm-barrière tot gevolg heeft.²⁷ Er werd een reductie van het aantal manke kippen na toediening van *Enterococcus* waargenomen.⁴²

Bacilli werken via competitieve exclusie, de productie van bacteriocines⁴⁰ en de toediening van *Bacillus spp.* heeft aangetoond de groei van lactaat-producerende bacteriën te stimuleren.²⁵

Bifidobacteria produceren lactaat en inhiberen hiermee de kolonisatie van pathogene kiemen in de darmen van pluimvee.⁴⁰ Ook produceren zij een bacteriocine bifidocine A, dat zorgt voor cellyse bij pathogene kiemen.⁷

Er zijn veel *in vivo* studies uitgevoerd om de effecten van de verschillende probiotica na te gaan. Echter dient men rekening te houden met de bedrijfs-gebonden factoren zoals de omgevingsgebonden infectiedruk van *Eimeria*, *Clostridium spp.* en *Salmonella spp.* Ook de reiniging- en desinfectie techniek, hygiëne-maatregelen, eventuele leegstand en het wel of niet hebben van een all-in all-out protocol hebben hier invloed op.

2. Inleiding

Probiotica worden steeds vaker gebruikt in de pluimveehouderij. De belangrijkste reden daarvoor is de stijgende druk op pluimveehouders om alternatieven voor antibiotica te gebruiken. Er zijn verschillende alternatieven op de markt waaronder probiotica. In deze literatuurstudie worden de meest gebruikte probiotica besproken. Van de betreffende kiemen wordt het werkingsmechanisme en de aangetoonde effectiviteit besproken.

Probiotica stimuleren op verschillende niveaus de gezondheid van hun gastheer:

- sturen van de intestinale microbiota (samenstelling en activiteit). Door complexe interacties tussen de endogene microbiota en het probioticum wordt de samenstelling en activiteit van de endogene microbiota beïnvloed. Deze interacties komen tot stand door middel van expressie van oppervlakte-eiwitten of productie van substanties die het darmepitheel en het onderliggende immuunsysteem beïnvloeden.³

- competitieve exclusie ter hoogte van de darm, dus competitie voor substraten waardoor pathogene kiemen minder mogelijkheden hebben om te groeien waarmee een negatief effect op de gastheer wordt voorkomen. Dit mechanisme kent vooral zijn toepassing bij de eendags-kuikens welke nog geen eigen microbiota hebben opgebouwd. Ze zijn daardoor vatbaarder voor verschillende pathogene kiemen. Een artificieel toegediende microbiota kan door competitieve exclusie de kolonisatie van pathogenen inhiberen.³

- verandering van de intestinale omgeving; zoals pH-daling door onder andere melkzuurproductie. Hierdoor kan de omgeving ongeschikt worden voor pathogenen om zich te vermeerderen. Er wordt een remming op de kolonisatie bekomen.^{3,44}

- productie van metabolieten die toxisch zijn voor pathogenen, genaamd bacteriocines. Deze worden geproduceerd door verschillende bacteriën, zowel endogene species als species die in probiotica worden gebruikt. Bacteriocines kennen verschillende werkingsmechanismen. Ze kunnen een elektrostatisch contact maken met hun doelwit-bacterie en poriën en ion-kanalen vormen. Hierdoor wordt de membraan potentiaal, pH en de werking van de proton-pomp verstoord met als gevolg dat de cel een ATP-tekort zal krijgen. Hierdoor kunnen belangrijke processen als DNA/RNA-synthese, proteïne-synthese en de synthese van polysachariden niet doorgaan en zal de cel sterven. Een ander werkingsmechanisme van de bacteriocines omvat de interactie met celmembraan-onderdelen. Via deze interactie wordt het autolytische proces in gang gezet en zal de doelwit-cel via autolyse afsterven. Bacteriocines hebben onder meer een inhiberend effect tegenover *Campylobacter*³⁰, *Eimeria spp.*³⁷ en *Salmonella*.²⁶

- modulatie van de immuunrespons, zowel mucosaal als systemisch, die gepaard kan gaan met een verhoogde immuunrespons, de opregulatie van de cellulaire immuniteit, de stimulatie van de epitheliale barrière in de darm, een verminderde apoptose van darmepitheelcellen, een verbeterde T-cel interactie en –homing en een betere Toll-like receptor signalering.^{3,37}

3. Literatuuroverzicht

Een overzicht van de meest gebruikte preparaten met de belangrijkste informatie van deze producten.

