

Alternatieven voor antibiotica

Acht essays

Inhoud

Voorwoord 4

1. Magic bullets 7
2. Snelle diagnostiek en smal-spectrum antibiotica 23
3. Antibacterial vaccines 35
4. Bacteriophages 53
5. Fytobiotica 73
6. Farmacologische antimicrobiële strategieën 89
7. Een immunologische visie 103
8. Een veterinair perspectief 121

De auteurs 139

Voorwoord

Gezondheid van mens en dier is een groot goed. In het algemeen gesproken kunnen we in Nederland met de huidige gezondheidszorg de meeste ziekten en kwalen met vertrouwen te lijf gaan. Antibiotica spelen hierbij een belangrijke rol. Helaas kunnen ziekmakende bacteriën ook een resistentie ontwikkelen tegen deze antibiotica.

In de humane gezondheidszorg is in Nederland, samen met de Scandinavische landen, het strikte beleid ingevoerd om zeer terughoudend te zijn met het gebruik van antibiotica. In deze regio zorgt de zogenoemde ziekenhuisbacterie (ofwel MRSA, methicilline resistente *Staphylococcus aureus*) dan ook sporadisch voor problemen in ziekenhuizen. We vrezen echter (ook mondiaal gezien) een doorzettende resistentieontwikkeling van ziekmakende bacteriën tegen antibiotica.

Waarschijnlijk speelt het antibioticagebruik in de dierhouderij een belangrijke rol bij de ontwikkeling van antibioticaresistentie. Alhoewel het gebruik van antibiotica als groeibevorderaar in diervoeders sinds 2006 in de Europese Unie definitief verboden is, neemt de laatste jaren het preventief en therapeutisch antibioticagebruik in de dierhouderij nog steeds toe. Dit werkt antibioticaresistentie in de hand. De toenemende resistentie in de dierhouderij kan meewerken aan de antibioticaresistentie in de humane gezondheidszorg.

De gedachte dat bacteriële infectieziekten bij dieren en mensen in de toekomst steeds minder effectief behandeld kunnen worden als gevolg van toenemende antibioticaresistentie, dwingt ons nu al de zoektocht naar en ontwikkeling van alternatieven voor antibiotica te starten.

De minister van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) heeft, in afstemming met de minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS), eind 2007 een beleidsstrategie opgesteld om het antibioticagebruik en de antibioticaresistentie in de dierhouderij daadwerkelijk te beheersen en terug te dringen. Dierhouders, dierenartsen en producenten van antibiotica worden aangespoord hun verantwoordelijkheid te nemen om te komen tot een verantwoord en terughoudend gebruik van diergeneesmiddelen. Verder worden maatregelen aangekondigd die leiden tot een duurzame dierhouderij met gezondere en weerbare dieren waar gebruik van antibiotica tot een minimum beperkt kan worden. Maar het gaat ook om monitoring en

registratie van het gebruik, aanpassing van de receptplicht, bewustwording en ten slotte onderzoek en innovatie.

Als ministerie van LNV vinden we het erg belangrijk naar totaal nieuwe innovatieve mogelijkheden te zoeken die de afhankelijkheid van antibiotica sterk kunnen verminderen. Met dat doel financiert LNV onderzoek naar het ontwikkelen van alternatieven voor antibiotica voor therapeutische toepassing in de dierhouderij. LNV wil hiermee kennisinstituten, onderzoeksinstituten en bedrijfsleven stimuleren om gezamenlijk kennis te ontwikkelen en innovatietrajecten te starten die leiden tot één of meer goed bruikbare alternatieven voor antibiotica.

Maar welke kennis is nodig en welke innovatietrajecten bieden perspectief? Om dat eerst te achterhalen, is LNV te rade gegaan bij Nederlandse en Belgische wetenschappers en onderzoekers die hun sporen op dit gebied hebben verdiend.

Deze bundel verzamelt acht beschouwingen en visies op perspectiefvolle alternatieven voor antibiotica; beschouwingen vanuit verschillende wetenschappelijke disciplines uit zowel de humane als veterinaire gezondheidszorg. Elke auteur beschouwt vanuit zijn of haar discipline wat de meest perspectiefvolle alternatieven voor antibiotica zijn.

Inmiddels heeft LNV al dankbaar gebruik gemaakt van deze beschouwingen en visies. Op basis van deze kennis en visies was het mogelijk om het nieuwe kennisontwikkelings- en innovatieprogramma 'Alternatieven voor Antibiotica' (ALTANT) te voeden met potentiële ontwikkelingslijnen. Per 2009 is de eerste fase van dit programma van start gegaan met drie ontwikkelingslijnen.

Met deze bundel wil ik u deelgenoot maken van de beschouwingen en visies van de acht auteurs. Het biedt u waardevol inzicht in meerdere perspectiefvolle alternatieven voor antibiotica of in onverwachte aanknopingspunten voor de wijze waarop bacteriële ziekteverwekkers aangepakt kunnen worden. Mogelijk zijn de beschouwingen ook een inspiratiebron voor u in uw werkzaamheden.

mr Hans Hoogeveen,
Directeur Generaal
Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

Magic bullets

Inleiding

Het zal inmiddels geen nadere uitleg behoeven dat het veelvuldig en ongenueanceerd gebruik van antibiotica, wereldwijd, een ongewenste en gevaarlijke antibioticaresistentie bij ziekteverwekkers voor mens en dier tot gevolg heeft gehad. Dit heeft zelfs geleid tot het luiden van de noodklok door bijvoorbeeld de Infectious Disease Society of America (bad bugs need drugs) en het opstellen van een “antimicrobial availability taskforce (Bad Bugs no Drugs, cf Talbot)”. Bovendien zijn er nog een aantal andere effecten die door veelvuldig antibiotica gebruik kunnen optreden en ook ongewenst zijn (dit essay). Bij het ontwikkelen van alternatieven zal dus niet alleen naar het korte termijn effect – het terugdringen van MR organismen – gekeken moeten worden maar ook naar lange termijn effecten op met name darmgezondheid en ongewenste afweerreacties zoals bijvoorbeeld astma en eczeem. In dit hoofdstuk willen we nieuwe mogelijkheden beschrijven in het licht van de delicate immunologische balans tussen reageren en tolereren en de invloed van bacteriën -en dus antibiotica- op dit evenwicht. Hierdoor zullen de voorwaarden die gesteld worden aan antibiotica voor acuut of voor chronisch gebruik anders zijn en dit heeft weer gevolgen voor de ontwikkeling en het gebruik van selectiemethodieken voor nieuwe kandidaat moleculen/methoden.

Reductie, monitoring, surveillance en management strategieën

Een belangrijk aspect van de problematiek van de wereldwijde verspreiding van antibioticaresistentie is het ontbreken van snelle en goedkope diagnostiek om deze resistentie op te sporen. Zonder daar in detail op in te gaan

willen we hier met name aandacht vragen voor de snellere ontwikkeling van “point of care” diagnostiek waardoor onmiddellijk dreigingen opgespoord en dus transmissie gestopt kan worden. Nederland is traditioneel sterk in ontwikkeling van de ‘biologische interface’ voor diagnostiek [1] maar ook de ontwikkeling van nieuwe snelle en goedkope (bio)sensoren is in ons land prima mogelijk [2]. Met de bestaande methodiek van opsporing voor antibiotica resistente organismen is het erg belangrijk om in globaal perspectief aangehaakt te zijn. Hoewel Nederland in ECDC en niet gouvernementele organisaties (NGO’s) als WHO/OIE/VN/FAO, Wereldbank etc. een belangrijke gidsland functie blijft vervullen is er géén optimale terugkoppeling met het primaire proces (in casu het wetenschappelijk onderzoek) of met de nationale industriële productontwikkeling [3]. We doelen hier niet op een praatclub maar een echte innovatiemotor voor deze problematiek, eventueel uit te breiden met soortgelijke kwesties bij bijvoorbeeld pandemische influenza. Immers de kans dat infectieziekten vele duizenden, onnodige, doden gaan veroorzaken is vele malen groter dan een watersnood door dijkbreuk! Equivalente politieke aandacht en fondsen zijn hier dan ook terecht (vgl eerdere uitspraken prof. Osterhaus).

Diagnostiek, monitoren en uiteindelijk een gedegen surveillance strategie hebben alleen maar zin als er ook alternatieven geboden kunnen worden. Enerzijds zullen die liggen in nieuwe bacteriocide of bacteriostatische geneesmiddelen anderzijds zullen die moeten liggen in hygiëne en management strategieën op het niveau van het primaire proces. Op dit punt is Nederland nu al in de ‘best in class’ en die functie zou met nadruk en investering verder uitgebouwd kunnen worden [4]. Denk hierbij ook aan incentives op individueel- zowel als op ziekenhuisniveau en preciaire zaken zoals opsporen en begeleiden ‘dragers’ van MR organismen onder gezondheidswerkers en ziekenhuispersoneel.

Evaluatie van antibiotica in vitro is meestal simpel en eenduidig. Door verschillende doses antibiotica toe te voegen aan bacteriën, wordt de dosis bepaald waarbij de eerste bacteriën gedood worden, de zogenaamde minimaal inhiberende concentratie (MIC). Deze methodiek is traditioneel en geaccepteerd door wetenschap, industrie en regelgevers (FDA/EMEA) als ‘gouden standaard’. Echter doordat de methode niet vergelijkbaar is met het biologische ecosysteem waarin het antibioticum werkzaam moet zijn; de mens, is de voorspellende waarde van de MIC bepaling slechts beperkt. Zeker wanneer alternatieve mechanismen worden geactiveerd om indirect de bacteriën te stoppen of te doden kan de MIC niet gebruikt worden om in vivo activiteit te voorspellen [5]. De ontwikkelingsregulering voor antibiotica door de autoriteiten is conservatief en langzaam, waardoor nieuwe antibiotica een lang ontwikkelingstraject moeten doorlopen [6]. Daarnaast staat voor de farma-industrie de ontwikkeling van nieuwe antibiotica niet

bovenaan de agenda, omdat de behandeling slechts enkele dagen duurt en er massaal wordt ingezet op 'blockbuster-drugs' en ziekten die levenslang behandeld moeten worden [7]. Dit alles heeft ertoe geleid dat de laatste 40 jaar slechts 2 antibiotica op de markt zijn gekomen met een daadwerkelijk nieuw werkingsmechanisme. Als dit niet verandert is het uitbreken van de volgende epidemie of zelfs pandemie (van multiresistente bacteriën) slechts een kwestie van tijd.

Al met al is het dus vijf voor twaalf, de vraag is echter hoe we op een effectieve manier de medicijnen met nieuwe werkingsmechanismen kunnen selecteren. Voor de klassieke chemische antibiotica met directe activiteit tegen de micro-organismen, kan de aloude MIC worden bepaald. Er zal echter een additionele evaluatie moeten plaatsvinden om de stoffen met een nieuw werkingsmechanisme te identificeren. Als er geen nieuw werkingsmechanisme verbonden is aan de nieuwe stof zullen zoals nu reeds gebeurt de eerste resistente stammen al aanwezig zijn voordat het antibioticum op de markt verschijnt. Ontwikkelingen om nieuwe werkingsmechanismen te herkennen zijn reeds in volle gang, bijvoorbeeld door screenings technologieën die nieuwe werkingsmechanismen van reeds bekende mechanismen kunnen onderscheiden. Deze zogenaamde antibiotica chips waarop alle genen van een geselecteerd micro-organisme aanwezig zijn worden gebruikt om nieuwe middelen te vergelijken met bekende klassen, waardoor een extra dimensie wordt toegevoegd aan het selectie proces.

Middelen die niet direct op de bacteriën aangrijpen, maar bijvoorbeeld de afweer tegen bacteriële infecties versterkt zullen op andere manieren moeten worden getest. Het grote voordeel van deze middelen zal echter zijn dat er nog geen resistentie is en dat deze zich hoogst waarschijnlijk ook niet zal ontwikkelen, dan wel dat het lichaamseigen immuunsysteem nieuwe resistentie weer kan aanpakken [8]. Voor deze middelen zijn in vivo infectie modellen onmisbaar, echter veel van de huidige infectiemodellen worden uitgevoerd onder immunosuppressieve omstandigheden, wat natuurlijk niet geschikt is voor deze klasse van middelen. Hier dienen dus ook aanpassingen te worden gemaakt aan de selectie en screenings methoden die door de ontwikkelaars worden gebruikt [9].

Ook artsen dienen zich bewust te zijn van hun mogelijke bijdrage. Hoewel Nederland internationaal bekend staat als een antibiotica conservatief land met wereldwijd de laagste penetratie van bacteriële resistentie, bijvoorbeeld gemeten aan de hand van het aantal MRSA infecties, is er wereldwijd nog veel te winnen. Gelukkig worden in ziekenhuizen steeds meer programma's ter vermindering van antibiotica gebruik opgezet, maar het (wereldwijd) persistent gebruik in dieren en diervoeding en het bespuiten van groente en fruit staat een stuk minder in de belangstelling. De 'goedkope' antibiotica die gebruikt worden hebben een directe bijdrage aan

resistentie ontwikkeling. Het is nog onduidelijk hoeveel van deze effecten uiteindelijk (via de voedselketen) ook daadwerkelijk in de mens eindigen. Al met al kunnen we dus stellen dat er een maatschappelijke verantwoordelijkheid zou moeten zijn, waarbij de beleidsmakers een significante bijdrage kunnen leveren aan zowel het bewustmakingsproces als mede het stimuleren van beperkingsmaatregelen en aan de andere kant het stimuleren van antibiotica ontwikkelingsprogramma's. Alleen in de balans van 'verbieden' versus 'alternatieven' zal dit probleem wereldwijd opgelost kunnen worden. De verschrikkelijk lage prijs van antibiotica is daar een serieus probleem. Mede daardoor heeft de farmaceutische industrie, terecht, een relatief lage interesse in het oplossen van de problemen (cf absolute prijs van nieuwe clinical trials die in de honderden miljoenen per product loopt [10]). Daarom ligt dus ook bij de overheden een belangrijke verantwoordelijkheid om deze handschoen op te pakken.

Antibiotica, Darmgezondheid en Allergie

In de darm leven ongeveer 10^{14} bacteriën (honderd-duizend-miljard) oftewel zo'n 1 tot $1\frac{1}{2}$ kilo in een gezond volwassen mens, de darminhoud is gedeeltelijk gewoon buitenwereld omdat het slijmvlies en epitheel van de darmwand slechts selectief stoffen en deeltjes naar binnen laat. De normale barrièrefunctie van de darm werkt uitstekend behalve bij bijvoorbeeld een breed spectrum antibioticumbehandeling. Hierbij verdwijnen ook vele van de 'vriendelijke' commensalen en daardoor krijgen ziekteverwekkers zoals met name Clostridium een kans om zich te vestigen en/of vermenigvuldigen in de openliggende ecologische niche. Vervolgens beschadigen de toxinen de onderliggende cellen, hetgeen meestal resulteert in waterige ontlasting. Bovendien kan er extravasatie van bloedcellen optreden en, in omgekeerde richting, invasie van bacteriën en toxinen naar de bloedbaan. Hierdoor kunnen voedselantigenen in direct contact komen met het immuunsysteem en kunnen allerlei allergieën ontstaan. Beschadiging van de darm mucosa zien we bijvoorbeeld ook bij psychologische stress, slechte voeding, dehydratie en extreme duursporters. Ook hier gaat dit vaak hand in hand met eerst diarree en later allerlei allergieën gericht tegen voedingscomponenten uit het darm lumen, waar men normaal gesproken tolerant voor is. Uit recente Canadese studies bij meer dan achtentwintigduizend personen is duidelijk gebleken dat veelvuldig antibioticagebruik op jonge leeftijd een aanzienlijke toename van astma, later in het leven gaf [11]. Recent is ook een duidelijke relatie gelegd tussen onze levende darmbewoners, zoals bacteriën, parasieten, schimmels, virussen en de algehele gezondheidsstatus van ons lichaam ('old friends theorie'). Nieuwe antibiotica zullen dus ook op dit niveau tegen het licht gehouden moeten worden.

