

Ontwikkelingen in technieken voor de bepaling van nutriëntstatus van landbouwhuisdieren

F4F themamiddag 10 februari 2015

Alfons Jansman & Marinus te Pas



Ontwikkeling van nieuwe indicatoren voor vaststelling van efficiëntie van nutriëntgebruik in landbouwhuisdieren

Nieuwe technieken ontwikkelen die inzicht geven in de **nutriëntstatus, efficiëntie van nutriëntgebruik** en identificatie van voor productie meest limiterende nutriënten onder verschillende bedrijfsomstandigheden en in onderzoek bij landbouwhuisdieren.

Een oriëntatie op de mogelijkheden **proteomics/metabolomics technieken** in te zetten voor de analyse van bloed en/of urine ter bepaling van de nutriëntstatus en efficiëntie van nutriëntbenutting.

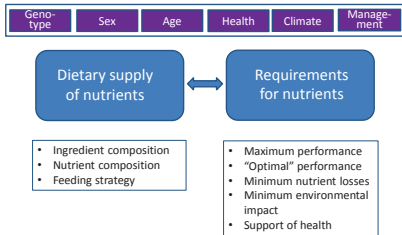
Inzet van deze technieken kan op termijn leiden tot het identificeren van **nieuwe indicatoren** voor de bepaling van efficiëntie van nutriëntbenutting.



1

12/02/2015

Nutrient status of farm animals



Nutrient balance

nutrient intake via the diet - nutrient loss¹

=

nutrient retention in body, milk and/or eggs

¹Loss via faeces, urine, resp. air and as heat



3

Activiteiten MMM6

▪ Literatuurstudie "*Techniques for evaluating nutrient status in farm animals*" over de thans beschikbare technieken voor meting van nutriëntstatus en -efficiëntie en beschrijving van perspectieven voor nieuwe technieken

▪ Mogelijkheden en kansen voor gebruik van de technieken binnen het onderzoek van F4F – onderdeel Meer met Minder (MMM)



Inleiding

- Wat is nutriënt status?
- Overzicht en voorbeelden van de (klassieke) technieken uit de literatuur
- Inzet van -omics technologieën voor de bepaling van nutriënt status
- Biomarkers voor nutriënt status
- Conclusies



2

12/02/2015

Voorbeeld balansstudie varkens (g/kg^{0.75})

	Normaal eiwit	Beperkt eiwit
N-opname	2.32 (100)	1.77 (100)
N-faeces	0.12 (5)	0.13 (7)
N-urine	0.64 (28)	0.42 (24)
N-retentie	1.57 (67)	1.22 (69)
N-efficiëntie ¹	71	75

¹N-retentie/verteerbaar N



Kampman – van de Hoek et al., 2015

Dietary nutrients

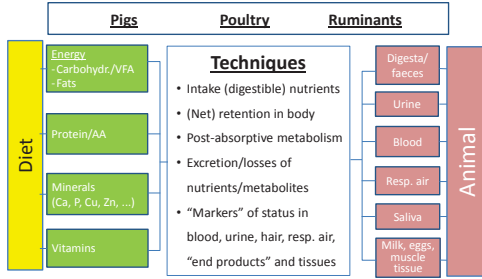
The main groups of nutrients considered in animal nutrition and during diet formulation are:

1. Energy (in the form of carbohydrates, fats, protein and amino acids and short chain fatty acids)
2. Protein and amino acids
3. Minerals (Ca, P, Cu, Zn and other trace minerals)
4. Vitamins
5. Essential fatty acids



4

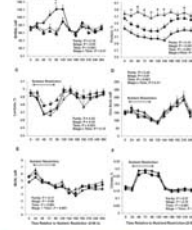
Techniques for evaluating nutrient status



Jansman & te Pas (2015)

Metabolic and production profiles of dairy cows in response to decreased nutrient density to increase physiological imbalance at different stages of lactation

V. Bjerre-Harpath,¹ N. C. Friggens,^{1,2} V. M. Thorup,¹ T. Larsen,¹ B. M. Damgaard,¹ K. L. Ingvarsen,¹ and K. M. Moses¹



Concentrations of milk BHBA (A), protein (B), lactose (C), uric acid (D), MUN (E), and citrate (F) at time points (i.e., hour) relative to dietary nutrient restriction. Results reported here identified metabolites (i.e., glucose, NEFA, BHBA, cholesterol) as predictors of **Physiological imbalance (PI)** and identified milk citrate as a promising **biomarker** for PI on farm.