Product	Producent	Toepassing	Aangeraden dosis	Werkzame kiem	Claims
Biacton	Saga Sanatate SRL	Inmenging in het voeder	Minimum 0,5 kg/ton voeder (10^5 kve/kg voeder) ⁷	<i>Lactobacillus farciminis</i> MA67-4R	- Inhibitie van pathogenen (<i>Clostridium perfringens</i> , <i>Campylobacter</i> , <i>Listeria</i> , <i>Salmonella</i> en <i>E. coli</i>) - Productie van melkzuur (tot 27 g/l) ^{10,11}
Biomin C-EX	Biomin	Via het drinkwater ⁹	10^{13} kve/kg water	<i>Enterococcus faecium</i> IMB52	- Verhoogde immuniteit in kritieke productiefase - Verbeterde resistentie tegen infecties - Verbeterde voederconversie - Verminderde mortaliteit.
Calsporin	Calpis	Inmenging in het voeder ¹⁷	10^{10} kve/g voeder ^{18,19}	<i>Bacillus subtilis</i> C-3102	- Stimulatie van gunstige darmmicrobiota en reductie van pathogene bacteriën door consumptie van zuurstof, enzymen en competitieve exclusie - Beter gebruik van nutriënten - Minder verteringsstoornissen - Gezondere dieren en betere prestaties ^{16,18}
Clostat	Kemin	Voer- en drinkwater-toepassing.	2.2×10^7 kve/g 2 vormen : Voer; 500 g/ton, Water; 25 g/1000 l ⁸	<i>Bacillus subtilis</i> PB6	- Ondersteuning van de intestinale microbiota-balans in pluimvee.

Poultry Star	Biomin	Voer- en drinkwater-toepassing.	5 x 10 ⁹ kve/g 20 g/1000 kippen/dag bij drinkwater-toepassing ¹²	Buiten de EU: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Enterococcus</i> • <i>Pediococcus</i> • <i>Lactobacillus</i> • <i>Bifidobacterium</i> Binnen de EU: <ul style="list-style-type: none"> • <i>Bifidobacterium animalis ssp animalis DSM 16284</i> • <i>Lactobacillus salivarius</i> • <i>Lactobacillus reuteri</i> 16351 • <i>Enterococcus faecium</i> DSM 21913 	- Verlaging van de (caecale) infectiedruk met <i>Salmonella</i> Enteritidis. - Betere gewichtstoename en voederconversie. - Gereduceerde mortaliteit. ²⁰
Pro-Flora	Zoetis	Inmenging in het voeder.	10 ⁹ kve/g ¹³ 563-900 g/ton voeder	<i>Bacillus subtilis</i> QST 713	- Ondersteuning van de microbiota-balans.
Probiolac	Mercordi	Toepassing via het drinkwater oa na antibiotica-therapie, voederveranderingen en situaties waarbij de vertering verandert. ¹⁴	10 ⁸ kve/vial Vleeskuikens 1 vial per 10.000 dieren op dag 1, 14 en 28 Leghennen 1 vial per 10.000 dieren, iedere 2 weken	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	- Suppressief effect op pathogene intestinale microbiota - Verbetering van de voederconversie en groei - Stimulatie van de immuniteit ¹⁵

3.1. *Lactobacillus spp.*

In de producten Biacton (*Lactobacillus farciminis*), Poultry Star (*Lactobacillus salivarius/ Lactobacillus reuteri*) en Pro Biolac (*Lactobacillus rhamnosus*) worden verschillende *Lactobacillus* species gebruikt. Een effect wordt bekomen vanaf 10^5 - 10^7 kve/g voeder.²⁵

Lactobacilli werken onder andere via competitieve exclusie. Daarnaast stimuleren zij het voorkomen van gesegmenteerde filamenteuze bacteriën in de caeca. Deze kiemen zijn bij zoogdieren gekend voor het stimuleren van de expressie van genen met een defensieve en immuno-stimulerende functie. De gesegmenteerde filamenteuze bacteriën zijn Gram positieve, anaerobe, spore-vormende bacteriën en normale darmbewoners bij kippen.²⁵ Tevens produceren lactobacilli antagonistische substanties zoals waterstofperoxide, organische zuren (lactaat en acetaat) en bacteriocines die een negatief effect op de groei van pathogenen hebben. Zo zorgt waterstofperoxide voor de afdoding van pathogene kiemen en zorgen lactaat en acetaat voor een zuur milieu waarin pathogene kiemen zich niet kunnen vermeerderen.^{5,23,41} Op gebied van bacteriocines is bekend dat *L. salivarius* ABP-118 produceert en *L. johnsonii* lactacin F.⁴⁰ Het bacteriocine ABP-118 zorgt voor cellyse via destructie van de celmembraan en lactacin F doodt pathogene kiemen door de inductie van poriën. Hierdoor daalt de intracellulaire kalium concentratie en sterft de cel af.¹ *L. salivarius* produceert ook het bacteriocine L.1077. Deze werd in een *in vitro* en *in vivo* proef onderzocht op zijn antibacteriële werking. Er werd een positief effect gezien op de controle van *Salmonella* Enteritidis en *Campylobacter jejuni*.³⁸

