

Feed4Foodure

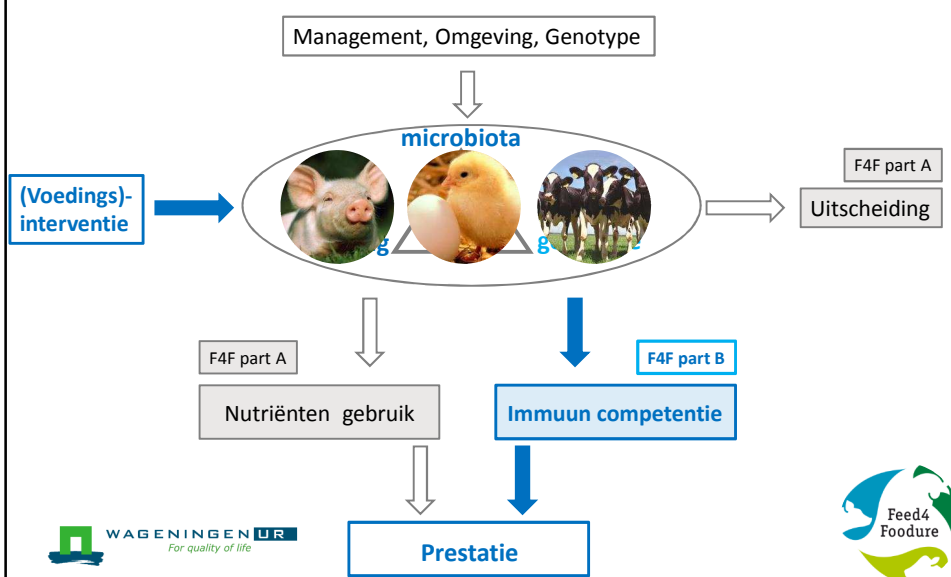
Voeding, darmgezondheid en immuniteit (VDI)

Technieken en procedures

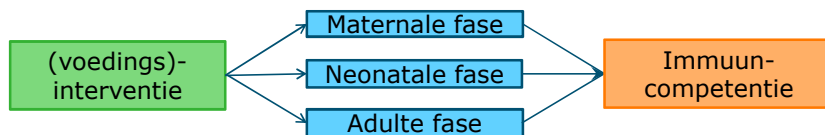
Astrid de Greeff



Interacties in de darm



Effect interventie op immunocompetentie



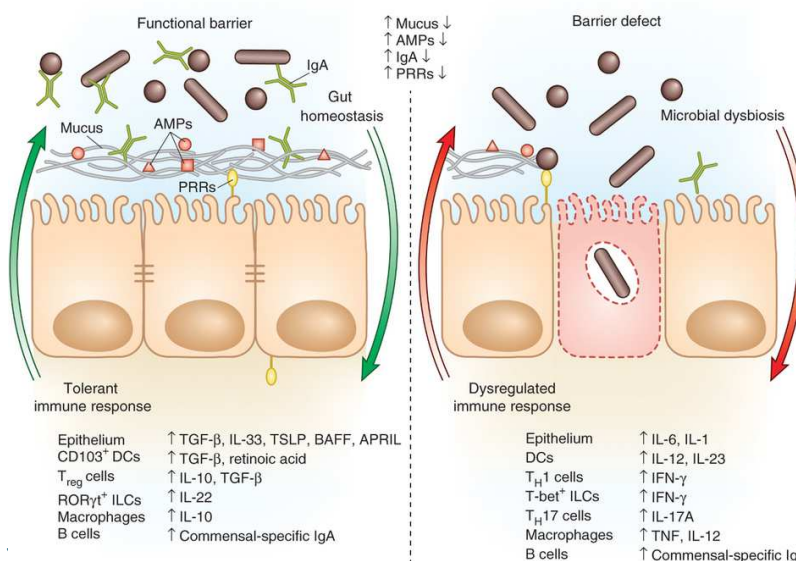
Immunocompetentie = het vermogen van het immuun systeem om te reageren op een stimulus door middel van een doelmatige, evenwichtige **immuun respons**.

≠

Immuunrespons = de daadwerkelijke reactie op een stimulus.