Pre- en probiotica: synbiotica

Het is al langere tijd bekend dat nabehandeling (na bijvoorbeeld antibioticagebruik) met melkzuurbacteriën, de diarree en eventuele overgroei met

Clostridium kan remmen en/of voorkomen. Recent is uit gerandomiseerde dubbelblinde, placebo-gecontroleerde en cross-over humane studies ook aangetoond dat met sommige probiotische melkzuurbacteriën de intestinale barrièrefunctie gestabiliseerd kan worden waardoor de permeabiliteit/lekkage weer verdwijnt en de gastro-intestinale symptomen verminderen. Bovendien is het al langere tijd bekend dat oplosbare voedingsvezels zoals die voorkomen in fruit, peulvruchten en specifieke ander groentewortels (zoals witlof), een sterk bifidogeen en dus darmgezondheidseffect kunnen hebben. Dit wil zeggen dat stoffen zoals Galacto- en Fructo-oligosacchariden (GOS & FOS; inuline) de groei van ‘gezonde’ bacteriën (old friends) bevorderen waardoor de ‘ziekteverwekkers’ minder kans tot uitgroei hebben. “Natuurlijke’ en ‘Biologische’ systemen zijn lastig te manipuleren maar bieden wel degelijk veel mogelijkheden in een totale strategie om ziekteverwekkende bacteriën af te remmen [12]. Vanzelfsprekend is dit dus ook belangrijk bij de voeding van het dier.

Nieuwe bacteriële doelen voor antibiotica vervangers

Zoals boven beschreven is er een grote behoefte aan het vinden en valideren van nieuwe antibiotica. Deze groep bevat zowel nieuwe chemische moleculen tegen onbekende bacteriële structuren, als biologische moleculen die aangrijpen op bacteriën en of het afweersysteem. Voor het identificeren van nieuwe chemische structuren gebruikt de farmaceutische industrie grote bibliotheken met miljarden verschillende stoffen die op grote snelheid wordt getest in een groot aantal systemen op microbiële activiteit. Dit concept is per definitie zelflimiterend en de resultaten van het afgelopen decennium bevestigen de intrinsieke beperktheid van de technologie. Kleine aanpassingen van bestaande moleculen geven weliswaar weer een paar jaar uitstel, maar de identificatie van nieuwe werkingsmechanismen is tot dusver uiterst beperkt gebleven.

Nieuwe ontwikkelingen lijken voornamelijk afkomstig van universitaire instellingen en biotechnologische bedrijven, die de platgetreden paden durven te verlaten en proberen de uitdaging aan te gaan voor het vinden van hopelijk langdurige oplossingen van het resistentie probleem. In ieder geval geldt hier het principe, hoe alternatiever, des te langer de verschillende middelen gebruikt kunnen worden. Verbreding leidt tot verlenging. Hieronder zullen in het kort enkele alternatieven de revue passeren [13].

Lantibiotics en bacteriocines zijn peptide moleculen die door bacteriën zelf worden geproduceerd en aangrijpen op de membranen van andere bacteriën. Een verder begrip van de structuur activiteitsrelatie van deze moleculen zal het mogelijk moeten maken om ze in te zetten tegen lokale infecties en wellicht zelfs systemisch. De humane homoloog van dit systeem is ook gevonden en heet antimicrobieel peptide. Deze peptide worden uitgescheiden door verschillende lichaamscellen en beschermen

tegen de voortdurende blootstelling aan micro-organismen in onze natuurlijke leefomgeving. Antimicrobiële peptiden kunnen ook nog andere functies vervullen, waaronder de activatie van een afweer reactie. In de volgende paragraaf zal dieper worden ingegaan op de antimicrobiële peptiden.

Bacteriën hebben net als eukaryoten een hormonaal systeem ontwikkeld waarmee cellen onderling kunnen communiceren. Dit systeem lijkt ook werkzaam tussen bacteriële cellen en eukaryote cellen, zoals bijvoorbeeld in de mens. In het Engels wordt dit aangeduid met quorum sensing en de verstoring van de communicatie door het wegvangen of inactiveren van de hiervoor gebruikte moleculen kan tot inactivatie van infectie leiden. Het gebruik van biologische moleculen als antilichamen wordt onderzocht op zijn toepasbaarheid om de quorum sensing te verstoren. Een beter begrip van dit soort communicatie netwerken is wel belangrijk om de verstoring dusdanig te dereguleren dat het ook het gewenste effect sorteert.

Nieuwe soorten voeding zijn in opkomst waaraan componenten zoals humaan lactoferrine zijn toegevoegd die een rol kunnen spelen bij de management van infecties. Lactoferrine remt de groei van een breed spectrum bacteriën en stimuleert juist de groei van bifidus bacteriën. Er zijn aanwijzingen dat juist voor patiënten die een verhoogd risico hebben op infecties (hele jonge of heel oude mensen of bijvoorbeeld mensen met een HIV-infectie) het gebruik van lactoferrine de frequentie en ernst van maag-darm infecties kan verminderen.

Op 'drager' niveau kunnen we denken aan zaken als foto-dynamische therapie om huidbacteriën van 'dragers' te doden en zodoende transmissie terug te dringen. Soortgelijke zaken moeten ook voor keel en neusholte dragers onderzocht worden[13]

Tenslotte zijn er verregaande ontwikkelingen in het gebruik van de bacteriofaag om specifiek de bacterie populatie te vinden en te doden. Bacteriofagen zijn kleine virussen die specifiek bacteriën infecteren. Zij brengen hun genetisch materiaal in de bacterie, waarin het vervolgens wordt geamplificeerd en leidt tot de secretie van nieuwe bacteriofagen. Van deze specifieke eigenschappen wordt gebruikgemaakt om antimicrobiële stoffen te brengen naar de bacteriën om deze vervolgens te doden. Het is een selectieve manier om bacteriën te bereiken en de eerste klinische data geven aan dat er zeker toepassingsmogelijkheden zijn (mits afweerreacties tegen deze virussen vermeden kunnen worden).

Activatie van het aangeboren immuunsysteem

Zoals hierboven reeds beschreven zijn antimicrobiële peptiden (AMP's) een reactie van de lichaamscellen op de aanwezigheid van bacteriën, met tot doel de bacteriën te elimineren. AMP's zijn evolutionair geconserveerd en

komen voor in alle eukaryoten. Over het algemeen zijn het korte peptiden met een netto positieve lading waardoor ze een interactie kunnen aangaan met de celwanden van bacteriën en schimmels die negatief geladen zijn. Er is een groot uiteenlopend aantal verschillende AMP's geïdentificeerd. Grofweg kunnen deze worden verdeeld in peptiden met een direct antimicrobiële en een indirecte immuun activerende activiteit. Verreweg het grootste aantal AMP's hebben een direct antimicrobieel effect waarvan de meeste aangrijpen op de membranen van de micro-organismen [14]. Het is bijvoorbeeld verbazingwekkend dat infecties van het oog slechts zelden voorkomen terwijl immuun cellen slechts heel beperkt in het oog voorkomen en er een voortdurende blootstelling is aan bacteriën. De aanwezigheid van antimicrobiële peptiden in het oog is dan ook aangedragen als belangrijkste beschermingsmechanisme van het oog tegen infecties. Hiermee zijn AMP erkend als onderdeel van het aangeboren immuunsysteem dat tot doel heeft een eerste barrière op te werpen tegen alle niet lichaamseigen stoffen. AMP's hebben een zeer locale werking en zijn daarom uitermate geschikt voor lokale toepassingen, bij systemische toepassingen blijken veel van de AMP echter toxisch, maar er zijn uitzonderingen, daarover hieronder meer.

AMP kunnen naast het directe dodelijke effect tegen bacteriën ook cellen van het immuunsysteem activeren. Met name granulocyten, fagocyten en monoccyten kunnen worden geactiveerd door antimicrobiële peptiden. Verhoging van cytokine en chemokine productie en fagocytose door aanwezige immuun cellen rondom de infectie zal de activatie status van het immuunsysteem verhogen en meer cellen aantrekken en activeren, zodat de infectie beperkt blijft en kan worden opgeruimd. De versterking van de normale reactie van het immuunsysteem door AMP's zou een belangrijke aanvulling kunnen zijn van de bestaande antibiotica. Een voorbeeld van een immuun activerend peptide is een peptide afkomstig van humaan lactoferrine, een molecuul dat onder andere voorkomt in cellen van het aangeboren immuunsysteem. De synthetische vorm van dit peptide, bestaande uit de eerste 11 aminozuren van lactoferrine, kan de immuunactivatie tegen een bacteriële infectie versterken. Daarbij is tevens aangetoond dat er geen toxische bijwerkingen zijn en dit peptide veilig kan worden toegediend tegen systemische infecties. Verdere ontwikkeling zal moeten aantonen of het peptide alleen, of samen met andere vormen van antibiotica een alternatief zal kunnen bieden voor de huidige behandelingsmethoden. Het is in ieder geval duidelijk dat de kans op resistentie ontwikkeling bij dit soort producten significant lager is dan bij de klassieke antibiotica.

In het algemeen is de activatie van het immuunsysteem een natuurlijke en attractieve methode om infecties te lijf te gaan. Het immuunsysteem herkent infecties met een beperkte set van receptoren die voorkomt op de

detector cellen van het immuunsysteem. Met name macrofagen, monocyten en dendritische cellen hebben meerdere van deze receptoren. De receptoren heten Toll-like receptoren (TLR's) en herkennen vaste patronen de "Pathogen-associated molecular patterns" of PAMP's. Deze patronen komen voor op pathogenen, zoals micro-organismen en de herkenning daarvan activeert het immuunsysteem. Ook hiervoor geldt dat er veel moleculen in ontwikkeling zijn om via deze receptoren de immunreactie tegen bacteriën te stimuleren. Voor al deze vormen van immunstimulatie is het van groot belang de balans te garanderen tussen activatie en overactivatie. Recente voorbeelden hebben aangetoond dat er altijd een gevaar op de loer ligt wanneer het immuunsysteem artificieel wordt gestimuleerd.

Activatie van het verworven immuunsysteem

Naast de activatie van het aangeboren immuunsysteem speelt natuurlijk ook het verworven immuunsysteem een rol. Hoewel deze arm van het immuunsysteem bij commerciële vaccins voornamelijk gebruikt wordt voor de herkenning en eliminatie van virale infecties, zijn er ook onderzoeken gaande naar de mogelijkheid tot vaccinatie tegen bacteriële en fungale infecties. Omdat de meeste bacteriën extracellulair voorkomen zijn de ontwikkelingen in dit veld voornamelijk gericht op de inductie van antilichamen tegen oppervlakte structuren op de bacterie en zijn toxines. Vele mogelijke kandidaat eiwitten worden onderzocht naar de geschiktheid om een permanente immunherkenning en -geheugen op te wekken. Samen met de vele adjuvantia en introductiemethoden die voorhanden zijn worden de vaccins getest in even zoveel modellen, of deze modellen voorspellend zijn voor de vaccinatie effecten in mensen zal uiteindelijk moeten blijken. Hoewel veel werk wordt verricht op de veterinaire toepassing van antibacteriële vaccinatie, lijkt de toepassing voor de humane markt verder verwijderd van een succesvolle introductie. Daarnaast is het doel van vaccinaties om infecties te voorkomen, dus dringt zich onmiddellijk de vraag op wie, wanneer waartegen gevaccineerd moet worden als het al mogelijk is, en natuurlijk wie dit gaat betalen (HPV discussie). Iedere oplossing brengt zo weer nieuwe problemen mee.

De kansen op succes voor het induceren van afweerreacties door middel van vaccinatie tegen intracellulaire bacteriën lijken door de natuurlijke functie van het verworven cellulaire immuunsysteem om intracellulaire pathogenen te herkennen groter. Deze vorm van behandeling wordt dan ook voor de mycobacteria zoals tuberculosis intensief onderzocht. Daarnaast speelt het verworven immuunsysteem natuurlijk ook een belangrijke rol ter preventie van schade door andere indringers, zoals bijvoorbeeld lichaamsvreemde peptiden en eiwitten. Het is met name deze tak van het immuunsysteem die chronisch gebruik van complexe moleculen of organismen moeilijk maakt doordat een specifieke antilichaam of cellulaire afweerrespons tegen het medicijn herhaald gebruik onmogelijk maakt. Dit fenomeen

is ook het grote struikelblok gebleken in recente klinische studies met de eerder genoemde bacteriofagen (virussen die specifiek bacteriën herkennen en aanvallen). Onderzoek naar methoden om specifiek een ongewenste afweerreactie te onderdrukken is dus niet alleen belangrijk voor reductie van allergie en auto-immuniteit (diabetes, rheuma, multiple sclerose etc) maar ook bij toepassing van veelbelovende antibioticavervangers.

Ontwikkelingspad voor AMP's

Het ontwikkelingspad voor AMP's is te onderscheiden in twee richtingen: allereerst de ontwikkeling van een topicale behandeling en ten tweede de systemische behandeling. De topicale behandeling in de vorm van een crème is relatief eenvoudig te ontwikkelen wanneer een peptide een sterke directe activiteit heeft tegen de bacteriën en schimmels. Toepassingen zouden o.a. kunnen worden gevonden in acne, schimmelnagels en huidinfecties. Wij zullen ons vooral richten op de systemische toepassingen. De voorwaarde voor verdere ontwikkeling is de stof na toediening geen toxische bijeffecten laat zien, wat gezien de herkomst van veel natuurlijk voorkomende peptiden niet vanzelfsprekend is. Er zijn reeds een aantal niet toxische varianten ontdekt en binnen bepaalde kaders lijkt het mogelijk synthetische peptide sequenties te bedenken en te genereren met een acceptabel profiel voor de beoogde toepassingen. Er zijn reeds methoden ontwikkeld om op grond van de sequentie van peptiden de activiteiten te voorspellen. Dit geeft de mogelijkheid om uit een grote bibliotheek van mogelijke peptiden, de peptiden met potentiële antimicrobiële en of immunoactiverende activiteit te selecteren. De vervolgstap is de validatie van activiteitsprofielen van deze peptiden. De voorspelling van een toxiciteitsprofiel is helaas nog niet mogelijk, maar deze vervolgstap zal slechts gemaakt worden met de meest potente peptiden. Een algemeen probleem in de ontwikkeling van AMP's is dat de testmethoden zowel in vitro als in vivo niet ontwikkeld zijn voor de biologische peptiden of eiwitten, maar voor de klassieke chemische antibiotica. Aanpassing en verbetering van de activiteit voorspellende selectiemethoden zou een belangrijke stap zijn voor een succesvolle screening van kandidaat peptiden.

Vervolgens moeten de ziektemodellen voor infecties worden verbeterd of aangepast, zodat ze daadwerkelijk gericht zijn op de effectiviteitsbepaling van het AMP. Voor immunoactiverende AMP's is bijvoorbeeld een immuundeficient dierenmodel, zoals gebruikt voor standaard antibiotica, niet geschikt. Ten slotte zullen na uitvoerige toxiciteitsbepalingen de geselecteerde peptiden moeten worden getest in de mens. Dit lijkt een eenvoudige stap, maar de financieringspositie van het bedrijf wat de ontwikkeling van de peptiden heeft gestart is hiervoor de limiterende factor. Hier ontstaat de bekende Catch 22; de antibiotica ontwikkeling vereist een uitgebreide klinische evaluatie. Echter de peptiden zijn voor 99% ontwikkeld in biotech bedrijfjes met een zeer smalle financieringsbasis, die niet toelaat de vereiste

klinische ontwikkeling in te zetten. De kosten hiervoor lopen in de tientallen miljoenen. De farma bedrijven die hier wel de budgetten voor hebben, zijn sceptisch en conservatief t.o.v. nieuwe stoffen die afwijken van het bekende concept. Zij willen pas praten wanneer de klinische effectiviteit is vastgesteld. Dit lijkt dus het kerkhof te worden voor nieuwe antimicrobiële medicijnen en totdat er een brug gebouwd is tussen potentie en effectiviteit zullen veel nieuwe stoffen tussen wal en schip verdwijnen. Wellicht zou een publiek-privaat programma tussen farma bedrijven en overheden de risico's dragelijk maken en de kansen op echte nieuwe antibiotica verhogen.