Bjerre-Harpath et al. (2012)

Gebruik en toepassing van technieken

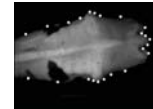
- Onderzoek of praktijk
- Gericht op een individueel dier of een groep van dieren
- Korte en lange termijn effecten van een incorrect of ongebalanceerd aanbod
- Gebruikte technologie (snelheid en nauwkeurigheid)
- Investerings en kosten
- Vertaling naar praktische maatregelen ter verbetering van de balans tussen nutriëntaanbod en -behoefte



Potential for Estimation of Body Condition Scores in Dairy Cattle from Digital Images

J. M. Bewley,¹ A. M. Peacock,¹ O. Lewis,¹ R. E. Boyce,¹ D. J. Roberts,¹ M. P. Coffey,² S. J. Kenyon,³ and M. M. Schutz¹

Body condition scoring, an indirect measure of the level of subcutaneous fat in dairy cattle, has been widely adopted for research and field assessment or for management purposes on farms. The feasibility of utilizing digital images to determine body condition score (BCS) was assessed for lactating dairy cows. This study demonstrated the potential for using digital images for assessing BCS.



Bewley et al. (2008)

Digital imaging has also been applied for assessing body shape, weight, and fatness in live pigs (Brandt and Jørgensen, 1996; Schofield et al., 1999; Doeschl et al., 2004).

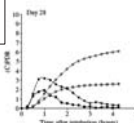


Rate of metabolic decarboxylation of leucine as assessed by a [1-¹³C]₆ leucine breath test combined with indirect calorimetry of broiler chickens fed isocaloric diets with different protein:fat ratio

O. Swennen¹, C. Lamy², G. Janssens², K. Verbeke³, E. Decuyper² and J. Buyse¹

¹ Laboratory of Livestock Physiology, Immunology and Genetics, Department of Biosystems, KU Leuven, Herestraat, Belgium, ² Laboratory of Animal Nutrition, Ghent University, Merelbeke, Belgium, and ³ Department of Gastroenterology, KU Leuven, Leuven, Belgium

The methodology to study [1-¹³C]₆ leucine decarboxylation in chickens using a breath test combined with indirect calorimetry was accomplished. Results of the nitrogen balance test indicated that the LP broilers had an improved dietary protein retention compared with the HP animals. Moreover, LP chickens decarboxylated a significantly lower percentage of [1-¹³C]₆ leucine, demonstrating several 'protein- or amino acid-sparing' mechanisms in animals reared on a diet with lower protein level.



Swennen et al. (2007)



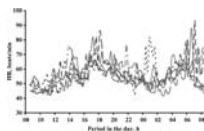
Heart rate measurements as an index of energy expenditure and energy balance in ruminants: A review¹

A. Brosh²

Beef Cattle Section, Neve Ya'ar Research Center, Agricultural Research Organization, Ramat Yishay 30095, Israel

Soon when devices for automatic HR monitoring of domestic ruminants become available at a reasonable price, continuous monitoring of HR might provide producers with a sensitive tool for identifying changes in the energy status of their animals. This will also significantly help to shorten the time needed to identify health problems of individual animals.

$$VO_2 = HR \times [Vs (C_aO_2 - C_vO_2)]$$

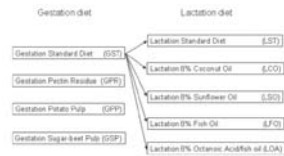


Brosh (2007)



Effects of nutrient supply, plasma metabolites, and nutritional status of sows during transition on performance in the next lactation¹

A. V. Hansen, C. Lauridsen, M. T. Sørensen, K. E. Bach Knudsen, and P. K. Thiel²



Correlations between sow plasma metabolites during transition and piglet performance during the colostrum period (0 to 24 h), early lactation (d 7 to 10), and at peak lactation (d 14 to 17 and d 17 to 28).