L. salivarius produceert ook het bacteriocine salovaricine SMXD51 wat effectief is gebleken tegen *C. jejuni*.³

In een *in vivo* studie werden eieren op het einde van het broedproces geïnoculeerd met verschillende *Lactobacillus* species (*L. fermentum*, *L. salivarius* en *L. acidophilus*). Twee dagen na het uitkippen kregen ze per os *Salmonella* Enteritidis toegediend. Op deze manier werd het probiotisch effect, met name het effect op invasie en kolonisatie van *S. Enteritidis* bij deze jonge kuikens nagegaan. Op de leeftijd van 5 dagen werden de kuikens geëuthanaseerd en werden de *S. Enteritidis* bacteriën ter hoogte van de darm geteld. Uit deze studie bleek dat *in ovo* inoculatie met *Lactobacillus spp.* geen inhiberend effect heeft tegenover *Salmonella*.⁴³

Voor een *in vitro* studie werden eerst verschillende *Lactobacillus spp.* uit de cloaca en vagina van 40 leghennen geïsoleerd en vervolgens werd hun inhiberend effect op de groei van *S. Enteritidis* geëvalueerd aan de hand van een spot-the-lawn techniek. Bij deze techniek is het mogelijk om antimicrobiële substanties te detecteren.²⁹ Uit alle stalen van de cloaca werden lactobacilli geïsoleerd, terwijl er slechts in 50% van de vaginale mucosa-stalen lactobacilli terug gevonden werden. Uit de cloaca werden *L. acidophilus* (92,5% van de hennen) *L. salivarius* (85%) en *L. fermentum* (slechts bij 1 hen) geïsoleerd. Alle *Lactobacillus spp.* vertoonden een inhiberend effect op de groei van *S. Enteritidis*. Deze resultaten suggereren dat de normale endogene microbiota een protectieve functie heeft tegenover kolonisatie van *S. Enteritidis* en daarmee ook een probiotisch potentieel omvat.³²

Via een andere studie werden gelijkaardige en aanvullende resultaten bekomen. Een groot verschil was echter de dominante aanwezigheid van *Lactobacillus reuteri*, deze kiem wordt gebruikt in Poultry Star. *In vivo* werd de inhibitie van *S. Enteritidis* getest. Hieruit bleek, dat de inhibitie species afhankelijk - en gecorreleerd kan worden met de mate van lactaat productie. Voornamelijk de stammen *L. reuteri* R-17485 en *L. johnsonii* R-17504 toonden een sterke reductie van de kolonisatie van *S. Enteritidis* in de caeca, de lever en de milt. Deze reductie is toe te wijzen aan de lactaat productie en de daarmee gepaard gaande pH-daling.⁴¹

3.2. *Enterococcus spp.*

De producten Biomin C-EX en Poultry Star bevatten onder andere *Enterococcus faecium* (wel 2 verschillende stammen). Van *E. faecium* is bekend dat deze bacteriocines (enterocines L50) produceert en daardoor een probiotisch effect heeft.²⁹ De bacteriocines die door *E. faecium* geproduceerd worden, hebben een activiteit tegen onder andere *Clostridium perfringens*⁴⁰.

Het probiotische potentieel van *Enterococcus spp.* werd onderzocht in een studie waarbij de kippen geïnfecteerd werden met *Salmonella* Enteritidis. *E. faecium* werd toegediend via het voeder gedurende de gehele proef. Door een laparotomie en bloedname direct uit het hart werden verschillende parameters onderzocht. Via het bloedonderzoek werd er gekeken naar het aantal lymfocyten en met flowcytometrie werden de granulocyten en lymfocyten onderzocht. De faeces en de caeca werden onderzocht tijdens de autopsie.

Bij de autopsie in combinatie met een bacteriologisch onderzoek werd er een antibacterieel effect vastgesteld ter hoogte van de dunne darm aangezien de kolonisatiegraad van *Salmonella* significant lager was ten opzichte van de kippen die het probioticum niet hadden gekregen. Via het bloedonderzoek zag men onder andere dat er meer witte bloedcellen waren en voornamelijk meer lymfocyten. In de periferie van de bloedbaan en in de lymfeknopen waren er meer lymfocyten aanwezig bij de kippen die het probioticum hadden gekregen dan bij diegene die dit niet hadden gekregen. Concreet betekent dit dat de immuniteit van de kippen verbeterd is en in staat is om adequater te reageren op pathogene kiemen. Ook de activiteit van de lymfocyten en de macrofagen was groter bij de behandelde kippen. Nog een ander belangrijk effect, was de verhoogde mucine-kwantiteit. Deze speelt een positieve rol in de darm-integriteit en daarmee in het versterken van de darm-barrière.²⁷