Gezonde vetzuren een duivels dilemma

Meervoudig onverzadigde vetzuren (MOVZ of PUFA) zijn goed voor hart, bloedvaten en immuunsysteem. Hoewel de mechanismen waarmee vetzuren de immuuncel functie beïnvloeden nog niet helemaal duidelijk zijn, is wel evident dat 'goede' vetzuren, zoals Ω -3, en de prostaglandines die daaruit voortkomen, zeer heilzaam zijn voor het stoppen en onderdrukken van ongewenste immuniteiten (ref Kraal). Als meer omega(N)-3 vetzuren aan het dieet worden toegevoegd, bijvoorbeeld uit visolie, is dit te merken aan de immuunrespons gedurende een ontsteking. Als N-3 vetzuren in de celmembraan worden verwerkt, gebeurt dit ten koste van arachidonzuur (AA) dat afkomstig is uit N/ Ω 6-vetzuren. Doordat er minder AA aanwezig is voor de productie van prostaglandine-2, worden andere, minder potente, vormen aangemaakt uit de prostaglandine-3 en leukotriene-5-series. Er is een directe lineaire relatie: hoe meer EPA/DHA afkomstig uit Ω -3 in de celmembraan des te minder arachidonzuur en dus minder prostaglandine-2 hetgeen minder ontstekingscellen geeft. Zowel DHA als EPA in de celmembraan van macrofagen en monocytten vermindert bovendien de productie van bekende ontstekingsmediatoren. Bij personen met een ongewenste immuunrespons (huidallergie, asthma, rheuma etc) geeft dit dus een betere klinische uitkomst; een directe relatie tussen voeding en ontstekingsremming. We noemen dit een anti-inflammatoir effect. Echter: bij de bestrijding van ziekteverwekkers is een pro-inflammatoir profiel in eerste instantie een betere uitgangspositie om het pathogeen op te sporen en te elimineren en zou dus een inname van meer (relatief ongezonde) Ω 6 vetzuren gewenst zijn. N.B. Vlees afkomstig van dieren die N-3-rijke voeding hebben gekregen kan meer N-3 bevatten dan gekweekte vis die deze voeding niet heeft gehad. Dit maakt een verstandige keuze van bronnen voor Ω -3-vetzuren erg belangrijk ('gezond' varkensvlees bij voeren van vismeel versus vegetarische 'magere' kweekvis) [12].

Valorisatie, IP consortia and publiek-private samenwerking

Valorisatie heeft met name te maken met de feitelijke impact van kennis op de maatschappij. Een belangrijke bijdrage hieraan wordt gegeven door de kennisinstellingen, mits van excellente kwaliteit, die met de productie van

kennisclaims, onderwijs en training een eerste aanzet tot valorisatie geven. Echter Nederland loopt nog steeds achter op het omzetten van deze kennis in tastbare producten en geneesmiddelen. Recent hebben we nieuwe methoden van publiek private samenwerking geïntroduceerd waarbij met name de academische vrijheid gecombineerd kon worden met innovatieve versnelling in nauwe samenwerking met de industrie (IP consortia). Ook de vorming van zogenaamde 'patent-pools' (cf simon & claassen) maakt dat belangrijke en beschermde academische en industriële kennis sneller en beter voor 'public-health' zaken ter beschikking kan komen. Meer onderzoek naar optimalisatie van publiek-private samenwerking en academische vrijheid versus intellectueel eigendom bescherming is dan ook een belangrijk onderwerp voor de BV Nederland in het algemeen en antibiotica onderzoek in het bijzonder.
Op naar een Deltaplan infectieziekten!

Wishlist Onderzoek

- 1 Biologische interface ontwikkeling voor snelle en goedkope tests (eiwit, suikers en DNA/RNA)
- 2 Snelle en goedkope hardware voor detectie antibiotica-gevoeligheid en/of resistentie (bv 'hand-held' biosensoren)
- 3 Taskforce (met middelen) voor versnellingsoverleg primaire proces/ industrie NGO's en Nederlandse beleidsondersteuners
- 4 Ontwikkelen en stimuleren hygiëne, en outbreak-management-strategieën in hele keten (ook pre-klinisch)
- 5 Ontwikkeling in vivo correlaten van effect (o.a. voor MIC) en werkzaamheid (zebravis)
- 6 Beïnvloeding EMEA mbt accepteren nieuwe testen voor toelating antibiotica-(vervangers/mimetica/ etc.)
- 7 Incentiveren farma en biotech industrie voor productontwikkeling (vgl met weesgeneesmiddelen...)
- 8 Inzetten lichaamseigen verdediging (bv immuun-systeem) voor eradicatie in vivo
- 9 Uitwerken en valideren betaalbare, praktische in vivo infectiemodellen voor zowel proefdieren als humane vrijwilligers
- 10 Optimalisatie 'clinical trials'
- 11 Optimalisatie darmgezondheid voor/tijdens en na antibiotica-gebruik
- 12 Relatie en gebruik voeding en darmgezondheid (barrière functie) en intern microbiëel milieu op darmniveau
- 13 Karteren, prioriteren en financieren van bekende 'alternatieve' benaderingen en moleculen.
- 14 Methoden en moleculen om 'dragers' uit transmissie keten te halen
- 15 AMP's met directe bacteriostatische of bacteriocide activiteit

- 16 AMP's met immuunstimulerende activiteit en 'indirecte' antibacteriële effecten
- 17 Mogelijkheden voor actieve vaccinatie
- 18 Mogelijkheden voor passieve vaccinatie
- 19 Toepassingen voor natuurlijke immunosuppressie en immuunstimulatie in balans infectie/kanker enerzijds en allergie/auto-immuniteit anderzijds
- 20 Onderzoek naar in vitro correlates of in vivo bescherming tegen infectie of transmissie
- 21 Vormen van IP consortia

Snelle diagnostiek en smal-spectrum antibiotica

Inleiding

Infectieziekten hebben in de geschiedenis van de mensheid altijd een zeer belangrijke rol gespeeld en vormen één van de grootste (zo niet de allergrootste) doodsoorzaken bij mens en dier. Door de ontdekking van antibiotica in de vorige eeuw en het grote succes van hun toepassing leek dit probleem voor enkele decennia goed beheersbaar en zelfs uitroeibaar. Rond 1970 bestond inderdaad het idee dat met de op dat moment beschikbare antibiotica de grote bedreiging van infectieziekten verdwenen was. Dit leidde er onder meer toe dat de grote farmabedrijven zich terugtrokken uit dit veld waardoor de ontwikkeling van nieuwe antibiotica sterk onder druk kwam te staan. Tegelijkertijd nam het fenomeen van antibioticumresistente bacteriën sinds die tijd sterk toe, wat misschien wel het duidelijkst geïllustreerd wordt door de opkomst van de “methicilline resistente *Staphylococcus aureus*” (MRSA). De vraag die we ons moeten stellen is hoe we kunnen leren van de geschiedenis en hoe we de lessen die hieruit afgeleid kunnen worden, kunnen vertalen naar een nieuwe aanpak die tot een sterke vermindering van problemen leidt. In dit essay zullen we aan de hand van het MRSA voorbeeld laten zien wat de gevolgen zijn van ongecontroleerd gebruik van antibiotica, welke alternatieve behandelwijzen er zijn en hoe die geïntroduceerd kunnen worden. In algemene zin valt op dat er betrekkelijk weinig verschillen zijn tussen antibioticumgebruik bij de mens en in de veehouderij. Dit essay zal dan ook besluiten met hoe te komen tot een alternatief voor het huidige gebruik van antibiotica in de veehouderij

Oorzaken antibiotica resistentie

Al snel na de ontdekking van antibiotica werd duidelijk dat bacteriën die gevoelig zijn voor een bepaald antibioticum in staat zijn resistentie

hiertegen op te bouwen. Deze resistentie kon in het laboratorium worden aangetoond door grote aantallen bacteriën bloot te stellen aan antibiotica en ook bij gebruik in patiënten bleek al snel resistentieontwikkeling op te treden. Er zijn een groot aantal mechanismen beschreven die verantwoordelijk zijn voor de ze resistentie ontwikkeling waarbij grofweg twee categorieën kunnen worden onderscheiden:

- Intrinsiek: aanpassingen in een bacteriecel, zoals veranderingen in het DNA (bijv. resistentie tegen quinolonen door puntmutaties in specifieke genen) of aanpassingen in de fysiologie (bijv. vancomycine resistentie in *S. aureus* door celwandaanpassingen: dit lijkt adaptatie maar er zijn ook veranderingen op DNA-niveau gevonden) leiden tot het ontstaan van een resistente cel. Continue selectiedruk met het betreffende antibioticum zorgt daarna voor een selectief voordeel voor deze cel boven gevoelige cellen. Deze fenomenen treden vaak met lage frequentie op, bieden in een antibioticum-vrije omgeving geen selectief voordeel (vaak zelfs een nadeel) en kunnen dus alleen blijven bestaan door regelmatig en verkeerd gebruik van antibiotica. Intrinsieke resistentie is deels ook een natuurlijk fenomeen en wordt ook veelvuldig aangetroffen in bacteriën die nooit zijn blootgesteld aan antibiotica ontwikkeld door mensen (Martinez JL (2008) Science 321: 365-367).
- Extrinsiek: acquisitie van een resistentiegen door een gevoelige cel. Dit fenomeen kan zowel binnen een bacteriesoort optreden als tussen verschillende soorten. Bij deze extrinsieke resistentieontwikkeling spelen DNA-elementen zoals plasmiden, bacteriofagen en transposons een grote rol. Deze elementen zijn vaak in grote aantallen aanwezig in een cel, zijn gespecialiseerd in het binnendringen in andere cellen en zijn in staat zich exponentieel te verspreiden (vergelijkbaar met bepaalde virusinfecties in mensen). Zo ontstaat een MRSA bacterie door het overdragen van een zogenaamde *mecA* cassette van een resistente naar een gevoelige bacterie (zowel binnen de soort *S. aureus* als tussen verschillende soorten Staphylococci). Dit fenomeen van horizontale genoverdracht zou ook kunnen optreden in situaties waar grote aantallen bacteriën van diverse soorten dicht opeengepakt zitten (zoals in het colon van mens en dier).

Beide genoemde mechanismen dragen bij aan de ontwikkeling van antibioticumresistentie, maar de combinatie van beide mechanismen heeft een grote rol gespeeld bij de sterk versnelde resistentieontwikkeling in de afgelopen decennia. Resistentiegenen die intrinsiek ontstaan zijn, werden opgenomen in mobiele DNA-elementen die zich zeer snel konden verspreiden en vaak ook soortgrenzen konden doorbreken. Deze ontwikkeling heeft ertoe geleid dat er voor alle klassen van antibiotica resistentiemechanismen bekend zijn en dat die resistenties in hoge frequenties voorkomen in pathogene micro-organismen. Met name de combinatie van diverse resistentiemechanismen in 1 bacterie leidt tot grote zorgen: er zijn de

afgelopen jaren diverse meldingen gemaakt van bacterie-infecties in patiënten die niet of nauwelijks bestreden konden worden (met name multiresistente infecties met *Klebsiella*, *Pseudomonas* en *Acinetobacter* infecties). Het optimistische beeld dat infectieziekten beheersbaar en zelfs uitroeibaar zouden zijn is ondertussen volledig verdwenen en zelfs omgeslagen naar een pessimistische toekomstvisie waarin rekening wordt gehouden met een sterke toename van niet adequaat behandelbare infecties. Het is duidelijk dat het grootschalige en verkeerde gebruik van antibiotica een grote rol gespeeld heeft bij de snelle opkomst van antibioticumresistentie: de continue selectiedruk heeft de van nature altijd al laagfrequent voorkomende resistentiemechanismen zo sterk bevorderd dat dergelijke mechanismen in veel bacteriesoorten bijna standaard aanwezig zijn. Doordat er nauwelijks nieuwe antibiotica zijn ontwikkeld de afgelopen decennia biedt dit geen effectieve oplossingsroute. Hoe er wel aan een oplossing gewerkt kan worden zullen we hierna beschrijven.

Achtergrondkennis leidend tot een oplossingsrichting

Zoals al eerder genoemd vormt de MRSA bacterie misschien wel het bekendste voorbeeld van het groeiende probleem van antibioticumresistentie. Na de ontdekking van penicilline door Fleming in 1928 en het toenemende gebruik hiervan in mensen in de jaren 40 werd al snel duidelijk dat *S. aureus* penicilline resistent kon worden. In de zoektocht naar nieuwe antibiotica werd methicilline (al snel vervangen door het minder toxische oxacilline) als effectieve vervanger van penicilline ontdekt. Binnen 2 jaar (1961) werden de eerste MRSA bacteriën echter al aangetroffen. Aangezien dit incidentele observaties betrof werd oxacilline op grote schaal gebruikt voor het bestrijden van *S. aureus* infecties. Dit ging lange tijd goed maar in de jaren 90 begon resistentie een steeds groter probleem te worden (van 4% in 1991 tot 37% in 1999 voor wat betreft bloedinfecties in het Verenigd Koninkrijk) en in een groot deel van de wereld is tegenwoordig meer dan 50% van de *S. aureus* infecties bij mensen een MRSA. Toch kan het ook anders: ondanks de wereldwijde epidemie van MRSA is op dit moment de incidentie van MRSA in Nederland en Scandinavië minder dan 1%. Deze gevallen hebben dan ook nog vaak hun oorsprong in het buitenland. Er zijn grofweg twee verklaringen voor dit verschil tussen Noordwest Europa en de rest van de wereld: een zeer voorzichtig gebruik van antibiotica bij mensen in het algemeen en een gericht Search and Destroy beleid in ziekenhuizen voor wat betreft MRSA: patiënten die uit risicogebieden (lees buitenland) komen worden geïsoleerd en gescreend op aanwezigheid van MRSA. Pas als blijkt dat ze geen MRSA dragen of als een aanwezige besmetting behandeld is komen deze patiënten uit hun isolatie. Dit is een zeer effectieve strategie gebleken en hoewel deze aanpak zeer kostbaar en daarom nauwelijks of niet te realiseren is in de veterinaire sector kunnen hieruit wel lessen getrokken worden die ook toepasbaar zijn in de veterinaire praktijk. Ook

wat betreft antibioticumgebruik kan uit het verschil in voorkomen van MRSA in Noordwest Europa ten opzichte van de rest van de wereld een les worden geleerd: het overvloedige gebruik van antibiotica, ook bij niet nader gediagnosticeerde klachten (een koutje) leidt tot een continue blootstelling van bacteriën aan antibiotica en die selectiedruk zorgt er direct of indirect voor resistentie bevorderd wordt. Ook het gebruik van breed-spectrum antibiotica speelt hierbij een grote rol. Deze antibiotica zijn actief tegen een breed panel van micro-organismen. Vanuit de positie van de arts en de patiënt is het begrijpelijk dat bij onduidelijke klachten of problemen zonder bekende oorzaak voor alle zekerheid gebruik wordt gemaakt van dergelijke middelen (onder het motto: baat het niet, dan schaadt het ook niet), maar deze handelswijze vergroot eveneens de kans op resistentieontwikkeling, omdat niet alleen de infectieveroorzakende bacterie wordt blootgesteld, maar ook diverse andere bacteriesoorten. Daarom kan resistentieontwikkeling ook optreden in voor mens en dier onschuldige organismen, maar door overdracht via mobiele DNA-elementen uiteindelijk toch terechtkomen in pathogene micro-organismen. Alles bij elkaar lijkt resistentieontwikkeling dus een soort toevalstref-fer te zijn, waarbij de kans op zo'n treffer sterk wordt vergroot door het grootschalige gebruik van breed-spectrum antibiotica. Gezien de huidige situatie kan er alleen maar geconstateerd worden dat dergelijke toevalstref-fers zeer regelmatig hebben plaatsgevonden de afgelopen decennia. Tevens kan geconstateerd worden dat het voorzichtige gebruik van antibiotica in Nederland en een actief beleid voor controle en beheersing (Search & Destroy voor MRSA) wel degelijk effect kan hebben ondanks een wereld-wijde trend in een andere richting.