Hansen et al. (2012)

Effects of nutrient supply, plasma metabolites, and nutritional status of sows during transition on performance in the next lactation¹

A. V. Hansen, C. Lauridsen, M. T. Sørensen, K. E. Bach Knudsen, and P. K. Thiel²

Plasma concentration ²	Mortality 0 to 24 h ³	DWG d 7 to 10 ²	DWG d 14 to 17 ²
Glucose d 108	0.09	-0.13	
Glucose d 112	-0.13	-0.20	
Glucose d 1	-0.01	-0.16	
Lactate d 108	0.16	-0.20*	
Lactate d 112	0.14	-0.19	
Lactate d 1	0.20	-0.13	
NEFA d 108	-0.11	-0.18	
NEFA d 112	-0.11	-0.18	
NEFA d 1	-0.10	0.00	
Acetate d 108	-0.07	-0.21	
Acetate d 112	0.19	-0.09	
Acetate d 1	0.20†	-0.24	
Propionate d 108	0.06	0.04	
Propionate d 112	0.19	0.04	
Propionate d 1	0.16*	0.04	
Butyrate d 108	0.04	-0.12	
Butyrate d 112	0.14*	0.01	
Butyrate d 1	0.27†	-0.19	
Total SCFA d 108	-0.06	-0.20	
Total SCFA d 112	0.06	0.05	
Total SCFA d 1	0.01	0.06	
MCPA d 1	0.27*	0.01	
LCFA d 1	0.15	0.01	



Hansen et al. (2012)

Bone Densitometry as an Indicator of Percentage Tibia Ash in Broiler Chicks Fed Varying Dietary Calcium and Phosphorus Levels¹

E. M. Onyango,^{1,2} P. Y. Hester,¹ R. Strohshne,¹ and O. Adeboye¹

TABLE 4. Correlation coefficients of tibia bone characteristics and dietary Ca and P in 3-wk-old broiler chicks¹

Item	Ash	Bone mineral content	Bone mineral density	Shear force
Ca	0.89	0.89	0.91	0.50
Total P	0.89	0.88	0.91	0.48
Ash		0.92	0.93	0.67
Bone mineral content			0.99	0.56
Bone mineral density				0.56

¹All correlation coefficients were significant at P < 0.05.



Onyango et al. (2003)



Influence of calcium and phosphorus feeding on markers of bone metabolism in transition cows

V. R. Moreira,¹ L. K. Zeringue,¹ C. C. Williams,¹ C. Leonard,¹ and M. E. McCormick¹
¹Louisiana State University AgCenter Southeast Research Station, Franklinton 70438
²Louisiana State University AgCenter School of Animal Sciences, and
³Louisiana State University Department of Experimental Statistics, Baton Rouge 70803

Blood samples were drawn 10 d before expected calving, at calving, and at 15 and 30 DIM for serum analyses of osteocalcin, a biomarker of bone accretion, and pyridinoline, a biomarker of bone resorption. There was no significant effect of Ca or P on osteocalcin measurements. Pyridinoline concentrations were affected by dietary Ca levels and tended to have a significant dietary Ca x dietary P interaction.

Item	Treatment ¹			
	HCaHP	HCaLP	LCaHP	LCaLP
OC, ng/mL	3.52	3.62	3.43	3.60
PYD, nM	5.58	5.94	7.25	6.23

Moreira et al. (2009)



REVIEW ARTICLE

Quantitative Ultrasound Methods to Assess Bone Mineral Status in Children: Technical Characteristics, Performance, and Clinical Application

GIAMBROTTI, BARONCELLI

Quantitative ultrasound (QUS) methods have been developed to assess **bone mineral status** in some peripheral skeletal sites such as calcaneus, phalanges of the hand, and tibia. QUS techniques are **safe, easy to use, radiation-free**, and devices are **portable**, so that they are particularly indicated to assess bone mineral status in children. The simplicity of use of the QUS devices, the lack of radiation exposure for the child, the possibility to perform the examination at bedside, and the **low cost** represents clear advantages of QUS methods compared with x-ray-based densitometric techniques.