In een ander onderzoek werden 2 probiotica tegelijk onderzocht, *Lactobacillus fermentum* CCM 7158 en *Enterococcus faecium* M 74. De dieren werden 42 dagen gehouden en op het einde van de periode geëuthanaseerd en onderworpen aan een bloedonderzoek. *E. faecium* werd aan dosis van 2×10^9 kve/g product via het drinkwater toegediend en *L. fermentum* aan een dosis van 10^9 kve/g product. Bij de groep die enkel *E. faecium* kreeg, was de calcium, bilirubine en de antioxidanten concentratie in het bloed significant hoger. De toename van antioxidanten kan een rol spelen in het verlagen van de oxidatieve stress in het spijsverteringsstelsel. Dit mechanisme werkt positief voor de darmmicrobiota door het neutraliseren van ROS (reactieve oxidatieve species) die een negatief effect hebben op de darmgezondheid. Deze ROS kunnen schade aan de darm veroorzaken door hun destructieve effect op epitheelcellen en nuttige microbiota.²⁸ De concentratie bilirubine(ijzer) correleert met de mate

waarin vrije radicalen gevangen worden en dus geen schade meer kunnen aanbrengen aan de darmen. Door de verhoogde concentratie aan calcium is er een beter metabolisme van mineralen wat resulteert in botten van een betere kwaliteit. Hierdoor kan de kip zijn snelle groei en gewichtstoename met minder problemen doorstaan. De verhoogde opname van dit mineraal kan verklaard worden door de toename van de villi-lengte ter hoogte van het jejunum en duodenum die door *E. faecium* veroorzaakt wordt.³³ De verhoogde concentratie aan bilirubine kan gelinkt worden met de inhibitie van het lipide-peroxidase en de daling van het gehalte zuurstofradicalen waarvan bekend is dat deze een negatieve invloed hebben op de darmgezondheid door de integriteit van celmembranen van epitheelcellen aan te tasten.^{6,4}

Bij een *in vivo* studie waarbij pootproblemen bij kippen werden bestudeerd, werd *E. faecium* DSM 3530 gebruikt. De studie was opgezet met verschillende groepen kippen die op een verschillende bodem gehouden werden (zaagsel of roosters) en daarbij werd ook gekeken of het toedienen van een probioticum effect zou hebben. Bij dit onderzoek werd de werking van Poultry Star onderzocht, maar werd ook gekeken naar het effect van *E. faecium* zelf op het voorkomen van manken. Er werd iedere dag gekeken naar de beweging van de dieren en ook tijdens de autopsie stond het bewegingsstelsel centraal. Er werd voornamelijk gekeken naar de humeruskop en naar het proximale tibiale hoofdje op doorsnede. Aan de hand van de macroscopische letsels werden de dieren in verschillende groepen onderverdeeld en alle macroscopische letsels werden ook microscopisch onderzocht.

Uit deze studie kon geconcludeerd worden dat bij de groep die probiotica gevoerd kreeg en op een roostervloer gehouden werd, er een lagere incidentie van manken was ten opzichte van de groep die ook op roostervloer stond maar geen *E. faecium* kreeg. Er is dus een positieve invloed op de beenderkwaliteit waardoor er minder manken bij de kippen voorkomt.⁴²

3.3. *Bacillus* spp.

Eén van de werkingsmechanismen van bacilli is competitieve exclusie, die wordt bekomen vanaf 10^3 - 10^4 kve/g voeder. Tevens kennen *Bacillus* spp. ook een probiotische werking via het verhogen van het aantal melkzuur-producerende bacteriën.²⁵ Bacilli produceren ook bacteriocines (subtilosin A) die een inhiberend effect hebben op de groei van onder andere *E. coli*, een veelvoorkomende pathogene kiem bij pluimvee.⁴⁰

In de producten Calsporin, Clostat en Pro-flora worden verschillende *Bacillus subtilis* stammen gebruikt. De PB6-stam (Clostat) werd getest in een *in vivo* studie waarbij vleeskuikens geïnoculeerd werden met verschillende *Eimeria* spp. en vervolgens met *Clostridium perfringens* voor het induceren van necrotische enteritis (NE). Bij de kippen die spores van *Bacillus* PB6 toegediend kregen (2.5×10^{11} kve/ton voeder), werden niet enkel veel minder necrotische darmlletsels vastgesteld, ook hun algemene darmgezondheid was veel beter dan bij de onbehandelde groep (bij dit experiment werd gekeken naar de lengte van de villi en de diepte van de crypten in de darmen). Dit uitte zich in een lagere voederconversie bij de behandelde groep.³⁴

Een andere *Bacillus subtilis* stam, stam C-3102 (Calsporin) zorgde *in vivo* voor een significant hogere *Lactobacillus* concentratie ter hoogte van het caecum, ileum en in de faeces. Bij de gesupplementeerde groep werden er verlaagde concentraties van *E. coli* (ter hoogte van het caecum en de mest), *Salmonella* (ter hoogte van het caecum, ileum, dikke darm en in de mest) en *Clostridium perfringens* (ter hoogte van de dikke darm en in de mest) vast gesteld. Het gevolg is onder andere een lager percentage van dieren met NE. De manipulatie van de intestinale microbiota resulteert in een betere groei en voederconversie. Bij deze studie was er, in tegenstelling tot de test met Clostat, aandacht voor eventuele neveneffecten. Zo was er geen daling van de voederopname, de verteerbaarheid van de droge stof was verhoogd, de ammoniak emissie was verminderd en er was geen effect op de karkaskwaliteit.²²

In Pro-flora wordt nog een andere *Bacillus subtilis*-stam gebruikt, namelijk *B.subtilis* QST713. De spores van dit probioticum werden in een *in vivo* proef getest, waarbij NE werd geïnduceerd. Deze spores werden per os via het voeder aan de kippen toegediend. Necrotische enteritis werd geïnduceerd door *Clostridium perfringens* oraal te inoculeren. De groep die de probiotica kreeg, werd vergeleken met verschillende groepen kippen waarbij er wel- of geen inoculatie met *C. perfringens* was en wel- of geen toediening van verschillende dosissen probiotica of het antibioticum bacitracin methyl disalicylaat (BMD).