Situatie in de veehouderij

In de veehouderij worden antibiotica op grote schaal gebruikt. Lange tijd betrof dit niet alleen gebruik ter bestrijding van infecties, maar ook het gebruik van antibiotica als groeibevorderaar. Dit laatste (oneigenlijke) gebruik van antibiotica is al geruime tijd verboden, maar gebruik ter bestrijding van infecties vindt wel nog steeds plaats. Hierbij dient wel aangetekend te worden dat de antibiotica die gebruikt worden in de veehouderij niet voor humane toepassingen worden gebruikt. Gezien het feit dat de meeste antibiotica in een beperkt aantal klassen zijn in te delen wat betreft hun werkingsmechanisme, is het de vraag of dit onderscheid tussen antibiotica voor dierlijk en humaan gebruik veel bijdraagt aan het inperken van algehele resistentieontwikkeling. In veel gevallen blijkt een resistentiemechanisme dat is ontwikkeld voor het inactiveren van een specifiek antibioticum zich ook verder te kunnen evolueren waardoor andere antibiotica met eenzelfde werkingsmechanisme (langzamerhand) ook kunnen worden geïnactiveerd. Een voorbeeld uit de veehouderij waarbij dit fenomeen mogelijk is opgetreden is het vroegere gebruik van

avoparcine als groeibevorderaar (avoparcine lijkt sterk op vancomycine, het laatste redmiddel om mensen met MRSA te behandelen), maar ook bij klassen zoals aminoglycosiden en quinolonen speelt het verschijnsel van crossresistentie een grote rol. Een andere kanttekening bij het onderscheid tussen antibiotica voor dierlijk en humaan gebruik is het feit dat situaties plotseling kunnen veranderen. Antibiotica zoals colistine zijn tientallen jaren niet gebruikt voor mensen (maar wel voor dieren) vanwege hun toxiciteit maar door de opkomende multidrugresistente gramnegatieve infecties wordt er steeds meer teruggegrepen op een antibioticum als colistine als laatste redmiddel. Een snelle verspreiding van een resistentiemechanisme tegen dit middel van dier naar mens zou een dramatisch effect kunnen hebben. Daarnaast geldt ook voor de veehouderij dat grootschalige en langdurige blootstelling van bacteriën aan antibiotica zal leiden tot een sterke toename van resistente bacteriën waardoor er direct of indirect een verhoogd risico voor de volksgezondheid kan ontstaan.

Nieuwe manier van diagnostiek

Zoals hierboven beschreven is een beperking van de blootstelling aan antibiotica essentieel om te komen tot een verminderde resistentieontwikkeling. Volgens ons kunnen twee factoren bijdragen aan deze vermindering: het gericht voorschrijven van antibiotica en het gebruik van meer specifieke, small-spectrum antibiotica. Daarnaast zouden nieuwe antibiotica met een nieuw werkingsmechanisme kunnen helpen, maar gezien de magere pijplijnen van de afgelopen decennia biedt dit op de korte termijn geen echte oplossing. Voor het gericht kunnen voorschrijven en het gebruik van small-spectrum antibiotica is het kunnen maken van een goede diagnose echter essentieel. Gericht voorschrijven houdt namelijk bijna per definitie in dat bekend is wat de oorzaak van de infectie is en een small-spectrum antibioticum kan eveneens alleen worden voorgeschreven als de oorzaak van de infectie bekend is. Daarom ligt de belangrijkste ontwikkeling voor de komende jaren wat ons betreft op het gebied van de diagnostiek. Voor een effectieve behandeling van infecties is snelheid ook een belangrijke voorwaarde waardoor de standaard microbiologische aanpak gebaseerd op kweken en het daarna karakteriseren van specifieke eigenschappen zoals resistentie tegen antibiotica veel te langzaam is, nog afgezien van de logistieke problemen om monsters vanaf de boerderij in een laboratorium te krijgen. Om toch in de diagnostische behoefte te kunnen voorzien zal gebruik gemaakt moeten worden van moleculair diagnostische methoden. Deze diagnostiek kan een aantal antwoorden opleveren met een verschillende resolutie. Hierbij valt bijvoorbeeld te denken aan de volgende niveaus van resolutie:

- Infectie veroorzaakt door bacterie/virus/parasiet
- Grampositieve of gramnegatieve bacterie
- Identificatie bacteriesoort

- Identificatie specifieke eigenschappen zoals antibioticumresistentie of vermogen tot verspreiding (epidemiciteit)

Snelheid en gebruiksgemak (of automatisering) zijn essentieel om dergelijke diagnostiek in te kunnen voeren voor toepassing in de veehouderij. Daarbij kan wel geprofiteerd worden van ontwikkelingen op het gebied van moleculaire diagnostiek voor humane toepassingen (denk bv aan MRSA sneltesten). Ook op het gebied van gebruiksgemak vinden er vele ontwikkelingen plaats die de komende jaren gaan leiden tot het eenvoudiger toepassen van moleculaire diagnostiek, op termijn ook buiten een laboratorium. Hierbij valt te denken aan Lab-on-a-Chip ontwikkelingen waarbij DNA uit monsters kan worden geïsoleerd en waarbij PCR analyses in een chip kunnen plaatsvinden. Verder heeft de opkomst van genomische technologie de afgelopen jaren ertoe geleid dat er veel nauwkeuriger naar het DNA van bacteriën kan worden gekeken. De conventionele microbiologie ging er lange tijd van uit dat alle bacteriestammen binnen een soort min of meer gelijk waren (op misschien een verschil in antibioticumresistentie na). Analyses op DNA niveau laten echter zien dat de situatie eerder omgekeerd is: elke bacteriestam lijkt een uniek patroon van DNA markers te hebben, naast het constante deel van het genoom dat bepaalt dat de bacterie tot een specifieke soort behoort. Door vergelijkingen van DNA patronen kunnen biomarkers voor specifieke eigenschappen worden geïdentificeerd. Een voorbeeld hiervan is de identificatie van 5 DNA markers die het onderscheid tussen voor de mens pathogene en relatief ongevaarlijke stammen van *Legionella pneumophila* mogelijk maken (een ontwikkeling die momenteel in een eenvoudig toepasbare moleculaire analysemethode wordt vertaald, die binnenkort ook commercieel beschikbaar komt). Het aantal voorbeelden van markers die specifieke eigenschappen in humaan pathogene bacteriën kunnen voorspellen zal naar onze verwachting de komende jaren sterk toenemen en dit zal leiden tot een sterke verbetering van diagnostische methoden, ook voor wat betreft antibioticumgevoeligheid en resistentie. Het is gewenst en ook goed mogelijk dat de moleculaire diagnostiek voor de veehouderij gebruik maakt van de beschreven ontwikkelingen voor humane diagnostiek, waarbij al dan niet beschikbare financiering een kritische factor zal zijn. Dergelijke diagnostische methoden kunnen op termijn leiden tot een veel gericht gebruik van antibiotica en een toenemend gebruik van small-spectrum antibiotica. Uiteindelijk zal dit leiden tot een verminderde selectiedruk voor resistentieontwikkeling en dus ook een verminderd risico voor de volksgezondheid op dit gebied.

Gebruik van small-spectrum antibiotica

De huidige praktijk voor wat betreft het voorschrijven van antibiotica is voornamelijk gericht op het gebruik van breed-spectrum antibiotica. Dit leidt ertoe dat niet alleen het te bestrijden organisme wordt blootgesteld

aan antibiotica maar ook een groot aantal andere micro-organismen. Aangezien elk micro-organisme in principe in staat is om een resistentiemechanisme te ontwikkelen, verhoogt deze handelswijze het risico op nieuwe resistenties sterk. Veel beter zou het zijn om gericht het te bestrijden organisme aan te pakken zonder andere organismen de kans te bieden resistenties te ontwikkelen. Deze gerichte aanpak kan plaatsvinden met small-spectrum antibiotica die idealiter slechts bacteriën van 1 of enkele nauwverwante soorten bestrijden en de rest van de bacteriën ongemoeid laten. Vanwege de nadruk op breed-spectrum antibiotica bij de ontwikkeling van nieuwe antibiotica is dit aspect tot nog toe zwaar onderbelicht gebleven. In onze visie kan de ontwikkeling van meer gerichte therapie leiden tot een sterk verminderd risico op resistentieontwikkeling en daarnaast potentieel ook tot een meer effectieve behandeling van infectieziekten. Het huidige principe van breed-spectrum antibiotica heeft een sterk “one size fits all” karakter waarbij 1 antibioticum een groot aantal bacteriesoorten in diverse lichaamsdelen moet bestrijden. Het is eenvoudig in te zien dat dit niet in alle gevallen even effectief zal zijn en dat meer gerichte therapie in principe effectiever moet kunnen zijn. Een voor de hand liggende parallel betreft het bestrijden van tumoren met breed-spectrum middelen enkele decennia geleden terwijl tegenwoordig veelal gebruik wordt gemaakt van een specifieke therapie voor een specifiek type tumor. De stijging in het percentage behandelbare tumoren spreekt wat dit betreft boekdelen.

Een vraag die gesteld zou kunnen worden is waarom er op dit moment zo weinig small-spectrum antibiotica beschikbaar zijn. Een mogelijke verklaring zou kunnen zijn dat het heel moeilijk is dergelijke antibiotica te vinden. Deze verklaring wordt tegengesproken door de ervaring die de afgelopen jaren binnen TNO is opgedaan. Hierbij is, door gebruik te maken van een nieuw ontwikkeld screeningsplatform, gericht gezocht naar nieuwe antibiotica die *S. aureus* kunnen bestrijden. Uit een set van enkele duizenden chemische compounds (geselecteerd op basis van een aantal chemische criteria) werden enkele tientallen compounds geïdentificeerd die een duidelijk groeiremmend effect hadden op *S. aureus*. Het werkingsmechanisme van deze compounds werd daarna geanalyseerd door gebruik te maken van een nieuwe analysemethode op basis van transcriptomics (grootschalige analyse van genexpressie). Hieruit bleek dat een deel van de nieuwe compounds een afwijkend werkingsmechanisme heeft in vergelijking met de bulk van de huidig beschikbare antibiotica. Dergelijke nieuwe werkingsmechanismen kunnen een belangrijke rol spelen bij het terugdringen van de resistentieproblematiek, omdat er nog geen resistentiemechanismen voor ontwikkeld zijn. Verdere analyse van deze nieuwe compounds liet ook zien dat geen enkele compound actief was tegen gramnegatieve bacteriën en dat de meeste van deze compounds voornamelijk actief waren tegen *Staphylococcus* soorten. Deze resultaten suggereren dan ook sterk dat

het identificeren van small-spectrum antibiotica haalbaar is. Hoewel deze aanpak in principe zeer interessant is, moet men zich wel realiseren dat het zeker 10 jaar duurt voordat een nieuw te ontwikkelen antibioticum toegelaten wordt. Om dit proces te versnellen kan ook gedacht worden aan het testen van antibioticum-leads die in het verleden niet verder ontwikkeld zijn vanwege hun te smalle werkingsspectrum, maar waar wel al veel meer over bekend is (zowel qua toxicologie als qua farmacokinetiek). In onze ogen kunnen dergelijke small-spectrum antibiotica met eventueel ook nog nieuwe werkingsmechanismen in ieder geval een grote bijdrage leveren aan het verminderen van de resistentieontwikkeling.

Wat is er nodig om deze aanpak te ontwikkelen?

Het door ons voorgestelde toekomstscenario berust op twee pijlers:

- verbeterde diagnostiek leidt tot gerichtere behandeling en maakt gebruik small-spectrum antibiotica mogelijk,
- ontwikkeling small-spectrum antibiotica met bij voorkeur nieuwe werkingsmechanismen.

Realisatie van beide doelen zal met grote waarschijnlijkheid leiden tot een sterke reductie van de resistentieproblematiek en de daarbij behorende dreiging voor de volksgezondheid. Wel dient opgemerkt te worden dat de tijdspaden voor beide doelen aanzienlijk verschillen. Dit betreft zowel de termijn waarop de gewenste ontwikkelingen kunnen plaatsvinden als de bijbehorende investeringen. Deze punten zullen hieronder verder worden uitgewerkt. Ondanks deze verschillen in kosten en tijdslijnen is het goed zich te realiseren dat beide ontwikkelingen essentieel zijn om tot een structurele en blijvende doorbraak te komen. Indien slechts 1 van beide doelen wordt bereikt kan dit wel een tijdelijke verbetering opleveren, maar zal die waarschijnlijk gevolgd worden door een nieuwe terugval in de oude problematiek.

Verbetering van de diagnostiek met de nadruk op nieuwe moleculair diagnostische methoden kan op zeer korte termijn worden gestart en kan binnen een termijn van 2-3 jaar al de eerste praktisch toepasbare resultaten gaan opleveren. Het grote voordeel van de diagnostiekontwikkeling is dat die in een aantal stappen kan plaatsvinden en tussentijds bijgestuurd kan worden. Hierbij kunnen ook meerdere partijen betrokken worden die elk een deel van de ontwikkelingen voor hun rekening nemen. Goede coördinatie en afstemming zijn wel essentieel om tot een succesvolle aanpak te komen. Hierbij hoort ook de keuze voor een specifieke werkwijze die dan voor de verschillende vraagstellingen kan worden gebruikt. Een ruwe schatting van de kosten van een dergelijke diagnostische ontwikkeling voor de komende 2-3 jaren bedraagt 2-3 miljoen euro. Door tijdig een partner die verantwoordelijk is voor de commerciële exploitatie bij deze activiteit te betrekken kunnen de kosten beperkt worden en kan de slaagkans van deze

activiteit vergroot worden. Voor de ontwikkeling van nieuwe small-spectrum antibiotica moet met een tijdschaal van minimaal 10 jaren en een investering van minimaal 50-100 miljoen euro rekening worden gehouden. Ook in dit traject is het zo spoedig mogelijk vinden van een partner voor de commerciële exploitatie een zeer gewenste en waarschijnlijk zelfs noodzakelijk scenario. Het ministerie van LNV kan wel door een gerichte startsubsidie deze lijn uitzetten en stimuleren om het commerciële scenario op gang te brengen. Een tussenvorm die past binnen dit scenario is het actief gebruikmaken van compounds die al als medicijn gebruikt worden of in een eerder stadium zijn afgevallen. Deze compounds zijn hoogstwaarschijnlijk niet eerder getest op hun mogelijke toepasbaarheid als small-spectrum antibioticum. Indien deze activiteit wel aanwezig blijkt te zijn kunnen dergelijke compounds versneld de markt gaan bereiken. Als voor zowel het diagnostiek- als antibioticumontwikkeltraject de beoogde activiteiten zijn opgestart kan het ministerie met gerichte subsidies nadruk leggen op specifieke gewenste activiteiten waarbij een koppeling van diagnostiek en behandeling ons inziens een belangrijk aandachtspunt zou moeten zijn. Als het lukt om deze scenario's succesvol van de grond te krijgen zal dit op termijn zeker gaan leiden tot een beperking van de resistentieproblematiek.

Antibacterial vaccines

Introduction (or the biological perspective)

During a period of millions of years, animals and micro organisms have had many interactions and both survived by (mutual) adaptation. As a result, the skin of every living animal is covered with commensal bacteria and also every intestine is filled with them. In fact, the number of bacteria in the animal intestine is many fold higher compared to the number of cells the surrounding body is composed of and 10% of our bodies dry weight is accounted for by micro organisms. Putting it this way, the human body can be considered as a container for microbial cells. If these commensal organisms are removed, the resulting gnotobiotic animal is very sensitive and will soon die outside of a sterile environment. Thus, micro organisms play an important role in maintaining human and animal health. However, they play an equally important role in causing disease. For surviving a number of other micro organisms that do not behave as commensals, animals have developed several defence mechanisms. The one most exploited is the adaptive immune system. In the year 1796, Edward Jenner started to harness and boost this system artificially by vaccination. Since then, man has developed vaccines against many human infectious diseases. In parallel, vaccines have been developed against infectious diseases both in food-producing animals as well as in companion animals. It is clear that vaccination programs have to be adapted to changes in the field in order to remain effective (van Loo et al, 2002, Day et al., 2008). Further, it is important to realize that micro organisms may have found their niche as commensals in one organism, but behave as a pathogen in another species. Examples of these are *Campylobacter jejuni* and toxigenic *Escherichia coli* O157

which are commensals in poultry and cattle respectively, but pathogenic in man. These organisms (as commensals) behave in such a way that they go unnoticed by the host's immune systems, and are extremely difficult to develop vaccines against in that specific host.

Also microorganisms had to survive for more than a billion years and have both adapted to survive together, as well as developed ways to defend themselves against other microorganisms. One of these methods is the use of antibiotics, which was also harnessed by man in its defense against pathogenic microorganisms. Penicillin was discovered by Alexander Flemming in 1928 and large scale use of antibiotics started after 1940. Since then the lives of many people and animals have been saved by the large variety of antibiotics that have become available.