Baroncelli (2008)



Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review¹⁻⁵

Nicola M. Lowe, Katalin Fekete, and Tamás Decsi

Biomarkers for Zinc in man

Plasma/serum Zn (µmol/L)	50
Urinary Zn (mmol/mol creatinine) supplementation	5
Urinary Zn (µmol/d) depletion	4
Erythrocyte Zn (µmol/L)	7
Mononuclear cell Zn (µmol/10 ¹⁰ cells)	5
Polymorphonuclear cell Zn (µmol/10 ¹⁰ cells)	6
Platelet Zn (nmol/10 ¹⁰ cells)	5
Hair Zn (ppm)	3
Plasma alkaline phosphatase (IU/L)	6
Aminolevulinic acid dehydratase (IU/L RBC)	2
Erythrocyte metallothionein (µg MT/g protein) supplementation	2
Erythrocyte metallothionein (nmol/g protein) depletion	1
Monoocyte metallothionein cDNA (pg cDNA/ng RNA)	2
Saliva Zn (mg/dL)	1
Salivary-sediment Zn (µmol/g dry wt)	2
Plasma extracellular superoxide dismutase (IU/mL)	1
Lymphocyte Zn (µmol/10 ¹⁰ cells)	3
Lymphocyte ecto-5'-nucleotidase (nmol · h ⁻¹ · 10 ⁻⁶ cells)	1
Nail Zn (ppm)	1

Lowe et al. (2009)



Methods of assessment of zinc status in humans: a systematic review¹⁻⁵

Nicola M. Lowe, Katalin Fekete, and Tamás Decsi

Biomarkers for Zinc in man

Plasma angiotensin-converting enzyme (IU/L)	1
Neutrophil Zn (µg/10 ¹⁰ cells)	3
T lymphocyte metallothionein -2A mRNA (fg MT-2A mRNA/pg β-actin mRNA)	1
Plasma 5'-nucleotidase (Shinowara units)	1
Mixed-saliva Zn (µmol/L)	1
Endogenous Zn excretion (µmol/d)	1
Plasma Zn flux (nmol/d)	1
Exchangeable Zn pool (mmol)	1
Carbonic anhydrase (IU/g Hgb)	1
Feces Zn (µmol/d)	1
Neutrophil α-D-mannosidase (nmol product · h ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	1
Neutrophil alkaline phosphatase (nmol product · h ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	1
Erythrocyte membrane Zn (µmol/g protein)	1
Erythrocyte membrane alkaline phosphatase (nmol product · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	1
Erythrocyte membrane NP (nmol product · min ⁻¹ · mg protein ⁻¹)	1

Lowe et al. (2009)



Techniques for measuring nutrient status

Technique	Nutrient	Basis	Application
Condition score	Energy	Whole body	Man, animal
Imaging techniques (CT, MRI)	Energy, minerals	Whole body	Man, animal
Backfat thickness, fat depots	Energy	Whole body/body parts	Animal, man
Nutrient balance (indirect)	Energy, protein and minerals	Faeces, urine, expired air	Man, animal
Nutrient retention (direct)	Energy, protein and minerals	Whole body, organs and tissues	Animal
Respiration measurements	Energy	Whole body	Man, animal
Heart rate	Energy	Heart rate measurement	Man, animal
Electronic nose	General	Expired air	Biomedical
Blood metabolites	Nutrients	Blood	Man, animal
Stable isotopes of nutrients + mass spectrometry	Nutrients	Whole body or organs/tissues	Man, animal
Milk composition	Protein and AA	Milk	Dairy cows, pigs
Hair composition	Minerals	Hair	Biomedical
Gene expression	Nutrients	Tissue	Man, animals
Proteomics	Nutrients	Blood, organs and tissues	Man, animals
Metabonomics	Nutrients	Blood, urine	Man, animals
Questionnaires	Nutrients	Interview	Man, medical

Jansman & te Pas (2015)



Outline – genomics tools en nutrient status

- Genomics
 - Wat is het?
 - Waarom zou je het willen?
 - Hoe toe te passen?
- Biomarker
 - Wat is het?
 - Wat kun je er van verwachten?
- Toepassingen
 - Voorbeelden



Genomics: wat is het?