Immuun systeem van de darm



Monstername (varken, kip, kalf)

- Darm:
 - Inhoud: microbiota samenstelling (dunne darm)
 - Darmvlokken: genexpressie
 - Darmwand: histologie / immunohistochemie
- Faeces: microbiota samenstelling (dikke darm)
- Lymfknoep darm: specifieke immuun cellen
- Systemisch (bloed)
 - Serum: serologie, antilichamen
 - Plasma: eiwitbepalingen, acute fase eiwitten
 - PAXgene: genexpressie



Microscopische technieken

■ Histologie

- Darmintegriteit
- Beschadigingen
- Influx cellen

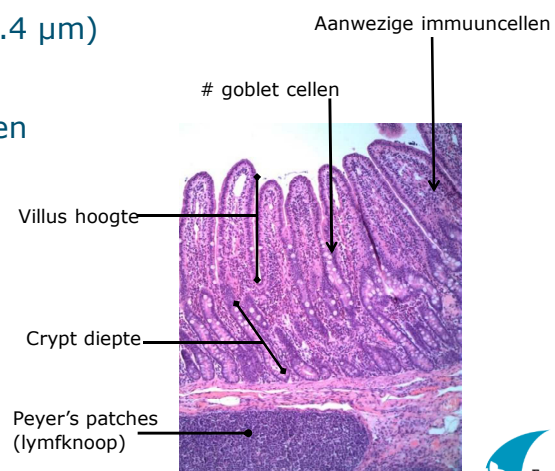
■ Immunohistochemie

- M.b.v. antilichamen gericht celtypes aantonen
 - T cellen
 - Macrofagen
 -

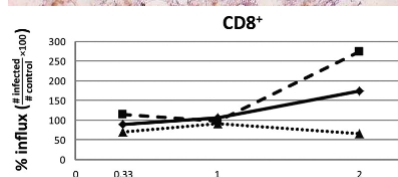
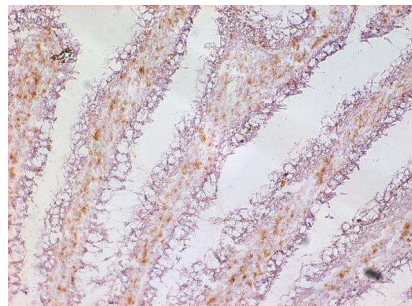
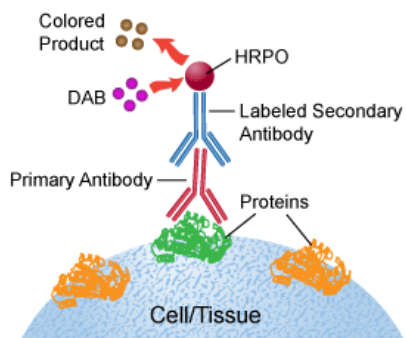


Histologie (darmintegriteit)

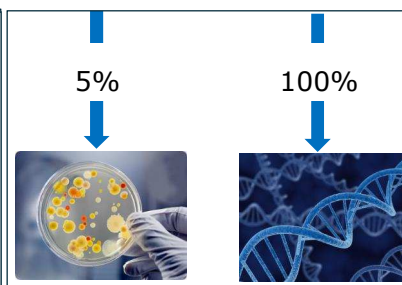
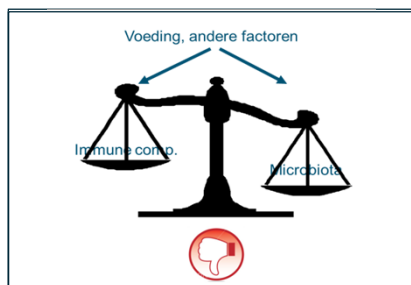
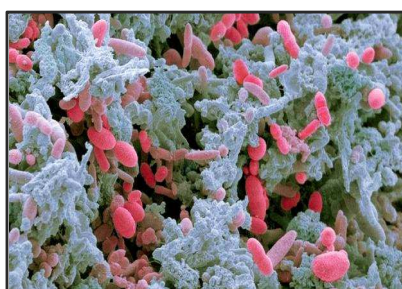
1. Weefsel fixeren in formaline
2. Coupes maken (0.4 μm)
3. Coupes kleuren
4. Coupes analyseren