Hoge dosissen (10^6 kve/g product) van deze *Bacillus*-stam zorgden voor een reductie van NE. Er was geen verschil met de kippen die geen *C. perfringens* toegediend kregen. Een lage dosis van dit type probioticum had een verlaagde gewichtsaanzet en een verhoogde voederconversie tot gevolg wat uiteraard een negatief effect genoemd mag worden. Uit deze studie kan men concluderen dat een adequate dosis van *B. subtilis* QST713 eenzelfde effect heeft als behandeling met het antibioticum BMD, zowel voor de klinische- als de subklinische symptomen.³⁹

3.4. *Pediococcus* spp.

Het werkingsmechanisme van *Pediococcus acidilactici* baseert zich op de productie van lactaat en bacteriocines (pediocin PA-1). De bacteriocines induceren bij hun doelwit-bacterie de vorming van poriën en ion-kanalen waardoor het metabolisme van de cel verstoord raakt en de cel zal sterven.⁴⁰

Dit bacterieel species wordt gebruikt in Poultry Star. Bij een *in vivo* studie met *Pediococcus acidilactici*, stam MA18/5M kwamen meerdere gunstige effecten naar voren. Deze stam behoort tot de darmmicrobiota-stabilisatoren. Bij deze studie werden leghennen voor 24 weken gevolgd. Er was geen effect op het lichaamsgewicht, de voederopname en de ei-productie. Wel waren de eieren zwaarder en had de schaal een relatief zwaarder gewicht. Dit uitte zich in een lager aantal gebroken eieren. Tevens was de voederconversie per kg ei lager. Ook de samenstelling van de eieren was veranderd na 6 maanden gebruik van het probioticum. De eieren bevatten 10% minder cholesterol en hadden een hoger gehalte aan aminozuren zoals linoleenzuur.³¹

3.5. *Bifidobacterium* spp.

Bifidobacterium animalis subspecies *animalis* wordt gebruikt in Poultry Star.

Deze bacteriën produceren melkzuur, dat resulteert in een pH daling waardoor pathogene kiemen zich minder goed kunnen vermeerderen.⁴⁰ Bifidobacteria maken deel uit van de normale darmmicrobiota van pluimvee. In een studie werden deze samen met lactobacilli gestimuleerd door het voederen van een prebioticum (hier oligosachariden). Het voorkomen van *Campylobacter jejuni* doorheen de productiestadia van kippenvlees werd hier opgevolgd. Een toename van het aantal bifidobacteria ging samen met een daling van het aantal *C. jejuni* wat indiceert dat bifidobacteria een probiotisch effect hebben.²

In een andere studie werd gekeken naar de invloed van *Bifidobacterium longum* op immuun-gemedieerde processen bij de kalkoen. Het resultaat van deze studie was teleurstellend, want er werd geen significant verschil vastgesteld tussen de aangeboren- en verworven immuniteit tussen de behandelde groep en de controlegroep.³⁵

Een onderzoek naar de faecale concentraties van *Bifidobacterium longum* bij pluimvee wees uit dat deze omgekeerd evenredig gelinkt was met de hoeveelheid *Campylobacter jejuni* in de mest. Dit resultaat wijst op een inhiberende activiteit tegen *Campylobacter in vivo*.⁷

Bifidobacterium animalis produceert ook het bacteriocine; bifidocin A. Dit bacteriocine zorgt voor cellyse van de doelwit-cellen. Op deze manier kunnen bifidobacteria een effect tegen onder andere *E. coli* bewerkstelligen.⁷

4. Bespreking

Er worden in veel probiotische preparaten dezelfde kiemen gebruikt. De meest gekende probiotica zoals lactobacilli, enterococconen en bacilli werden al in verschillende studies onderzocht die vaak gefinancierd worden door commerciële bedrijven met als gevolg dat negatieve resultaten nauwelijks gepubliceerd worden. Dit zorgt uiteraard voor een vertekend beeld van de werkelijkheid. Wat opvalt is dat er weinig specifieke informatie is over eventuele nadelige neveneffecten van de probiotica waardoor de microbiota alsnog uit balans is of er zodanig veel lactaat-producerende bacteriën zijn dat de pH zodanig laag wordt dat ook de goede microbiota zal afsterven. Een mogelijke verklaring is het feit dat een dosis die groot genoeg is om nadelige effecten te bekomen, niet in de praktijk voor zal komen door zijn omvang en de kosten van het preparaat.