In addition to the specific effect of antibiotics, also more undefined mechanisms by which microorganisms compete with each other are being exploited in the form of probiotica and competitive exclusion. Although often not backed up by scientific proof of their beneficial effect, several dietary supplements containing a single or a few strains of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species are available in the supermarket. In the veterinary context, several products are available for use in aquaculture (Wang, 2008) as well as in the poultry industry (Schneitz, 2005). These products are based on complete gut flora and contain up to several hundreds of different, not specifically defined bacterial strains. They are also used in after-antibiotic treatment as a combination treatment. The protective effect based on competitive exclusion against *Salmonella* is experimentally proven by several different investigators (reviewed by Schneitz). Absence of consistent efficacy in practical conditions and lack of corresponding impact on food borne Salmonellosis prevent their general use.

Another feature from nature that was exploited by man to control microbial infections are bacteriophages (Skurnik and Strauch, 2006) or their lytic enzymes (Fischetti, 2006). It is estimated that for every bacterium, 10 phages exist and that every 48 hours, half of the living bacterial biomass on earth is being lysed by phages (Fuhrman 1999). Again, these processes have been going on for millions of years and both bacteria as well as phages have survived.

In summary, bacteria have been able to adapt to, or evade all of the mechanisms mentioned above, during millions of years in nature, as well as during the relatively few years that man has tried to harness these technologies to his advantage. It is reasonable to expect that bacteria will keep doing this in the foreseeable future. Therefore it is evident that the use of only one of the tools mentioned above will not be sufficient in the long run, and that we will have to employ all of them and in such a scheme that the bacteria have no or only limited opportunity to adapt and evade. From the mechanisms to protect from microbial infection, vaccines and antibiotics are most frequently used. Where vaccines have a narrow

spectrum of activity, defined by the specific antigens included, and are generally given as a prophylaxis with a longer duration, antibiotics generally have a broader spectrum and are mostly used for treatment of diseased animals, metaphylaxis and prophylaxis with a shorter duration (animals, herds, flocks at high and immediate risk of getting infected). Antibiotics can be used effectively against (new) diseases, where the pathogen is not yet fully identified or no vaccine is (yet) available. Both types of applications are therefore complementary. In general, for applications where efficacious vaccines have become available, the use of antibiotics has decreased. Below, a number of examples is given from the veterinary field where:

- a. vaccines have been successful in reducing the use of antibiotics,
- b. examples of opportunities to improve, with special focus on the use as alternative for antibiotics,
- c. areas where there are limitations to the use of vaccines.

ad a. What has been achieved by vaccination so far

The best documented example from the field is the reduction in use of antibiotics after the introduction of vaccination of salmon against furunculosis (caused by *Aeromonas salmonicida*) and cold-water vibriosis around 1990 in Norway (Markestad & Grave, 1997). A reduction of the use of antibiotics of 98% was achieved (WHO, 2006). Antibiotics remain to be used as an additional tool in case of vaccine breakthrough or against other diseases for which no effective vaccines exist.

Outside of Scandinavian aquaculture which is a geographically confined and highly monitored industry, it is much more difficult to find reliable data on the possible effects of vaccination on reduced use of antibiotics. Especially since the changed regulations in Europe on use of antibiotics as feed additives for growth promotion purposes also have had their effect. One other well documented example is the National Control Programme for Salmonellosis Poultry in the UK, which combines hygiene with vaccination protocols, has resulted in a drastic reduction of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in breeding animals. This is associated with a 64% reduction of human cases of salmonellosis between 1997 and 2005 (Defra 2007). Of these, the reduction of the multidrug resistant strains like *S. Typhimurium* DT104 was most pronounced (90%).

ad b. Areas where vaccines can be improved

Porcine Respiratory Disease Complex (PRDC)

This is a disease complex where both viral as well as bacterial pathogens interact and potentiate each other. The main primary agents involved are the Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) and *Mycoplasma hyopneumoniae* (Veenhuizen, 1998; Woeste, 2007). But in addition, bacterial species like *Haemophilus parasuis* (Glasser's Disease), *Mycoplasma*

hyorhinis, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Pasteurella multocida* and/or *Streptococcus suis* have been indicated to be involved. For the treatment of these pathogens antibiotics like β -lactams, (fluoro)quinolones, macrolides tetracyclines, and fenicol are being used. Various vaccines against a number of these single pathogens now are available and there is a high demand for combined use and combination vaccines in the field. Depending on the microbial status of the individual farm, many combinations can be required to solve the specific problem. The compatibility of many of the products is not known, and the complexity of combination products (regulatory, manufacturing, Quality Control) increases dramatically with every antigen added to the vaccine.

Streptococcus suis

Streptococcus suis, a gram-positive bacterium, is a known zoonotic agent and an occupational hazard for workers in the pork industry, mostly occurring as isolated cases of meningitis (Arends & Zanen, 1988). Recently, 52 people died, mostly from streptococcal toxic shock syndrome during two outbreaks involving serotype 2 in the People's Republic of China (Tang et al, 2006). Asymptomatic nasopharyngeal carriage is often found in healthy swine, but can also cause fatal sepsis associated with meningitis and polyarthritis in swine of all ages (Staats et al, 1997).

A total of 35 serotypes have been described, of which serotypes 2, 7 and 9 are (in that order) the most prevalent. In the pig industry, sows on problem farms with high piglet mortality (and sometimes high mortality in older swine as well) are vaccinated with inactivated auto-vaccines. After vaccination of sows with formalin-inactivated bacterin of serotype 2, high protection of the offspring against experimental challenge with the same serotype is observed (Nielsen et al, 2006). The species is genetically diverse and contains a number of putative virulence factors (e.g. suilysin, muramidase-released protein, extra-cellular factor, fibronectin-binding protein), but these neither seem to be absolutely conserved across the species *S. suis* nor necessary for virulence. So far, no cross-protective vaccine based on these antigens is available. Many farms are having *S. suis* infections around weaning and antibiotics are the sole therapy for this specific indication. A cross-protective vaccine could definitely reduce the use of antibiotics.

Necrotic Enteritis in Poultry

Since the European Commission has in 1999 prohibited antibiotics like bacitracin, spiramycin, tylosin and virginiamycin in feed for growth promotion purposes, the therapeutic use of antibiotics for the control of necrotic enteritis in poultry has increased (Hughes 2008). Necrotic enteritis is caused by the bacterium *Clostridium perfringens*. At this moment the first commercial vaccine (applied to breeding animals to protect their progeny broilers) is conditionally licensed for the US market and is under registration in the EU.

The efficacy has been demonstrated in various field trials both in EU and the America's (Broussard, 2008).

Salmonella in poultry

Salmonella Typhimurium and *Salmonella* Enteritidis are the second most common cause of human food-poisoning, while they occur mostly asymptotically in livestock. For poultry, various inactivated (Woodward et al, 2002) and live vaccines based on either or both of the *S. typhimurium* or *S. enteritidis* antigens are commercially available (Barrow et al, 2003 and Immerseel et al, 2005). Also, live vaccination with attenuated *S. Gallinarum*, which is a strict poultry pathogen has been shown to reduce *S. Enteritidis* colonization levels in chickens (Ferberwee et al, 2001). In Europe broilers for meat production are not vaccinated against *S. Enteritidis* or *S. Typhimurium* because there are no live vaccines registered for this purpose (EFSA, 2004). Vaccination of animals is considered to be one of the cornerstones of the strategy to reduce human *Salmonella* infections. In 2003, the European Union issued Directive 2003/99/EC on the monitoring of zoonoses and zoonotic agents and Regulation (EC) No 2160/2003 on the control of salmonella and other specified food-borne zoonotic agents. *Salmonella* in poultry is the first priority and from 2008 onwards, vaccination will be mandatory in the European Member States with an *S. Enteritidis* prevalence of above 10% in layers. Further measures are expected for breeders and for swine in the near future.

Salmonella in swine

Salmonella typhimurium infections in swine are mostly subclinical, but are an occupational hazard for pig farmers and can be transferred by meat products. Several vaccination strategies have been shown to be promising, e.g. sow vaccination with inactivated bacterins (Roesler, 2006) and live vaccination of piglets with homologous (Roesler, 2004) or heterologous serotypes (Maas et al, 2001). Efficacy under field conditions of *Salmonella* vaccination in pigs and corresponding impact on human food borne Salmonellosis of swine origin is still unknown.

Swine dysentery

Serpulina hyodysenteriae is the causative agent of swine dysentery, a severe diarrhoeal disease. It can be controlled with substances like Carbadox, which are since 1999 prohibited in Europe for use as growth promoting feed additives. At this moment, infections are treated with tiamulin and valnemulin. No efficacious vaccines are available to control this disease. Several approaches with inactivated bacterins and recombinant subunit antigens have been tested without success.

Lawsonia intracellularis

Proliferative enteropathy (ileitis) has been known as a porcine disease for several decades, but *Lawsonia intracellularis*, the causative agent, was first identified in 1993. After 1999, there has been an increased incidence of the disease, resulting in treatment with antibiotics like tylosin, lincomycin and tetracycline. Recently, a live vaccine has become available both in the US as well as in Europe (Kroll, 2005). Depending on the effectiveness of this vaccine, the use of antibiotic treatments for this indication is expected to decrease.

Post Weaning Diarrhea (PWD) and Edema Disease (ED)

PWD and ED are similar swine diseases caused by a variety of enterotoxigenic *E. coli*. These diseases are different from the neonatal coli bacillosis. The latter can be prevented by vaccination of the sows. Many of the bacteria isolated in clinical PWD and ED cases express F4 and F18 fimbriae respectively, and the ED strains are associated with production of Shiga Toxin 2e variant. However, no commercial vaccine against these two diseases is available and most problems are currently treated with antibiotics.

Digital dermatitis

Digital dermatitis is a very painful condition resulting in lameness which subsequently reduces feed intake, milk yield and fertility in cattle. It is one of the most costly diseases in cattle, especially in dairy. Quite a number of organisms (e.g. *Fusobacterium* spp., *Bacteroides* spp., *Campylobacter* spp. and *Peptococcus* spp., various spirochetes and *Gugenheimella bovis*) have been implicated as the causative agent of digital dermatitis. The disease is treated by both systemic as well as topically (footbath) applied antibiotics (Laven, 2004). Mostly cephalosporins, macrolides or tetracyclins are being used. So far, no effective vaccine is commercially available.

Q-fever

Q-fever, is a worldwide zoonosis caused by the Gram-negative intracellular bacterium *Coxiella burnetii*, infecting humans and ruminants. Inhalation of aerosols, containing less than 10 bacteria, which can spread across large distances, is the main route of infection between animals. The bacterium can survive for a long time in the form of spore-like structures. Abortion is the main clinical sign in ruminants, and large quantities of the bacterium are shed via the placenta and vaginal secretions. The bacterium may also be present in faeces and milk, but is sensitive to pasteurization. In human infections, doxycycline is a first-line therapy; fluoroquinolones or macrolides are alternative treatments. Recovery from *C. burnetii* induced endocarditis requires 2 years of combined antibiotic treatment. A commercial vaccine for human use is available in Australia (Hutson et al, 2000). For veterinary use, two vaccines composed of inactivated cells are commer-

cially available. The vaccine composed of type 1 cells appears to be superior (Arricau et al., 2005), but this vaccine has been noted to have a lower efficacy in pregnant animals (Guatteo et al., 2008). Regular use of the veterinary vaccines could reduce the extensive use of antibiotics in human disease cases.

ad c. Limitations of the use of vaccines

Campylobacter jejuni

Campylobacter jejuni is the major cause of human food-poisoning in most countries (Allos, 2001 and EFSA & ECDC, 2007) and also causes immune-mediated diseases such as the Guillain-Barré (Yan et al 2005) and Miller-Fisher syndromes (Overall & Willison, 2005). Most human infections with these bacteria are associated with the consumption of poultry, but pets can also be a source of infection (Damborg et al, 2004). The bacterium is very well adapted to chickens, and has a very low infectious dose. The majority of flocks are heavily and persistently colonized with up to 10^{10} colony forming units per gram of faeces without causing any problems for the chickens. Furthermore, *C. jejuni* is naturally competent and incorporates heterologous deoxyribonucleic acid (DNA) and is therefore genetically and antigenically heterogeneous. Although this is a complicating factor, the lack of pathogenic interaction with the host is the main reason why it has proven difficult to develop a reliable vaccine. Many types of live and inactivated vaccines have been tested, but without resulting in a practical solution. Some effect has been demonstrated with intraperitoneal vaccinations with whole cell bacterins and flagellin (Widders et al, 1996) as well as with a live *S. Typhimurium* vector containing a *C. jejuni* antigen (Wyszynska et al, 2004). Although the bacterium is highly sensitive to specific serum antibodies, colonization is not prevented by high levels of humoral antibodies as these do not reach the gut. Furthermore, live 'vaccination' with wild-type *Campylobacter* in young chicks (or even in-ovo) does not result in a reaction beyond what is normally found during colonization and therefore does not result in a reliable reduction of colonization. So far, the most efficient way to prevent transmission to man is to treat the meat after slaughter (e.g. by freezing) and to implement rigorous kitchen hygiene (Georgsson et al, 2006). A vaccine for human use would be another practical solution.

Escherichia coli O157:H7

Enterohaemorrhagic shigatoxin-producing *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 is present in the gut and faeces and on the skin of healthy cattle and sheep. The organism is very well adapted to the host and there is no evidence of pathogenic interactions. The organism can survive for several months in the soil (Bolton et al, 1999). Transmission is mostly via food, notably ground/minced beef and raw milk (Rangel et al, 2005), but the bacterium

can also persist on lettuce and other produce after dung from infected animals has been used as fertilizer (Solomon et al, 2002). Human outbreaks are often associated with haemolytic uraemic syndrome. Various pre- and post-harvest interventions have been tested in feedlots (Braban et al, 2004). In the United States of America (USA), the incidence of O157:H7 outbreaks is slowly declining, possibly due to the many hygiene measures which have started to be taken (e.g. washing carcasses after slaughter). Recently, a subunit vaccine containing secreted virulence factors has been tested in field trials in feedlot cattle with variable results (Potter et al, 2004 and Donkersgoed et al, 2005). In a number of cases, the colonization level of cattle was reduced but the result was still far from the desired sterile immunity. Vaccination could be an aid in further reducing the number of outbreaks, but only in combination with hygiene measures or other control tools.

Staphylococcus aureus

Staphylococcus aureus is most known in the veterinary field as the causative agent of mastitis in dairy cattle. Sporadic cases exist where human infections have been linked to cases of bovine mastitis and MRSA [methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*] strains have been isolated from cattle (Lee, 2003). However, in general, bovine mastitis strains are genetically different from human isolates (Larsen et al, 2000 and Zadoks et al, 2000). Mastitis is being controlled by the local application of antibiotics in the dry period, and so far all attempts to develop an efficacious vaccine have failed. Swine can be a source of *S. aureus* infection and in the Netherlands, pig breeders were identified recently as a group with an increased risk of being MRSA carriers. In cases of hospitalization, they are kept isolated from other patients until proven negative (Vandenbroucke-Grauls & Beaujean, 2006). However, the ST398 (swine) strain is genetically different from human isolates that are responsible for the hospital and community acquired infections. The resistance patterns differ and the PVL gene is absent (de Neeling et al., 2007). Furthermore, MRSA strains have also been isolated from other (domestic) animals, like horses, dogs, cats, sheep and chickens (Leonard, 2007 and Lee, 2003). Further research is necessary to determine whether poultry and swine are sources, or accidental recipients, of MRSA. The ST398 MRSA strain is widely spread and behaves as a commensal organism under normal conditions in the animal species. Therefore, the development of a vaccine against this organism for the veterinary field will be quite a challenge, if at all possible.

Conclusion/recommendations

For a large number of diseases, efficient vaccines are available, but for a number of infectious diseases of animals where development of a vaccine should be feasible, vaccines are not (yet) available on the European market.

Of these necrotic enteritis in poultry, swine dysentery, PWD, ED and equine proliferative enteropathy are described above, but also Porcine Exudative Epidermitis by *Staphylococcus hyicus* and equine pneumonia by *Rhodococcus equi* (Meyer and Presscot, 2004).