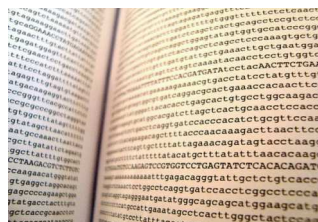
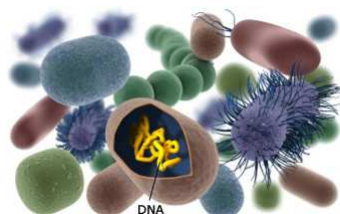
Immunohistochemie (bv. T cellen)



Microbiota in de darm



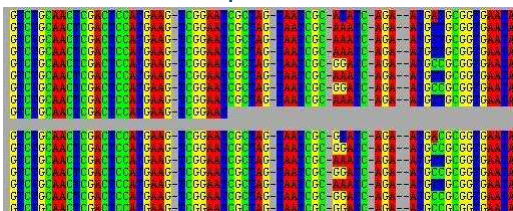
Microbiota samenstelling sequenzen



- DNA van 1 bacterie bevat 139.000 – 13.000.000 baseparen → te veel!
- Niet hele genomische DNA sequenzen maar 1 specifiek stukje DNA dat uniek is voor iedere species = 16S rDNA

Microbiota analyse (3)

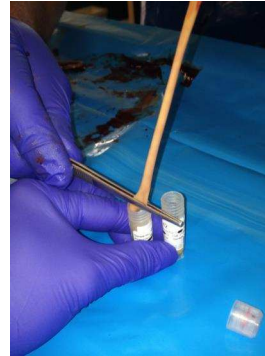
- 16S rDNA
 - Aanwezig in alle bacteriën
 - In alle species vergelijkbare sequentie, maar wel uniek voor iedere species



- 16S wordt gebruikt om samenstelling microbiota mee te bepalen

Microbiota analyse (4)

- Verzamelen materiaal
 - Darminhoud jejunum
 - Darminhoud ileum
 - Darminhoud colon (faeces)
 - Vaginaal swabs
 - Melk / biest
- Materiaal direct invriezen -80°C
 - Verhouding bacteriën cruciaal → fixeren door lage temperatuur



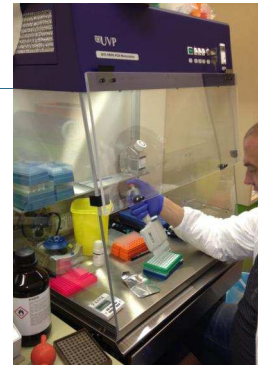
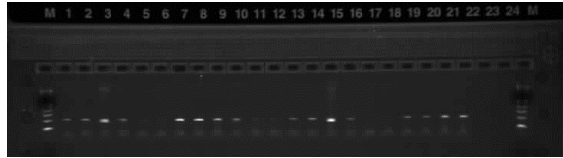
Microbiota analyse (5)

- Materiaal verdunnen en wassen om grove resten voedsel / vezels te verwijderen
- Bacteriën openbreken met behulp van speciale glaskorrels en een FastPrep
- Bacterieel DNA isoleren met behulp van DNA-isolatie kit

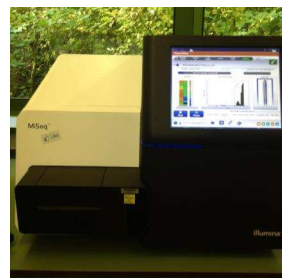


Microbiota analyse (6)

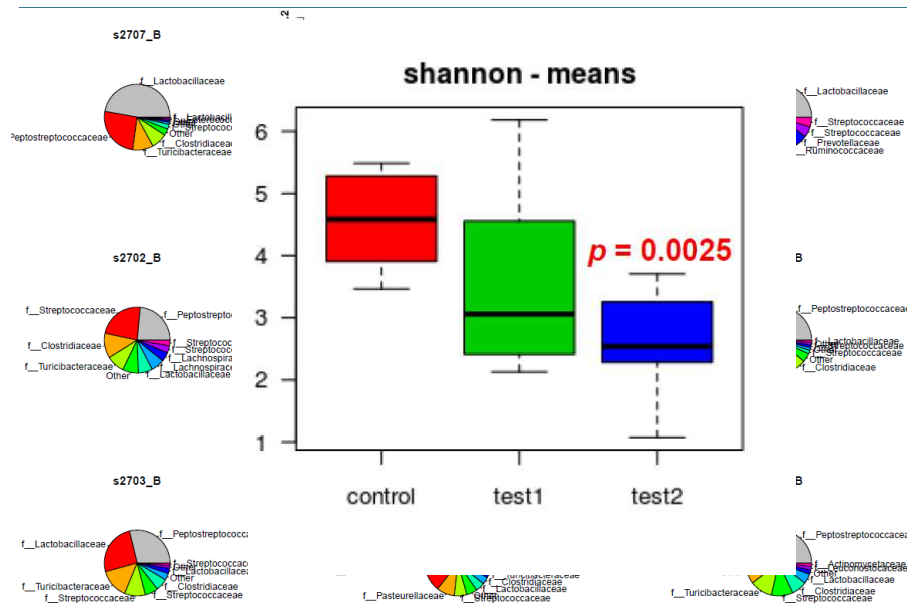
- 16S rDNA specifiek vermeerderd (PCR)