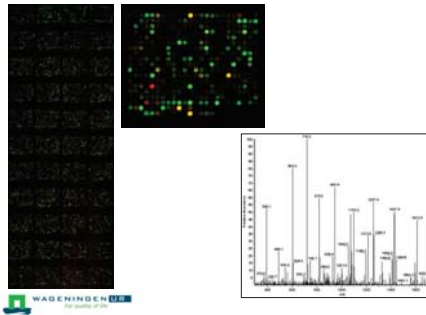
- Een **gereedschapskist** om de **werking** van **alle** tot expressie komende genen in specifieke cellen of weefsels tegelijk en in relatie tot elkaar te bestuderen.
- Het centrale dogma van de biologie en omics methoden:

DNA	RNA	Eiwit	Metabolieten
Erfelijkheid	DNA in actie	De actieve component	De actieve stoffen
Genomics	Transcriptomics	Proteomics	Metabolomics

- Erfelijkheid en omgeving bepalen samen de respons en reactie van het dier.



Genomics: hoe ziet het er uit?

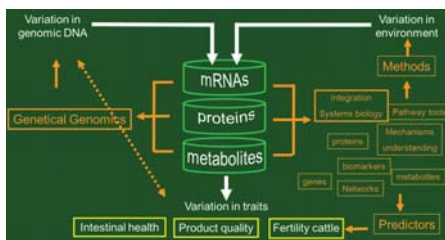


Genomics: waarom zou je het toepassen?

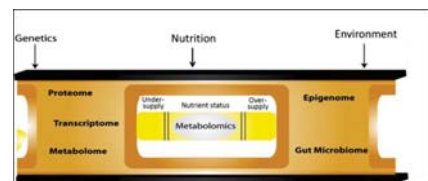
- Alle biologische kenmerken van dieren worden gevormd door een scala aan biologische processen in het dier.
- Iedere verandering in de omgeving en aanbod van voer en nutriënten zal leiden tot een verandering in het dier.
 - Dieren verschillen in reactie door de interactie met hun DNA.
 - De reactie is te meten met omics technieken.
 - Als je kennis hebt kun je de reactie voorspellen of monitoren met biomarkers.
 - Ook respons op nutriëntaanbod, variatie in nutriëntbehoefte, en nutriënten opname (capaciteit) zijn te meten met omics technieken.



Functional Genomics and Bioinformatics



Omics en nutriëntstatus en -balans



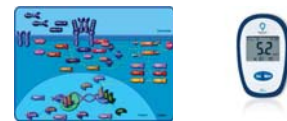
Genomics: hoe toe te passen?

- (Voer) interventie studie
 - Wat verandert er? (Monitoren)
 - Welk biologische mechanismen veranderen er? (Diagnose: is dit goed voor het dier – voor de efficiëntie van productie en nutriëntgebruik?)
 - Kan ik er van leren en het de volgende keer voorspellen? (Voorspellende waarde – biomarker)

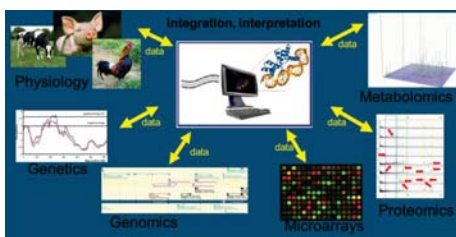


Biomarker: Wat is het?

- Een **test** om het **niveau** van een **molecuul** (nutriënt of metaboliet) te bepalen
- **Voorwaarde:** het molecuul zegt iets over het biologische proces dat verantwoordelijk is voor het te bestuderen kenmerk
- Er is **geen** noodzaak om het verantwoordelijke (**causale**) molecuul te bestuderen: Voorbeeld = Diabetes



Geïntegreerde analyse



Biomarkers: Toepassing voor nutriënten status en balans

- VB: Interventie: verandering in voersamenstelling (ingrediënten of nutriënten) of voeraanbod
- Vooraf inschatten wat het effect van een interventie zal zijn
- Monitoren van de interventie met mogelijkheid bij te sturen
- Een "bijsluiter" bij het voer: Aantoonbare biologische effecten van de nutriënten op het dier (bijv. groei, gezondheid, ...)

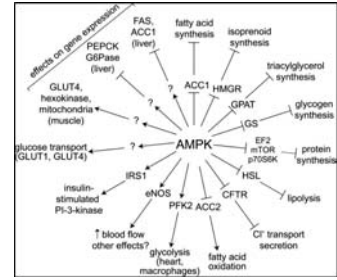


Toepassingsmogelijkheden

- Enkele voorbeelden van mogelijkheden:
- Onderzoek:
 - Hoe werken nutriënten in de cellen? / hoe herkennen cellen de nutriënten?
- Toepassing:
 - Eigen experiment: Wat verandert er in het dier als de voersamenstelling wijzigt?