There are multifactorial diseases or disease complexes for which it is not always clear which causative agent is the problem on a particular farm. Combination-vaccines containing multiple antigens either from different pathogens (e.g. PRDS and digital dermatitis) or multiple serotypes from the same species (e.g. *S. suis*) could ensure that a particular disease (complex) would be prevented. In this way also vaccines directed against viral diseases could contribute to the reduced use of antibiotics. So further research in the relations between the different pathogens in disease complexes will increase the focus and efficacy of the resulting combination vaccines. Compliance with the current regulations to market a vaccine combination requires large investments and increase the time before a vaccine actually becomes commercially available. As a result, the period between the time a pathogen has been identified as a cause of a problem in the field, and a vaccine can be applied, nearly a decade goes by. As other examples demonstrate the availability of such vaccines could reduce the use of antibiotics. Still antibiotics are essential for the treatment and control of disease. They help to reduce animal suffering and contribute to the production of healthy livestock.

The use of vaccines in poultry and pigs against Salmonella, against Q-fever in sheep and against leptospirosis in cattle are examples of how the corresponding human infections and associated use of antibiotics can be reduced. For Q-fever and leptospirosis in cattle, vaccines are commercially available, as well as for reduction of Salmonella in breeding animals. However, for broilers or for swine no vaccine is available.

There are also limitations to the ability of vaccines to intervene, notably in cases where there is very limited or no pathogenic interaction between the microorganism and the (colonized) host or where organisms are hiding in the organism not accessible by the proper host-immune systems. Examples of these are the intestinal colonization of chickens by *C. jejuni*, of cattle by *E. coli* O157:H7 and *S. aureus* mastitis. Here, a real breakthrough is necessary to develop effective vaccines. Alternatively, other tools like phage therapy, antibiotics, probiotics or competitive exclusion could be more effective.

The bottom line is that each bacterium requires a tailored approach, which should consist of preferably more than one of the tools described. Given the fact that bacteria have played the game of Darwin so much longer and have shown to be able to evade and survive all strategies so far, we will need all the tools we can mobilize.

References

Allos B.M. (2001). – *Campylobacter jejuni* infections: update on emerging issues and trends. *Clin. infect. Dis.*, **32** (8), 1201-1206.

Arends J.P. & Zanen H.C. (1988). – Meningitis caused by *Streptococcus suis* in humans. *Rev. infect. Dis.*, **10**, 131-137.

Arricau-Bouvery, N., Souriau, A., Bodier, C., Dufour, P., Rousset, E., Rodolakis, A. Effect of vaccination with phase I and phase II *Coxiella burnetii* vaccines in pregnant goats (2005) *Vaccine*, **23** (35), pp. 4392-4402.

Barrow P.A., Mead G.C., Wray C. & Duchet-Suchaux M. (2003). – Control of food-poisoning salmonella in poultry: biological options. *World Poult. Sci. J.*, **59** (3), 373-383.

Bolton D.J., Byrne C.M., Sheridan J.J., McDowell D.A. & Blair I.S. (1999). – The survival characteristics of a non-toxigenic strain of *Escherichia coli* O157:H7. *J. appl. Microbiol.*, **86** (3), 407-411.

Brabban A.D., Nelsen D.A., Kutter E., Edrington T.S. & Callaway T.R. (2004). – Approaches to controlling *Escherichia coli* O157:H7, a foodborne pathogen and an emerging environmental hazard. *Environ. Pract.*, **6** (3), 208-229.

Broussard C. (2008). Field Efficacy of a *Clostridium perfringens* Type A Alpha-Toxoid Breeder Vaccine in Preventing Mortality Due to Necrotic Enteritis in Broilers. Oral presentation 440 at the XXIIIrd World Poultry Congress, Brisbane Australia.

Damborg P., Olsen K.E.P., Nielsen E.M. & Guardabassi L. (2004). – Occurrence of *Campylobacter jejuni* in pets living with human patients infected with *C. jejuni*. *J. clin. Microbiol.*, **42** (3), 1363-1364.

Day T., Galvani, A., Struchiner, C. & Gumel, A. The evolutionary consequences of vaccination (2008) *Vaccine*, **26** (SUPPL. 3), pp. C1-C3.

DEFRA, UK National Control Programme for Salmonella in Layers (*gallus gallus*), July 2007. www.defra.gov.uk.

de Neeling A.J., van den Broek M.J.M., Spalburg E.C., van Santen-Verheuel M.G., Dam-Deisz W.D.C., Boshuizen H.C., van de Giessen A.W., van Duijkeren E., Huijsdens X.W. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs (2007) *Veterinary Microbiology*, **122** (3-4), pp. 366-372.

Donkersgoed J. van, Hancock D., Rogan D. & Potter A.A. (2005). – *Escherichia coli* O157:H7 vaccine field trial in 9 feedlots in Alberta and Saskatchewan. *Can. vet. J.*, **46** (8), 724-728.

Dunkel, B. Diagnosis and treatment of non-infectious and infectious foal diarrhea (2008). *Pferdeheilkunde*, **24** (4), pp. 529-539.

EFSA, The EFSA Journal (2004) 114, 1-74, The use of vaccines for the control of Salmonella in poultry. (www.efsa.eu.int).

EFSA & ECDC, The EFSA Journal (2007) 130, The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006,

Feberwee A., De Vries T.S., Hartman E.G., De Wit J.J., Elbers A.R.W. & De Jong W.A. (2001). – Vaccination against Salmonella enteritidis in Dutch commercial layer flocks with a vaccine based on a live *Salmonella gallinarum* 9R strain: evaluation of efficacy, safety, and performance of serologic *Salmonella* tests. *Avian Dis.*, **45** (1), 83-91.

Fischetti, V.A., Nelson, D., Schuch, R. (2006) Reinventing phage therapy: Are the parts greater than the sum? *Nature Biotechnology*, **24** (12), pp. 1508-1511.

Fuhrman, J.A. (1999) Marine viruses and their biochemical and ecological effects. *Nature* 399:541-548.

Georgsson F., Orkelsson A., Geirsdóttir M., Reiersen J. & Stern N.J. (2006). – The influence of freezing and duration of storage on *Campylobacter* and indicator bacteria in broiler carcasses. *Food Microbiol.*, **23** (7), 677-683.

Guatteo, R., Seegers, H., Joly, A., Beaudeau, F., Prevention of *Coxiella burnetii* shedding in infected dairy herds using a phase I *C. burnetii* inactivated vaccine, (2008) *Vaccine*, **26** (34), pp. 4320-4328.

Hughes, L., Hermans, P., Morgan, K. (2008). Risk factors for the use of prescription antibiotics on UK broiler farms. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, **61** (4), pp. 947-952.

Hutson, B., Deaker, R.A., Newland, J. Vaccination of cattle workers at risk of Q fever on the north coast of New South Wales. (2000) *Australian family physician*, **29** (7), pp. 708-709.

Immerseel F. van, Methner U., Rychlik I., Nagy B., Velge P., Martin G., Foster N., Ducatelle R. & Barrow P.A. (2005). – Vaccination and early protection against non-host-specific *Salmonella* serotypes in poultry: Exploitation of innate immunity and microbial activity. *Epidemiol. Infect.*, **133** (6), 959-978.

Kroll, J.J., Roof, M.B., Hoffman, L.J., Dickson, J.S., Harris, D.L. (2005) Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by *Lawsonia intracellularis*. *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases.*, 6 (2), pp. 173-197.

Larsen H.D., Huda A., Eriksen N.H.R. & Jensen N.E. (2000). – Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet. Microbiol.*, **76** (2), 153-162.

Laven, R.A. & Logue, D.N. Treatment strategies for digital dermatitis for the UK. (2006) *Veterinary Journal*, 171 (1), pp. 79-88.

Lavoie, J.P., Drolet, R. (2007) *Lawsonia intracellularis*. In *Equine Infectious Diseases* (2007) *Saunders Elsevier*, pp. 313-316. 1st edn. Eds D. C. Sellon, M. T. Long. St Louis

Lee J.H. (2003). – Methicillin (Oxacillin)-resistant *Staphylococcus aureus* strains isolated from major food animals and their potential transmission to humans. *Appl. environ. Microbiol.*, **69** (11), 6489-6494.

Leonard, F.C. & Markey, B.K (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in animals: A review. *Veterinary Journal*, 175 (1), pp. 27-36.

Maes D., Gibson K., Trigo E., Saszak A., Grass J., Carlson A. & Blaha Th. (2001). – Evaluation of cross-protection afforded by a *Salmonella cholerae suis* vaccine against *Salmonella* infections in pigs under field conditions. *Berl. Münch. tierärztl. Wochenschr.*, **114** (9-10), 339-341.

Markestad, A., Grave, K., Reduction of antibacterial drug use in Norwegian fish farming due to vaccination. (1997) *Developments in biological standardization*, 90, pp. 365-369.

Meijer, W.G., Prescott, J.F. *Rhodococcus equi*. (2004) *Veterinary Research*, 35 (4), pp. 383-396.

Nielsen B., Bak H., Nell T., Jacobs A.A.C., Wijnhoven L.T.J., & Segers R.P.A.M. (2006). – Sow vaccination with Porcilis® Strepsuis and protection of the offspring against lethal challenge with *Streptococcus suis* serotype 2. Proceedings of the 19th IPVS Congress, 16-19 July, Copenhagen, Denmark. (J.P. Nielsen & S.J. Jorsal, eds), Abstract 18-07. ISBN-13: 978-87-7611-140-7.

Overall J.R. & Willison H.J. (2005). – Recent developments in Miller Fisher syndrome and related disorders. *Curr. Op. Neurobiol.*, **18** (5), 562-566.

Potter A.A., Klashinsky S., Li Y., Frey E., Townsend H., Rogan D., Erickson G., Hinkley S., Klopfenstein T., Moxley R.A., Smith D.R. & Finlay B.B. (2004). – Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine*, **22** (3-4), 362-369.

Rangel J.M., Sparling P.H., Crowe C., Griffin P.M. & Swerdlow D.L. (2005). – Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerg. infect. Dis.*, **11** (4), 603-609.

Roesler U., Marg H., Schröder I., Mauer S., Arnold T., Lehmann J., Truyen U. & Hensel A. (2004). – Oral vaccination of pigs with an invasive *gyrA-cpxA-rpoB* *Salmonella typhimurium* mutant. *Vaccine*, **23** (5), 595-603.

Roesler U., Heller P., Waldmann K.-H., Truyen U. & Hensel A. (2006). – Immunization of sows in an integrated pig-breeding herd using a homologous inactivated *Salmonella* vaccine decreases the prevalence of *Salmonella typhimurium* infection in the offspring. *J. vet. Med., B: Infect. Dis. Vet. Public Health*, **53** (5), 224-228.

Schneitz, C. Competitive exclusion in poultry - 30 years of research. (2005) *Food Control*, **16** (8 SPEC. ISS.), pp. 657-667.

Skurnik, M.A., Strauch, E.C. Phage therapy: Facts and fiction (2006) *International Journal of Medical Microbiology*, **296** (1), pp. 5-14.

Solomon E.B., Yaron S. & Matthews K.R. (2002). – Transmission of *Escherichia coli* O157:H7 from contaminated manure and irrigation water to lettuce plant tissue and its subsequent internalization. *Appl. environ. Microbiol.*, **68** (1), 397-400.

Staats J.J., Feder I., Okwumabua O. & Chengappa M.M. (1997). – *Streptococcus suis*: past and present. *Vet. Res. Commun.*, August, **21** (6), 381-407.

Tang J., Wang C., Feng Y., Yang W., Song H., Chen Z., Yu H., Pan X., Zhou X., Wang H., Wu B., Wang H., Zhao H., Lin Y., Yue J., Wu Z., He X., Gao F., Khan A.H., Wang J., Zhao G.P., Wang Y., Wang X., Chen Z. & Gao G.F. (2006). – Streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus suis* serotype 2. *PLoS Med.*, May, **3** (5), e151. Epub 11 April.

Vandenbroucke-Grauls C.M.J.E. & Beaujean D.J.M.A. (2006). – Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig breeders and cattle breeders. *Ned. Tijdschrift Geneeskde*, **150** (31), 1710-1712.

van Loo, I.H.M., Mooi, F.R. Changes in the Dutch Bordetella pertussis population in the first 20 years after the introduction of whole-cell vaccines. (2002) *Microbiology*, 148 (7), pp. 2011-2018.

Veenhuizen, M.F. Three bacterial pathogens in the porcine respiratory disease complex (1998) *Compendium on Continuing Education for the Practicing Veterinarian*, 20 (1 PART 1), pp. S11-S21

Wang, Y.-B.A, Li, J.-R.A, & Lin, J.B. Probiotics in aquaculture: Challenges and outlook (2008) *Aquaculture*, 281 (1-4), pp. 1-4.

Widders P.R., Perry R., Muir, W.I., Husband A.J. & Long K.A. (1996). – Immunisation of chickens to reduce intestinal colonisation with *Campylobacter jejuni*. *Br. Poult. Sci.*, 37 (4), 765-778.

Woeste K., & Grosse Beilage, E, Transmission of agents of the porcine respiratory disease complex (PRDC) between swine herds: A review Part 1 - Diagnostics, pathogen transmission via pig movement (2007) *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 114 (9), pp. 324-337.

Woodward M.J., Gettinby G., Breslin M.F., Corkish J.D. & Houghton S. (2002). – The efficacy of Salenvac, a *Salmonella enterica* subsp. Enterica serotype Enteritidis iron-restricted bacterin vaccine, in laying chickens. *Avian Pathol.*, 31 (4), 383-392.

World Health Organization: Report of a Joint FAO/OIE/WHO Expert Consultation on Antimicrobial Use in Aquaculture and Antimicrobial Resistance Seoul, Republic of Korea, 13–16 June 2006. ftp://ftp.fao.org/ag/agn/food/aquaculture_rep_13_16june2006.pdf

Wyszyńska A., Raczko A., Lis M. & Jagusztyn-Krynicka E.K. (2004). – Oral immunization of chickens with a virulent *Salmonella* vaccine strain carrying *C. jejuni* 72Dz/92 cjaA gene elicits specific humoral immune response associated with protection against challenge with wild-type *Campylobacter*. *Vaccine*, 22 (11-12), 1379-1389.

Yan S.S., Pendrak M.L., Foley S.L. & Powers J.H. (2005). – *Campylobacter* infection and Guillain-Barré syndrome: public health concerns from a microbial food safety perspective. *Clin. appl. Immunol. Rev.*, 5 (5), 285-305.

Zadoks R., Van Leeuwen W., Barkema H., Sampimon O., Verbrugh H., Schukken Y.H. & Van Belkum A. (2000). – Application of pulsed-field gel electrophoresis and binary typing as tools in veterinary clinical microbiology and molecular epidemiologic analysis of bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates. *J. clin. Microbiol.*, 38 (5), 1931-1939.

Bacteriophages

Introduction

The increasing number of papers, reviews (e.g. Adhya & Merrill 2006, Barrow & Soothill 1997, Chanishvili *et al.* 2001, Krylov 2001, Matsuzaki *et al.* 2006, Merrill *et al.* 2003, Sulakvelidze *et al.* 2001) and books (Häusler 2006, Kutter & Sulakvelidze 2005) appearing on the application of bacteriophages for antibacterial treatment as well as the emergence of specifically dedicated companies (at least 20 commercial phage companies exist at present) indicate that the reluctance of the Western scientists, medical doctors and veterinarians to apply 'viruses' for antibacterial therapy is steadily decreasing. Safety trials (e.g. phages for the treatment of infection with *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* of third degree burn wounds at the Burn Wound Center of the Military Hospital in Nederoverheembeek, Belgium, unpublished) and clinical trials (e.g. treatment of chronic ear infections caused by *P. aeruginosa* by Biocontrol, London, UK, unpublished) are under progress or have been carried out. The safety and efficacy of phage based antibacterial treatment in veterinary medicine and intensive animal farming has been established since more than two decades by several groups, most prominently by research at the Institute for Animal Disease Research in Houghton, Cambridgeshire, UK (Smith & Huggins 1983, Smith *et al.* 1987). Also, there are several regulatory breakthroughs such as FDA and/or USDA and F.SIS approvals of phages to treat meat and poultry for *Listeria* contamination (LMP 102 phage of Intralytix, Baltimore, MD and LISTEX P100 phage of EBI Food Safety, Wageningen, the Netherlands) and to treat hides of livestock for *Salmonella* (BacWash phage of Omnilytics, Salt Lake City, UT)(Fortuna *et al.* 2008). In the light of the rapid progress towards more generalized applications of

phages in several fields of antibacterial treatment, by both academic institutions and commercial companies, we briefly will review the nature of phages and the history of phage therapy, with an emphasis on the possibilities and limitations of bacteriophage therapy in human and veterinary medicine, intensive animal farming and food industry.