- Materiaal zuiveren in kabinet
- Sequenzen MiSeq (CVI)
 - 20 samples per run
 - Kosten per run ~ €3300
 - Duur run ~ 24 uur

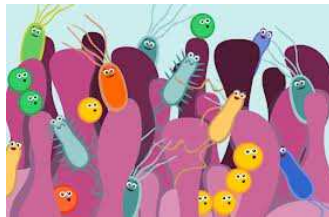


Microbiota analyse (5)

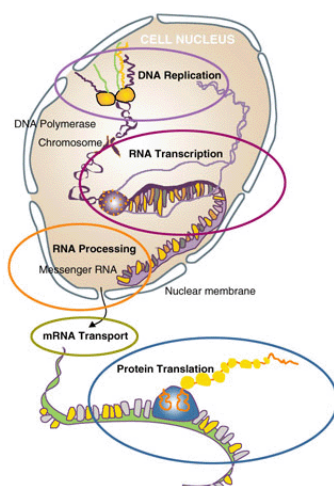


Microbiota analyse (7)

- Analyse kan heel tijdrovend zijn
 - Afhankelijk van vraagstelling
 - Afhankelijk van resultaat
 - Afhankelijk van onderzoeker
- Standaard 'pipeline' analyse altijd inbegrepen in kosten
- Aangepaste analyse naar de wensen van het onderzoek
 - extra uren bio-informaticus



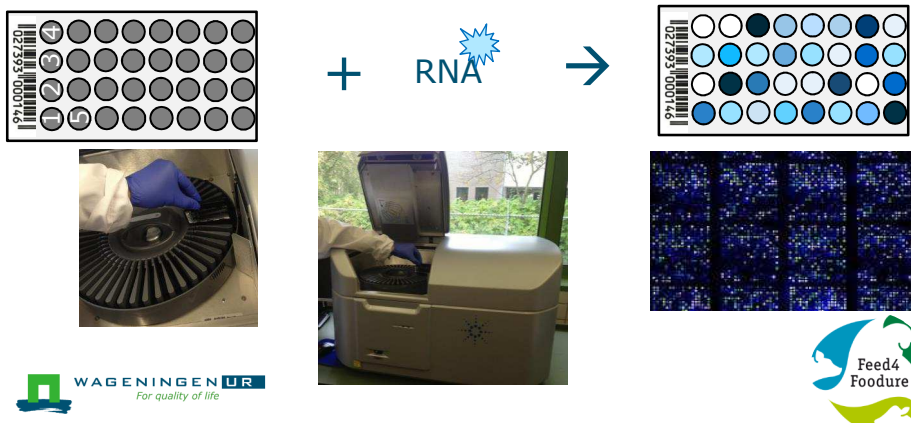
Genexpressie analyse (1)



- DNA zit in alle cellen, 2 kopiën van ieder gen
 - RNA zit ook in alle cellen, maar de hoeveelheid varieert naar de behoefte van de cel
 - Na het eten → meer insuline nodig → meer RNA coderend voor insuline
- RNA is een maat voor de status van een cel op een zeker moment

Genexpressie analyse (2)

- Microarray = methode om van alle genen (~ 60.000) van het dier te kijken hoeveel RNA er aanwezig is
- RNA een kleur geven
- Kijken hoeveel er van ieder gen is



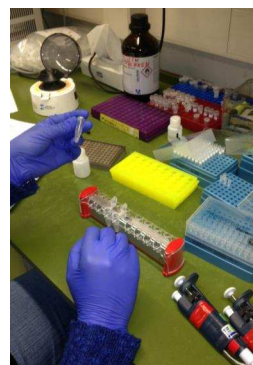
Genexpressie analyse (3)