Wat voor alle *in vitro* studies geldt, is het feit dat deze niet zonder meer te extrapoleren zijn naar de praktijk. Zelfs bij *in vivo* studies kan men dit niet zomaar doen door de verschillen met de praktijkbedrijven. Deze verschillen zitten in de hogere infectiedruk, bredere range aan pathogene kiemen en de minder strikte bacteriologische opvolging op de praktijk bedrijven. Het zou interessant zijn om een studie met de verschillende probiotica te doen op verschillende praktijkbedrijven. Door de kosten van eventuele verliezen te compenseren (door de producent), kunnen pluimveehouders grotere risico's nemen bij het inzetten van probiotica om de capaciteit ten volle uit te testen. Er wordt nu nog relatief snel terug gegrepen naar antibiotica om eventuele verliezen te voorkomen. Op deze manier worden de probiotica te snel aan de kant gezet en zal men nooit achter het volledige potentieel komen. Echter zullen deze resultaten bedrijf-specifiek zijn en misschien daardoor niet interessant genoeg om in te investeren. Uiteraard is het bij gebruik in de praktijk ook zeer belangrijk dat het nauwkeurig wordt gedaan. De dosis, temperatuur, mate van oplossing, de opname etc zijn stuk voor stuk van belang voor een goede effectiviteit. Zo is geweten dat ziek pluimvee een minder goede voederopname heeft terwijl de drinkwater-opname wel langer goed blijft. Om deze reden geniet drinkwatertoepassing bij reeds aangetaste dieren de voorkeur.

Bij een studie met *Bacillus spp.* kwam men tot de conclusie dat een lage dosis een verhoogde voederconversie en verlaagde gewichtsaanzet tot gevolg had.³⁸ Er worden dus ook negatieve effecten gezien.

Het feit dat pathogenen zelf ook effect hebben op elkaar, maakt de materie des te ingewikkelder. Zo kunnen bacteriocines die geproduceerd worden door *E. coli* de kolonisatie van *Salmonella* tegen gaan.²⁵ Om het effect van probiotica goed in te kunnen schatten, moet men dus niet enkel de interactie tussen pathogene kiemen en het probioticum in acht nemen. Ook onderlinge interacties tussen pathogenen kunnen een invloed hebben. In de praktijk lijkt het mij belangrijk om rekening te houden met menginfecties van de kippen. Misschien moeten de dosissen aangepast worden of ligt de oplossing juist in het gebruik van een totaal ander probioticum. Net als de reguliere diergeneeskunde moet het inzetten van een product gebaseerd zijn op de identificatie van de kiem die men wenst te bestrijden. In de bestaande literatuur is hier niet veel over te vinden.

Sommige resultaten in deze masterproef zijn gevonden in studies die bij andere diersoorten (waaronder de mens¹) en ander gevogelte zoals kwartels⁵ zijn uitgevoerd. Het is maar de vraag of al deze resultaten geëxtrapoleerd mogen worden naar kippen die gehouden worden voor de eieren of het vlees. Ook eventuele verschillen tussen vleesrassen en leghennen onderling kunnen het resultaat van de studies beïnvloeden, net als de verschillende kippen rassen die gebruikt zijn (bijvoorbeeld Cobb, Ross, Hubbard) Door verschillen in de genetica kunnen immunoreacties onderling verschillen.

Concluderend kan men stellen dat er reeds veel onderzocht en gekend is van de effecten van verschillende probiotica. Verder onderzoek zou gericht kunnen worden op de onderlinge interacties tussen probiotica en pathogene kiemen of tussen pathogene kiemen onderling. Ook de rasverschillen (bijvoorbeeld Cobb versus Ross) tussen de kippen en de verschillende stammen van de probiotica kunnen een invloed hebben op de uiteindelijke werking van het product. Uit de praktijk kreeg ik het signaal dat er wel met probiotica gewerkt wordt, maar dat er vaak terug gegrepen wordt naar dezelfde producten. Het arsenaal is ruim (in deze literatuurstudie heb ik slechts de meest gebruikte producten genoemd, er zijn nog vele anderen), veel effecten zijn al bewezen en het antibioticum-gebruik moet terug gedrongen worden. Al met al redenen genoeg om meer probiotica in te zetten. Desalniettemin zal verder onderzoek uit moeten wijzen welke specifieke probiotische species het beste effect hebben op de verschillende pathogenen en in welke situaties ze het meest aangewezen zijn.