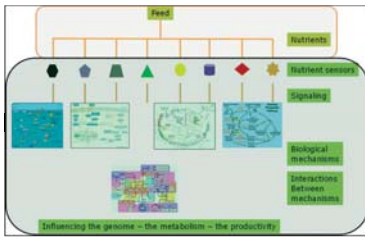
Onderzoek: Begrijpen hoe het werkt



Hardie, 2003



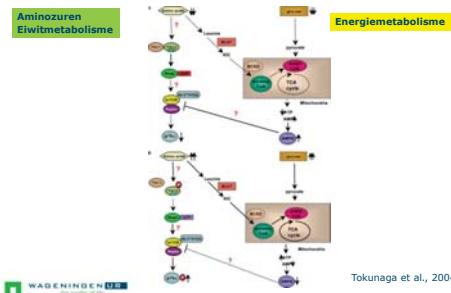
Onderzoek: Nutriënt sensing in weefsels en cellen



Recent paper: Efeyan et al. (2015) Nutrient-sensing mechanisms and pathways. REVIEW doi:10.1038/nature14190



Integratie van kennis door omics

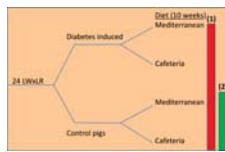


Tokunaga et al., 2004



Toepassing: Nutriënten samenstelling – "wat doet het met je?"

- Experiment: Invloed van nutriënten samenstelling van het voer op de gezondheid meten
- Te Pas, M.F.W., L. Kruijt, S.-J. Koopmans, M.A. Smits. Plasma Proteome profiles associated with diet-induced metabolic syndrome and the early onset of metabolic syndrome in a pig model. PLoS ONE 8 (2013) Issue 9, e73087



Wat kun je er NU mee?

- Effecten van nutriënten in dieren bepalen
- Effecten van nutriënten op gezondheidsaspecten van de producten bepalen voor consumenten
- Effecten van veranderingen van voersamenstelling bepalen (monitoren / voorspellen)
- Voer labels (certificeren)
-



Metten in bloed met proteomics

- Geen klinische effecten bij de dieren
- Aantoonbare verschillen:
 - Gezondheidseffecten te verwachten
 - Ook bij de gezonde dieren
- Vertaling naar productiedieren:
 - Voer heeft invloed op gezondheid
 - Dit is al te meten voor het zichtbaar is!
 - Voorspellende waarde
 - Gezondheid product



Metten in de stal!

- Ontwikkelingen die NU lopen:
 - In line meten:
 - RNA niveau van een gen in 2 uur op locatie bepalen
 - Dipstick voor proteomics - resultaten in melk en urine
 - Blue4Green: metabolieten real time meten
 - ... Ontwikkelingen gaan erg snel!



Samenvattend: Toepassingsmogelijkheden

- Omics kan:
 - Biologische mechanismen ophelderen
 - Langs deze weg meten van de nutriëntstatus en -balans in het dier
 - Daardoor voorspellen van veranderingen van de nutriëntstatus en -balans in het dier t.g.v. verandering van voersamenstelling en -aanbod
 - Zowel in individuele dieren als in groepen (bijv. ras effecten)



Conclusies (1)

- Er bestaat een range aan (nieuwe) technieken voor bepalen nutriëntstatus in verschillende diercategorieën.
- Keuze techniek afhankelijk van een groot aantal factoren (nutriënt, toepassing, kosten, termijn)
- Omics technologieën bieden grote mogelijkheden voor de ontwikkeling van nieuwe methodieken voor bepaling van nutriëntstatus in landbouwhuisdieren en biomarkers hiervoor.



Conclusies (2)

- De vertaling van -omics parameters/markers op cel/weefsel niveau naar nutriëntstatus voor het gehele dier vraagt nog nadere aandacht.
- Biomarkers voor nutriëntstatus bieden een goed perspectief voor toepassing in de praktijk maar dienen nog verder ontwikkeld te worden.



Dank voor uw aandacht !



alfons.jansman@wur.nl
marinus.tepas@wur.nl