- Verzamelen materiaal
 - Darmschraapsel → verzamelt mucosa maar niet de spierlaag
- Materiaal direct invriezen -80°C
 - Celprocessen stil leggen → status van cel op moment van sectie 'bevriezen'
 - Afbraak RNA voorkomen

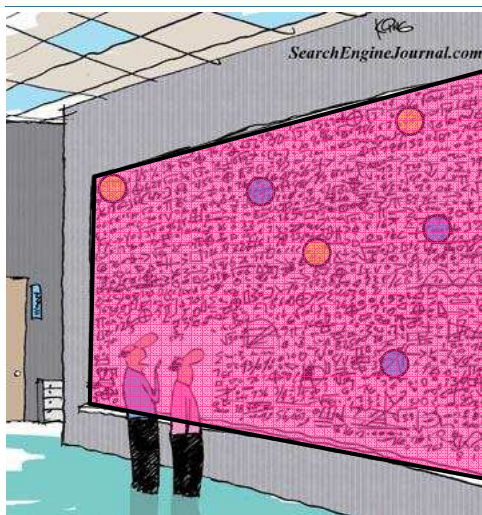


Genexpressie analyse (4)

- Verzamelde darm-materiaal homogeniseren
- RNA isoleren m.b.v. commerciële kit
- Kwaliteitscontrole
 - Concentratie
 - Integriteit
- Als OK → array



Genexpressie analyse (5)



Mogelijkheden:

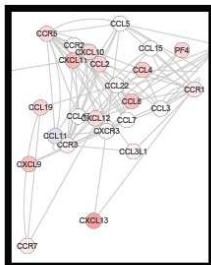
- Kijk naar expressie van genen die je verwacht (immuunogenen, insuline,) ●
- Kijk naar zeer grote veranderingen in genexpressie tussen groepen dieren ●

→ **Praat met een bioinformaticus** → 

Vertaling van resultaten naar biologische processen (bv darmintegriteit)

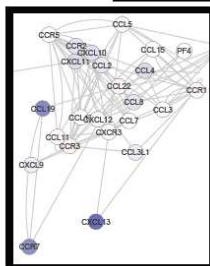
Genexpressie analyse (6)

Behandeling 1

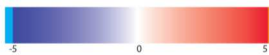
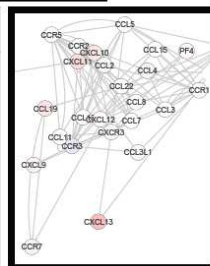


- cytokine expressie verschilt tussen de groepen dieren ten gevolge van de interventie
- Langzame en/of onvolledige opbouw van het communicatiesysteem van de immuuncompetentie

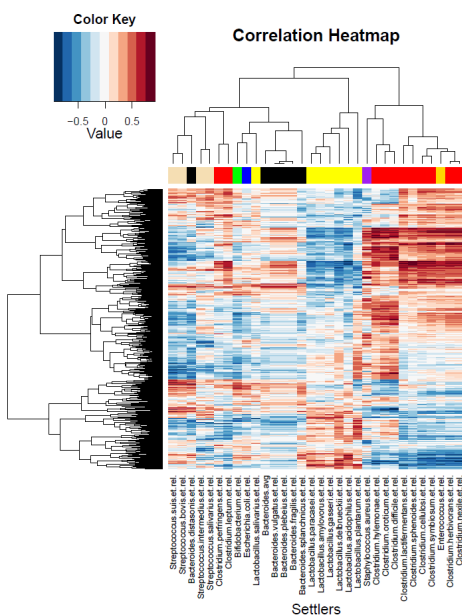
Behandeling 2



Behandeling 3



Genexpressie analyse (7)



- Er is een relatie tussen de expressie van immuun-gelateerde genen en de aanwezigheid van bepaalde microorganismen in de microbiota.
- Er is dus een relatie tussen aanwezigheid van bepaalde bacterie-soorten in de darm en een goede ontwikkeling van immuun-competentie
- Wellicht kan er gericht gestuurd worden op deze bacterie-soorten d.m.v. voersamenstelling

Immune system process genes



Het moeilijkste komt nog..... (in 2014)