Phage morphology and biology

Bacteriophages (phages) are viruses that infect Bacteria, being very different from viruses that infect Archaea (Archaeoviruses) and Eukarya (Eukaryoviruses) and the name Bacterioviruses has been recently proposed as scientifically more appropriate (Raoult & Forterre 2008). Phages are basically a genome, mostly between 5 and 50 kbp, which can consist of ssRNA, dsRNA, ssDNA or dsDNA, encapsulated in a protein mantle, possibly with but mostly without lipid envelope. However, 95% of the more than 5000 phages that have been observed by electron microscopy (Ackermann 2003) belong to the dsDNA, non lipid enveloped tailed phages (order Caudovirales), which can be divided – again on the basis of virion morphology - in three families, i.e. Myoviridae (phages with a retractable tail, 25% of the Caudovirales), Siphoviridae (phages with a long flexible tail, 61%) and Podoviridae (phages with a short tail (foot), 14%). According to the infection cycle, Caudovirales can be divided into two groups, which is also of relevance to their applicability as therapeutic agents, i.e. i) the lytic phages with only a lytic cycle, whereby the phage never integrates into the genome of the bacterial host, new infectious phage particles are produced quickly and the host is lysed rapidly to release newly synthesized, infectious phage particles and ii) the temperate phages which can alter between immediate lysis of the host or integration into its genome, whereby the phage genome can be replicated along with bacterial cell duplication during several generations, before re-entering a lytic cycle, usually when the bacterium is exposed to stress conditions. Purely lytic phages are the ones that are used for phage therapy, first because they kill every bacterial cell they infect and second because of safety considerations, since temperate phages tend to promote lateral gene transfer between bacterial cells by a process known as specialized transduction, which could cause antibiotic resistance genes and toxin genes to be carried over between different strains. In fact, this phenomenon is known as phage conversion when naturally occurring phages convert bacteria into true pathogens, e.g. as in the case of *Streptococcus pyogenes* which, when infected with a phage encoding an erythrogenic toxin, can cause scarlet fever. Likewise the Shiga-like toxin of *Escherichia coli*, the diphtheria toxin (*Corynebacterium diphtheriae*) and two of the seven botulin neurotoxins (*C. botulinum*) are phage encoded.

A brief history of phage therapy

The first evidence for a viral-like agent with antibacterial properties was reported in 1896, at which time it was already suggested that phages might help to decrease the incidence of cholera in people using water from the

Ganges (Hankin 1896). Bacteriophages were rediscovered independently by the English microbiologist Frederick Twort in 1915 and by the French-Canadian biologist Felix d'Hérelle in 1917 (d'Hérelle 1917). It was the latter who became the real promoter of phage therapy, carrying out the first clinical experiments in 1920 and applying phages soon thereafter to treat e.g. cholera and pest (d'Hérelle 1925). It is usually forgotten that phages were so well-established during the thirties of the previous century that at that time several bacteriophage cocktails were commercially available, e.g. in France (L'Oréal: Bacté-intesti-phage, Bacté-pyo-phage, Bacté-staphylo-phage) and the USA (Eli Lilly: Colo-lysate, Entero-lysate, Staphylo-lysate). Historically important is the fact that d'Hérelle was invited by George Eliava to the Eliava Institute at Tbilisi, the capital of Georgia in the Caucasus, in 1936, because it was there that phage therapy experience would be preserved until today. Indeed, phage therapy was abandoned completely in the West, for several reasons, i.e. i) the inappropriate use of phages for the treatment of viral infections like herpes and even of symptoms with noninfectious origin like urticaria, obviously leading to failures, ii) the disbelief of some respected scientists like Jules Bordet that phages were viruses – a discussion that was largely lost by d'Hérelle, although he was right about the viral nature of phages, iii) and by the advent of antibiotics from World War II onwards which delivered the fatal blow to phage therapy in Western medicine. Indeed, one of the major differences between phages and antibiotics is the spectrum. Because there are numerous types of bacteriophages each killing only one specific variety or sometimes only a few strains of one or few bacterial species, their spectrum is very limited and successful application requires knowledge of which strains are causing the infection, to enable application of the suited phage clone. On the other hand, antibiotics, exhibiting a much broader spectrum, could be applied blindly, covering most of the pathogenic bacteria (most of them still susceptible to antibiotics at that time!). The rise of antibiotic resistance, which itself is partially a result of the broad spectrum of antibiotics and of their blind and widespread usage, and which in human medicine is especially a problem in hospitals and immunocompromised patients, has gained phages renewed interest.

Safety considerations

Phages can be generally regarded as safe (GRAS)(Burdock & Carabin 2004), both on the basis of theoretical considerations and of empirical and experimental evidence.

Theoretical considerations

- Given the fact that the total number of tailed phage particles on Earth has been calculated to amount to approximately 5×10^{31} , i.e. 10 times the number of bacteria (Bergh *et al.* 1989, Whitman *et al.* 1998), that up to 10^9 phages are present per ml of surface waters, that *E. coli* phages have been

documented in 11% and *B. fragilis* phages in 68% of faeces of healthy persons, it has been stated that 'All the world's a phage' (Hendrix *et al.* 1999) and that "We live in a sea of phages". However, infections with bacteriophages have never been reported.

- In addition, no bacteriophage genes can be found in the human genome, whereas retro-viruses have left hundreds of genes integrated into the human genome.
- Bacteriophages are bacterioviruses (Raoult & Forterre 2008), which have tropism only for bacterial cells, since initial adherence is directed towards typical bacterial ligands, like pili, lipopolysaccharides and peptidoglycane.

Empirical evidence

Although phages are not infecting human cells and can be considered as safe, one can question what happens when phages are applied massively, as is done in phage therapy. Empirical evidence comes from numerous bacteriophage therapy experiences in Georgia, Poland and Russia (Weber-Dabrowska *et al.*, 2000, Fortuna *et al.* 2008). E.g., a 'vaccination' study was carried out in Tbilisi, Georgia, whereby 17.044 children aged between 6 months and 7 years ingested bacteriophages against *Shigella dysenteriae*. No health effects were reported (Babalova *et al.* 1968). During the long history of using bacteriophages as therapeutic agents, bacteriophages have been administered to tens of thousands of humans i) orally, in tablet or liquid formulations (log₅ to log₁₁ bacteriophages/dose), ii) rectally, iii) topically, as rinses and creams: skin, eye, ear, nasal mucosa, burn wounds, iv) as aerosols or intrapleural injections, and v) intravenously, albeit to a lesser extent than the first four methods (Sulakvelidze *et al.* 2001).

Experimental evidence

- Bacteriophages that were manipulated genetically to infect mammalian cells anyway were not able to multiply inside the mammalian cells after infection (Di Giovine *et al.* 2001).
- A few safety reports exist in modern Western science literature. A log₅ dose of *E. coli* T4-bacteriophage particles/ml raw preparations (incl. 2 µg endotoxin/ml) were administered in drinking water to 15 healthy adult volunteers. One day after a single dose exposure, bacteriophages could be recovered in the faeces of the volunteers. No adverse effects were observed and no IgA, IgM or IgG antibodies against T4-bacteriophage were detected one month after administration (Brütting & Brüssow 2005).
- One group in the US has been using since decades intravenous injection of *E. coli* bacteriophage phiX174 to test the influence of different medical preparations on the immune response of patients. E.g. IV injection of log₉ phiX174 bacteriophages/kg body weight was applied twice, in 18 patients with chronic renal failure (Bearden *et al.* 2005). This research

group uses this approach since the early seventies of the previous century without reporting any adverse effects (Ochs *et al.* 1971, Wedgwood *et al.* 1975). And the 'broad spectrum' *S. aureus* phage from the Eliava Institute, covering more than 95% of tested clinical *S. aureus* strains, obviously owes its name (Intravenous *Staphylococcus* Phage) to its intravenous usage in Georgia.

- Numerous animal experiments have failed to establish adverse effects (see also 5. Efficacy). Moreover, Merrill *et al.* (1996) and Capparelli *et al.* (2005) selected bacteriophages for persistence in the mouse circulatory system, indicating that their persistent systemic presence does not pose a problem to mammals.
- In conclusion, bacteriophages are bacterioviruses, specialized on bacteria only and can be considered as safe on the basis of different theoretical considerations and numerous experimental and empirical data, gathered from recent animal experiments, from almost a century of mass applications on humans in Russia and the former Soviet states, especially in Georgia and Poland, and from more recent experiments with humans and animals according to Western science standards.

Efficacy

Well, it is safe. But does it work?

The reports indicating that bacteriophages not only kill off bacteria in vitro, but also are efficient antibacterial agents in vivo are numerous and keep coming in at an increasing rate. Only some examples are given here.

Phages can be used to treat bacteria irrespective of their antibiotic resistance, e.g. mice suffering from bacteremia with vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* could be rescued by bacteriophage therapy (Biswas *et al.* 2002), Wagenaar *et al.* (2005) were able to reduce *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chickens in the Netherlands, Huff *et al.* (2003) showed high efficacy of phages when *E. coli* respiratory infection in broiler chickens was treated early and Sheng *et al.* (2006) could reduce *E. coli* O157:H7 levels in mice and ruminants.

Diarrhoea causing *E. coli* in mice, calves, lambs and piglets could be reduced from log₇ to log₂ in 2 hours, abolishing the associated fluid loss and with survival of all treated animals (Smith & Huggins 1983). Intramuscular injection (single) in one leg with bacteriophage MW to treat intramuscular *E. coli* infection in the other leg in mice was found to be more effective than multiple IM administration of antibiotics (Smith & Huggins 1982). Series of 5 mice, intraperitoneally infected with 5 times the LD₅₀ dosis (i.e. log₈ cfu/ml) of *A. baumannii* respectively *P. aeruginosa*, were treated with different doses of bacteriophages, i.e. log₈ pfu of bacteriophage BS46 for *A. baumannii* respectively log₇ pfu of bacteriophage BS24 for *P. aeruginosa*. In both series 4/5 mice survived, whereas in series with lower doses of phage or no bacteriophage, all mice died (Soothill 1992).

Currently, there is a vast literature of experimentation and application in intensive animal farming and food industry.

Differences between antibiotics and phages and consequences for applicability

Stability vs flexibility

Whereas antibiotics are molecules which can be produced in a uniform manner, resulting in a pure and rigidly defined product, phages are evolvable, which can result in changed composition and properties of the product. This has advantages as well as disadvantages. Whereas antibiotics are molecules with fixed activity against a certain range of bacteria, no longer applicable once resistance against the compound has been developed, phages might adapt *in vivo* or can be trained *in vitro* to overcome developing phage resistance in bacteria, to increase their efficacy against certain strains or to change and broaden their spectrum.

The drawback of phage evolvability is that the production process of phages will need to be highly standardized and strictly controlled by checking the activity and spectrum of each new batch. Higher reproducibility might be achieved not only by standardizing the culture conditions but also by starting from frozen aliquots of the same phage and the same bacterial host stocks. The production of bacteriophage cocktails (see also 6.2. Spectrum and 6.4. Resistance), containing phages of mixed origin and propagated on different bacterial hosts, may require even more quality control stringency.

Spectrum

One of the initial advantages of antibiotics over phages was the broad spectrum of the former, but there are also intrinsic disadvantages like disturbance of the commensal microflora and vulnerability of the antibiotics to the development of bacterial resistance. The narrow spectrum of phages precludes adverse effects for the commensal microflora and there is little risk for bacterial cross-resistance, i.e. of inducing resistance in bacteria not aimed at, which can later be horizontally transferred (by transduction, transconjugation or transformation) to the pathogens initially aimed at. The restraints of the narrow spectrum have been overcome to some degree by the usage of bacteriophage cocktails, composed of phages with different spectra, which also can overlap and as such in addition also may preclude the development of resistance (see also 6.4. Resistance). Still, the spectrum remains limited to one or a few related species at the best.

It should be mentioned that broad spectrum phages exist, like *S. aureus* phage ISP (Eliava Institute), which infects 95% of *S. aureus* strains. On the other hand, currently there are no active phages available against e.g. some *P. aeruginosa* isolates.

Pharmacokinetics and immune respons

In theory one single dose of phages can be sufficient to treat an infection, because phages can be amplified in vivo as a result of the lytic cycle, although 'killing from without' (see below) may probably be of equally important relevance to explain the bacteriolytic activity of phages.

Interestingly, the *A. baumannii* phage titer in the study of Soothill (1992) (See also 5. Efficacy) had increased 100-fold, proving that phages can actively replicate in vivo, pointing to another difference with antibiotics which can only diminish in concentration after administration, due to diffusion and degradation. Theoretically, only a limited number phages should be added, whereafter they multiply as they infect more and more bacteria. On the other hand, the fact that high doses were needed in this study, and also give more efficient killing of bacteria in most other studies, indicate that much of the killing by phages may not be through the lytic infection process, but by a phenomenon named 'killing from without', whereby bacteria are attacked simultaneously by numerous phages, leading to the desintegration of their cell wall. Killing from without yields no amplification of phages, but may act even faster than lytic infection.

In addition, many phages easily pass the blood brain barrier (Dabrowska *et al.* 2005), which is problematic for many antibiotics. Also, phage transfer to other individuals – not a possibility for antibiotics - is possible, e.g. by carry over of infected bacterial cells between animals, which could prove to be an asset for treatment in closed environments like stables by 'vaccination' of neighbouring animals.

A related issue, which may influence pharmacokinetics of phages, but not of antibiotics, is the development of antibodies to phages. This will probably be strongly dependent on the way, duration of administration and on the phage as well as on the individual animal host, because reports are quite varied from no antibody production after prolonged circulation (Merril *et al.* 1996) to the application of phages exactly to study the immune respons (Ochs *et al.* 1971, Bearden *et al.* 2006).

Finally, phages can be trained in vivo to circulate in the body tissues for prolonged time (Merril *et al.* 1996), a property that in one case could be traced back to a single amino acid substitution in a capsid protein (Vitiello *et al.* 2005). More research, using different administration routes and durations and different phages, is needed here.

Antibiotic vs phage resistance

The currently known mechanisms for bacteria to develop resistance against phage infection are mutation of cell wall receptors which are used by phages as adherence ligand and of DNA methylation/restriction enzymes, whereby foreign DNA, including that of phages not correctly methylated, is digested. Infection and lysogeny (chromosomal insertion) with temperate phages may provide immunity to infection with other phages as well. And a

Dutch group just published another mechanism, reminiscent of antiviral defense in eukaryotes (Brouns *et al.* 2008). Whereas resistance to antibiotics is rather absolute, phages are more flexible: cell wall receptor and methylation pattern mutated bacteria may become susceptible for other phages, new active phages can be searched for in nature or existing phages can be trained to adopt to the new bacterial mutants, and finally phages can co-evolve in vivo, as they do since 4 billion years.

Also it has been observed that resistance development to phages may decrease bacterial virulence. E.g., *E. coli* K1-phages induce phage-resistant *E. coli*, but these strains are K1 negative, which strongly reduces the virulence of these mutants (Smith & Huggins 1982).

A major strategy to simultaneously broaden the spectrum and avoid the development of resistance has been the usage of bacteriophage cocktails, composed of different phages with different and partially overlapping spectra. When such a cocktail contains multiple phages active against a bacterial strain, the bacterium needs to develop resistance at once against two or more different phages, highly reducing the chance of resistance development. This is reminiscent of antibiotic combination therapy.

It is important to emphasize that antibiotic resistance and phage resistance are unrelated phenomena, which means that phages can be highly active against multi drug resistant bacteria. E.g., the *S. aureus* phage ISP from the Eliava Institute, not only infects 95% of clinical *S. aureus* isolates, it also kills efficiently most MRSA isolates. This may prove to be of utmost importance in the near future, given the frequent occurrence of community acquired MRSA, which is more pathogenic than the well-known nosocomial MRSA, in pig farmers (de Neeling *et al.* 2007, Huijsdens *et al.* 2006, Khanna *et al.* 2008, van Duijkeren *et al.* 2008) and veterinary practitioners (Moody *et al.* 2008).