5. Literatuurlijst

1. Abee T., Todd I., Klaenhammer R., Letellier L. (1994) Kinetic studies of the action of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus johnsonii* that forms poration complexes in the cytoplasmic membrane. Applied and environmental microbiology 60 No.3 1006-1013
2. Baffoni L., Gaggia F., Di Gioia D., Santini C., Mogna L., Biavati B. (2012) A Bifidobacterium-based synbiotic product to reduce the transmission of *C. jejuni* along the poultry food chain. International journal of food microbiology 157 156–161
3. Boirivant M., Strober W. (2007) The mechanism of action of probiotics. Current opinion in gastroenterology 23 679–692
4. Capcarova M., Weis J., Hrnčar C., Kolesarova A., Pal G. (2010) Effect of *Lactobacillus fermentum* and *Enterococcus faecium* strains on internal milieu, antioxidant status and body weight of broiler chickens. Journal of animal physiology and animal nutrition 94 215–224
5. Dembele, T., Obdrzalek, V., Votava, M. (1998) Inhibition of bacterial pathogens by lactobacilli. Zentralblatt für Bakteriologie, international journal of medical microbiology, virology, parasitology and infectious diseases 288 395–401.
6. Dudnik L.B., Azyzova O.A., Solovyova N.P., Savchenkova A.P., Pokrovskaya M.A. (2008) Primary biliary cirrhosis and coronary atherosclerosis: protective antioxidant effect of bilirubin. Bulletin of experimental biology and medicine 145 23-28.
7. Guorong L., Li R., Zhenqin S., Chengtao W., Baoguo S. (2015) Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians' intestine. Food control 50 889-895
8. <http://edepot.wur.nl/161911> geraadpleegd op 03-02-2015
9. <http://temp.biomin.net/en/animal-nutrition-products/probiotics/biominr-c-ex/> geraadpleegd op 03-02-2015
10. <http://www.biacton.ro/index.php?page=biacton-2> geraadpleegd op 03-02-2015
11. <http://www.biacton.ro/index.php?page=conclusions> geraadpleegd op 03-02-2015
12. <http://www.cvear.com/wp-content/uploads/2013/.../PoultryStar-sol-label-US.doc> geraadpleegd op 03-02-2015
13. <http://www.drugs.com/vet/proflora.html> geraadpleegd op 03-02-2015
14. http://www.moad.be/files/brochures/PROBIOLAC_BROCHURE.pdf geraadpleegd op 03-02-2015
15. http://www.moad.be/files/pss/PSS_PROBIOLAC.pdf geraadpleegd op 03-02-2015
16. <http://www.orffa.com/site/products-probiotics-calsporin-uk> geraadpleegd op 03-02-2015
17. [http://www.orffa.com/site/products-probiotics-calsporin-uk/\\$FILE/FeedMix%20\(vol%2018,%20nr%201,%202010\)_Alteration%20of%20chicken%20microflora%20by%20sporeforming%20probiotics.pdf](http://www.orffa.com/site/products-probiotics-calsporin-uk/$FILE/FeedMix%20(vol%2018,%20nr%201,%202010)_Alteration%20of%20chicken%20microflora%20by%20sporeforming%20probiotics.pdf) geraadpleegd op 03-02-2015
18. [http://www.orffa.com/site/products-probiotics-leaflet-calsporin-uk/\\$FILE/ORFFA%20Info_CALSPORIN%20\(English\).pdf](http://www.orffa.com/site/products-probiotics-leaflet-calsporin-uk/$FILE/ORFFA%20Info_CALSPORIN%20(English).pdf) geraadpleegd op 03-02-2015
19. [http://www.orffa.com/site/04351C9FB9202B02C125778A0045DABA/\\$FILE/LEAFLET%20-%20Calsporin%20resultaten%20uit%20de%20praktijk_vleeskuikens.pdf](http://www.orffa.com/site/04351C9FB9202B02C125778A0045DABA/$FILE/LEAFLET%20-%20Calsporin%20resultaten%20uit%20de%20praktijk_vleeskuikens.pdf) geraadpleegd op 03-02-2015
20. <http://www.thepoultrysite.com/focus/biomin/2270/biomin-poutrystar-defined-probiotic-product->

proves-efficacy geraadpleegd op 03-02-2015

21. <http://www.w.vetacafe.com/drugs4.php?view=view&id=266> geraadpleegd op 03-02-2015

22. Jeong J.S., Kim I.H. (2014) Effect of *Bacillus subtilis* C-3102 spores as a probiotic feed supplement on growth performance, noxious gas emission, and intestinal microflora in broilers. *Poultry science* 93 3097–3103

23. Jin L.Z., Ho Y.W., Abdullah, N., Ali, M.A., Jalaludin, S. (1996) Antagonistic effects of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. *Letters in applied microbiology* 23 67–71.

24. Kent L., Erickson N., Neil E., Hubbard E. (2000) Probiotic immunomodulation in health and disease. *The journal of nutrition* 130 403-409

25. Kyungwoo L., Hyun S., Lillehoj R., Gregory R., Siragusa E. (2010). Direct fed microbials and their impact on the intestinal microflora and immune system of chickens. *Journal poultry science*. 47 106-114

26. Laukova A., Guba P., Nemcova R., Vazilkova Z. (2003) Reduction of *Salmonella* in gnotobiotic Japanese quails caused by the enterocin-A producing strain of *Enterococcus faecium*. *Veterinary research communication* 27 275-280

27. Levkut M., Revajova V., Laukova A., Sevcikova Z., Spisakova V., Faixova Z., Levkutova M., Stropfova V., Pistl J., Levkut M. (2012) Leucocytic responses and intestinal mucin dynamics of broilers protected with *Enterococcus* EF55 and challenged with *Salmonella* Enteritidis. *Research in veterinary science*. 93 195-201

28. Machlin L. J., Bendlich A. (1987) Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. *The federation of American societies for experimental biology journal* 1 441–445

29. Mendonça Moraes P., Perin L.M., Tassinari Ortolani M.B., Keizo Yamazi A., Nogueira V.G., Nero L.G. (2010) Protocols for the isolation and detection of lactic acid bacteria with bacteriocinogenic potential. *Food science and technology* 43 1320-1324

30. Messaoudi S., Kergourlay G., Dalgalarondo M., Choiset Y., Ferchichi M., Prévost H., Pilet M.F., Chobert J., Manai M., Dousset X. (2012) Purification and characterization of a new bacteriocin active against *Campylobacter* produced by *Lactobacillus salivarius* SMXD51. *Food microbiology* 32 129-134

31. Mikulski D., Jankowski J., Naczmanski J., Mikulska M., Demey V. (2012) Effects of dietary probiotic (*Pediococcus acidilactici*) supplementation on performance, nutrient digestibility, egg traits, egg yolk cholesterol, and fatty acid profile in laying hens. *Poultry science* 91 2691–2700

32. Miyamoto T., Horie T., Fujiwara T., Fukata T., Sasai K., Baba E. (2000) *Lactobacillus* flora in the cloaca and vagina of hens and its inhibitory activity against *Salmonella* Enteritidis in vitro. *Poultry science* 79 7–11

33. Samli H.E., Senkoylu N., Koc F., Kanter M., Agma A. (2007) Effects of *Enterococcus faecium* and dried whey on broiler performance, gut histomorphology and intestinal microbiota. *Archives of animal nutrition* 61 42–49.

34. Sathishkumar J., Gokila T., Kurian H., Ravichandran M., Rajalekshmi M., Haridasan C. (2013) *Bacillus subtilis* PB6 improves intestinal health of broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*-induced necrotic enteritis. *Poultry science* 92 370–374

35. Seifert S., Fritz C., Carlini N., Barth S.W., Franz C.M.A.P., Watzl P. (2011) Modulation of innate and adaptive immunity by the probiotic *Bifidobacterium longum* PCB133 in turkeys. *Poultry science* 90 2275–2280
36. Stromfova M., Laukova A., Mudronova D. (2003) Effect of bacteriocin-like substance produced by *Enterococcus faecium* EF55 on the composition of avian gastro-intestinal microflora. *Acta veterinaria* 72 559-564
37. Strompfova Y., Laukova A., Marcinakova M., Vasilkova Z. (2010) Testing of probiotic and bacteriocin-producing lactic acid bacteria towards *Eimeria spp.* *Polish journal of veterinary sciences* 13 389-391
38. Svetoch E.A., Eruslanov B.E., Levchuk V.P., Perelygin V.V., Mitsevich I.P., Mitsevich E.V., Stepanshin J., Dyatlov I., Seal B.S., Stern N.J. (2011) Isolation of *Lactobacillus salivarius* 1077 (NRRL B-50053) and characterization of its bacteriocin, including the antimicrobial activity spectrum. *Applied and environmental microbiology* 77 2749–2754
39. Tactacan G.B., Schmidt J.K., Miille M.J., Jimenez D.R. (2013) A *Bacillus subtilis* (QST 713) spore-based probiotic for necrotic enteritis control in broiler chickens. *Journy of applied poultry research* 22 825–831
40. Karpinski T.M., Szkaradkiewicz A.K. (2013) Characteristic of bacteriocines and their application. *Polish journal of microbiology*. 62 223–235
41. Van Coillie E., Goris J., Cleenwerck I., Grijspeerdt K., Botteldoorn N., Van Immerseel F., De Buck J., Vancanneyt M., Swings J., Herman L., Heyndrickx M. (2006). Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. *Journal of applied microbiology* 102 1095–1106
42. Wideman Jr R.F., Hamal K.R., Stark J.M., Blankenship J., Lester H., Mitchell K.N., Lorenzoni G., Pevzner I. (2012) A wire-flooring model for inducing lameness in broilers: Evaluation of probiotics as a prophylactic treatment. *Poultry science* 91 870–883
43. Yamawaki R.A., Milbradt E.L., Coppola M.P., Rodrigues J.C.Z., Andreatti Filho R.L., Padovani C.R., Okamoto A.S. (2013) Effect of immersion and inoculation *in ovo* of *Lactobacillus spp.* in embryonated chicken eggs in the prevention of *Salmonella* Enteritidis after hatch. *Poultry science* 92 1560–1563
44. Yanfeng T., Weiqin Z., Lanwei Z., Lianzhong A., Yingchun Z., Xue H., Huaxi Y. (2013) Study of probiotic potential of four wild *Lactobacillus rhamnosus* strains. *Anaerobe* 21 22-27