It is not unthinkable that the application of phages may select for 'naturally' phage resistant bacterial strains, just as antibiotics have selected for not so pathogenic but naturally multiresistant bacteria with high adaptability, like *A. baumannii*, *P. aeruginosa* and *Stenotrophomonas maltophilia*. On the other hand it is noteworthy that some phages, like *S. aureus* ISP which has been used massively in Georgia since decades, remain active without apparent resistance problems.

Finally, phages should not be considered as pure alternatives or competitors of antibiotics. One could think of using them as an addition to antibiotics, as has been done (Lazareva *et al.* 2001, Marza *et al.* 2006), thus confronting bacteria with different and unrelated attacks, further decreasing the possibility of bacteria to develop resistance to either kind of treatment. Although one could expect antagonistic effects, whereby the growth reduction rate caused by antibiotics may decrease the propagation possibilities for bacteriophages, synergy has been shown to occur (Comeau *et al.* 2007).

Lateral gene transfer caused by antibiotics and phages

Lytic phages are used for phage therapy to avoid lateral gene transfer by specialized transduction with temperate phages (See 2. Phage morphology and biology), but lateral gene transfer could be caused - albeit rather exceptionally - by lytic phages as well by a process known as generalized transduction. On the other hand, this biosafety problem should not be overemphasized. First, our commensal bacteria and phages continuously interact in our body, possibly causing more lateral gene transfer than therapeutically added phages. Moreover, it has been overlooked that antibiotics can cause increased lateral gene transfer as has been discovered recently to be the case for *Streptococcus pneumoniae*, which becomes hyper-transformable - i.e. becomes able to take up DNA from killed bacteria - after treatment with aminoglycoside and quinolone antibiotics (Prudhomme *et al.* 2006). And of course, transfer of plasmids with multi-drug resistance gene cassettes is also promoted by selective pressure caused by antibiotic administration. In fact, we have been using antibiotics since more than half a century, without caring too much about their induction and promotion of lateral gene transfer.

Treatment opportunities for phages

Chronic infection

In Western human medicine, but maybe not so relevant to animal farming, several important infectious diseases nowadays turn out to be of a chronic nature, related to the formation of biofilm, as can be concluded from the public announcement of the US National Institute of Health: "Biofilms are medically important, accounting for over 80% of microbial infections in the body" (Davies 2003). Examples of chronic infections, which have been shown to be related to biofilm formation are infection of airways in cystic fibrosis patients with *P. aeruginosa*, chronic otitis media with *Haemophilus influenzae*, burn wound infection with *P. aeruginosa* and *S. aureus*, foreign object infections (catheters, valves, prostheses), predominantly with *Staphylococcus* spp., acne by *Propionibacterium acnes*, recurrent urinary tract infection with uropathogenic *Escherichia coli* and even recurrent bacterial vaginosis, predominantly with *Gardnerella vaginalis* and *Atopobium vaginae* (Swidsinski *et al.* 2005). Interestingly, antibiotic treatment may be effective in treating acute exacerbations in these diseases, but is unable to eradicate the bacteria inside the biofilms for reasons of reduced accessibility and altered metabolism of the bacteria, which may remain susceptible to antibiotics when tested *in vitro*. Bacteriophages have been shown to be equipped with polysaccharide depolymerases which enable them to break through the alginate layers that may protect biofilms from antibiotics and to reach bacteria inside biofilms (Hughes *et al.* 1998, Hanlon *et al.* 2001) and may be promising in the treatment of biofilm associated chronic infections

(Azeredo & Sutherland 2008). With regard to the applicability of bacteriophages, chronic infections offer the additional advantage that there is time to find the most efficient phages or cocktails, because the patient is not acutely ill.

Food decontamination

Several food products, like carcasses (contamination with *Salmonella* and *Campylobacter*) and dairy products like cheese (contamination with *Listeria*) and some animals prior to slaughter need antibacterial treatment. Decontamination with phages may be appealing compared to decontamination with antibiotics, because phages can be regarded as safe whereas it is generally accepted that the presence of certain antibiotics in food is not advisable for consumption, especially by infants and pregnant women, due to possible health effects of antibiotics and because the presence of low dose antibiotics in food may elicit the development of antibiotic resistance in bacteria present in the consumer. Food decontaminated with phages might be consumed without delay.

Decontamination of herds or stables

When phage production can be achieved at a low cost, it may be appealing to treat stables, flocks and herds with phages against specific bacteria, e.g. for eradication of *Salmonella* and *Campylobacter* in broiler chickens or eradication of *S. aureus* (including MRSA) in cattle herds and from pigs. However, this probable economic advantage should be considered in the light of limitations it can cause for the use of the same phages to treat infections in humans, because of the possible development of resistance, reminiscent of the since 1999 forbidden use of the glycopeptide avoparcine, of bacitracin, of the macrolides spiramycin and tylosin and of the streptogramin virginiamycin as growth promoting feed additives in life stock (Philips 2007), which possibly led to e.g. the occurrence and increase of vancomycine resistant enterococci, no longer treatable with this glycopeptide in human medicine (see also 8. Regulatory considerations).

Regulatory considerations

The current European regulatory framework for medicinal products (Commission Directive 2003/63/EC) does not clearly position phage therapy. This complicates the initiation of European human phage therapy studies (Directive 2001/20/EC of the E.P. and of the Council, Commission Directive 2005/28/EC). Also the more recently published texts, e.g. EC Regulation No 1394/2007 on “Advanced Therapy Medicinal Products” do not diminish the ambiguous situation. Bacteriophages are not viruses of the kind that are dealt with in the chapter of ‘Gene therapy’, neither is it possible to compare phages with maggots and leeches, dealt with in the chapter on ‘Biologicals’. At the end of 2007, this group submitted a bacteriophage study file for human experiments to obtain approval by a Belgian ‘leading medical

ethical committee', i.e. that of the Vrije Universiteit Brussel (Merabishvili *et al.* In press). We were initially forwarded to the Belgian National Biosafety Council (B.S. 14.07.1998, adaptation of Directive 90/220/EEC), to obtain advice regarding the biological risk of this study for the environment. Division 1 article 5 of B.S. 14.07.1998 stipulates that the Council should i) evaluate the biosafety of products for which genetically modified organisms or parts thereof are being used according to the conditions of the international regulations and ii) to guarantee the biosafety of the limited use of human pathogenic microorganisms or parts thereof. In fact, the task of the Belgian National Biosafety Council is to advise the authorities with regard to the admissibility of introducing 'genetically modified organisms' in the environment. We had to argue extensively to convince the Ethical Committee that consultation of the Council was not relevant. This contrasts with the way phages can be used to spray food or with the way study protocols for the agrobio industry, including mass application of phages, are treated. There seems to be barely reflection on considerations like what the effect might be of large scale (uncontrolled) usage of bacteriophage cocktails in these sectors, what about the development of resistance and how this can jeopardize the use of phages in human medicine, and to what extent it is possible that the environmental microbiological equilibrium is drastically, and possibly irreversibly, disturbed.

Cost estimates

The production of phages requires fermentation equipment to grow large numbers of bacteria which can be infected by phages. With modern facilities this should be no problem, considering that in e.g. Georgia thousands of litres of bacteriophages could be produced annually until the eighties of the previous century, even with limited means. Harvesting phages, purifying them from bacterial contaminants, may be a more important cost, especially when it has to be carried out on a large scale. But costs will especially be determined by the quality control measures of the phage product and on how strict this quality control will have to be. This in turn will be determined by the regulatory offices. To what extent will the phages have to be documented, e.g. will phages need to be sequenced? How many individual phages per control? Will this have to be repeated for every new production batch? Will endotoxin purification and attestation of endotoxin purity be required? The answers to these and many other issues (Merabishvili *et al.* in press, Verbeken *et al.* 2007) will determine the final cost, which is therefore difficult to predict.

References

- Ackerman H-W. 2003. Bacteriophage observations and evolution. *Res Microbiol* 154: 245-251.
- Adhya S and C. Merrill. 2006. The road to phage therapy. *Nature* 443: 75.
- Azeredo J, Sutherland IW. 2008. The use of phages for the removal of infectious biofilms. *Curr Pharm Biotechnol* 9: 261-266.
- Babalova EG, Katsitadze KT, Sakvarelidze LA, Imniashvili NS, Sharashidze TG, Badashvili VA, Kiknadze GP, Meipariani AN, Gendzekhadze ND, Machavariani EV, Gogoberidze KL, El Gozalov, Dekanosidze NG. 1968. Preventive value of dried dysentery bacteriophage. *Zh Mikrobiol Epidemiol Immunobiol* 2: 143-145.
- Barrow PA, Soothill JS. 1997. Bacteriophage therapy and prophylaxis: rediscovery and renewed assessment of potential. *Trends Microbiol* 5: 268-271.
- Bearden CM, Agarwal A, Book BK, Vieira CA, Sidner RA, Ochs HD, Young M, Pescovitz MD. 2005. Rituximab inhibits the in vivo primary and secondary antibody response to a neoantigen, bacteriophage phiX174. *Am J Transplant* 5: 50-57.
- Bergh O, Børsheim KY, Bratbak G, Heldal M. 1989. High abundance of viruses found in aquatic environments. *Nature* 340: 467-468.
- Biswas B, Adhya S, Washart P, Paul B, Trostel AN, Powell B, Carlton R, Merrill CR. 2002. Bacteriophage therapy rescues mice bacteremic from a clinical isolate of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. *Infect Immun* 70: 204-210.
- Brouns SJJ, Jore MM, Lundgren M, Westra ER, Slijkhuis RJH, Snijders APL, Dickman MJ, Makarova KS, Koonin EV, van der Oost J. 2008. Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321: 960-964.
- Brüttin A, Brüssow H. 2005. Human volunteers receiving *Escherichia coli* phage T4 orally: a safety test of phage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 49: 2874-2878.
- Burdock GA, Carabin IG. 2004. Generally recognized as safe (GRAS): history and description. *Toxicol Lett* 150: 3-18.

Capparelli R, Ventimiglia I, Roperto S, Fenizia D, Iannelli D. 2005. Selection of an *Escherichia coli* O157:H7 bacteriophage for persistence in the circulatory system of mice infected experimentally. *Clin Microbiol Infection* 12: 248-253.

Chanishvili N, Chanishvili T, Tediashvili M, Barrow PA. 2001. Phages and their application against drug-resistant bacteria. *J Chem Technol Biotechnol* 76: 689-699.

Comeau AM, Tétart F, Trojet SN, Prère M-F, Krisch HM. 2007. Phage-antibiotic synergy (PAS): beta-lactam and quinolone antibiotics stimulate virulent phage growth. *PLoS ONE* 8: e799.

Commission Directive 2003/63/EC of 25 June 2003 amending Directive 2001/83/EC of the European Parliament and the Council of the Community code relating to medicinal products for human use, published in the Official Journal of the European Union on 27.06.2003 (translated into Belgian Law by Royal Decree of 04.03.2004, published in the Belgian Official Journal on 10.03.2004).

Directive 2001/83/EC of the European Parliament and of the Council of 6 November 2001 on the Community code relating to medicinal products for human use, published in the Official Journal of the European Communities on 28.11.2001 (translated into Belgian Law by Royal Decree of 04.03.2004, published in the Belgian Official Journal on 10.03.2004).

Dabrowska K, Swiata-Jelen K, Opolski A, Weber-Dabrowska B, Gorski A. 2005. Bacteriophage penetration in vertebrates. *J Appl Microbiol* 98: 7-13.

Davies D. 2003. Understanding biofilm resistance to antibacterial agents. *Nat Rev Drug Discov* 2: 114-122.

de Neeling AJ, van den Broek MJ, Spalburg EC, van Santen-Verheul MG, Dam-Deisz WD, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E, Huijsdens XW. 2007. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet Microbiol* 122: 366-372.

Di Giovine M, Salone B, Martina Y, Amati V, Zambruno G, Cundari E, Failla CM, Saggio I. 2001. Binding properties, cell delivery, and gene transfer of adenoviral penton based displaying bacteriophage. *Virology* 282: 102-112.

d'Hérelle F. 1917. Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *Acad Sci Ser D* 165: 373.

- d'Hérelle F. 1925. Essai de traitement de la peste bubonique par le bactériophage. *La Presse Med.* 33: 1393-1394.
- Fortuna W, Miedzybrodzki R, Weber-Dabrowska B, Górski A. 2008. Bacteriophage therapy in children: facts and prospects. *Med Sci Monit* 14: 126-132.
- Hankin EH. 1896. L'action bactericide des Eaux de la Jumna et du Gange sur le vibron du cholera. *Ann Inst Pasteur* 10: 511.
- Hanlon GW, Denyer SP, Olliff CJ, Ibrahim LJ. 2001. Reduction in exopolysaccharide viscosity as an aid to bacteriophage penetration through *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol* 67: 2746-2753.
- Häusler T. 2006. Viruses vs. Superbugs. Macmillan. ISBN: 1403987645.
- Hendrix RW, Smith MCM, Burns RN, Ford ME, Hatfull GF. 1999. Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: All the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2192-2197.
- Hughes KA, Sutherland IW, Jones MV. 1998. Biofilm susceptibility to bacteriophage attack: the role of phage-borne polysaccharide depolymerase. *Microbiol* 144: 3039-3047.
- Huijsdens XW, van Dijke BJ, Spalburg E, van Santen-Verheuevel MG, Heck ME, Pluister GN, Voss A, Wannet WJ, de Neeling AJ. 2006. Community-acquired MRSA and pig-farming. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 5: 26.
- Khanna T, Friendship R, Dewey C, Weese JS. 2008. Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* colonization in pigs and pig farmers. *Vet Microbiol* 128: 298-303.
- Kutter E, Sulakvelidze A. 2005. Bacteriophages Biology and Applications. CRC Press Boca Raton, Florida.
- Krylov VN. 2001. Phage therapy in terms of bacteriophage genetics: hopes, prospects, safety, limitations. *Russian J Genetics* 37: 869-887.
- Lazareva E, Smirnov S, Khvatov V, Spiridonova T, Bitkova E, Darbeeva V, Maiskaia L. 2001. Efficiency of bacteriophages in complex treatment of patients with burn wounds. *Antibiot Khimioter* 46: 10-14.
- Marza JAS, Soothill JS, Boydell P, Collins TA. 2006. Multiplication of therapeutically administered bacteriophages in *Pseudomonas aeruginosa* infected patients. *Burns* 32: 644-646.

- Matsuzaki S, Rasbel M, Uchiyama J. 2006. Bacteriophage therapy: a revitalized therapy against bacterial infections diseases. *J Infect Chemother* 11: 211-219.
- Merabishvili M, Pirnay J-P, Verbeken G, Chanishvili N, Tediashvili M, Lashkhi N, Krylov V, Mast J, Van Parys L, Lavigne R, Volckaert G, Mattheus W, Verween G, De Corte P, Jennes S, Zizi M, De Vos D, Vaneechoutte M. 2008. Small-scale production of a bacteriophage cocktail for therapeutic use, in accordance with actual legal, ethical and quality assurance standards. *J. Virol. Methods*: In press.
- Merril CR, Biswas B, Carlton R, Jensen NC, Creed GJ, Zullo S, Adhya S. 1996. Long-circulating bacteriophage as antibacterial agents. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 3188-3192.
- Merril CR, Scholl D, Adhya SL. 2003. The prospect for bacteriophage therapy in Western medicine. *Nature Reviews/Drug Discovery* 2: 489-497.
- Moodley A, Nightingale EC, Stegger M, Nielsen SS, Skov RL, Guardabassi L. 2008. High risk for nasal carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among Danish veterinary practitioners. *Scand J Work Environ Health* 34: 151-157.
- Ochs HD, Starkey DD, Wedgwood RJ. 1971. Immunologic responses to bacteriophage phiX174 in immunodeficiency diseases. *J Clin Invest* 50: 2550-2558.
- Philips J. 2007. Withdrawal of growth-promoting antibiotics in Europe and its effects in relation to human health. *Int J Antimicrob Agents* 30: 466-468.
- Prudhomme M, Attaiech L, Sanchez G, Martin B, Claverys J-P. 2006. Antibiotic stress induces genetic transformability in the human pathogen *Streptococcus pneumoniae*. *Science* 313: 89-92.
- Raoult D, Forterre P. 2008. Redefining viruses: lessons from Mimivirus. *Nature Rev Microbiol* 6: 315-319.
- Sheng H, Knecht HJ, Kudva IT, Hovde CJ. 2006. Application of bacteriophages to control intestinal *Escherichia coli* O157:H7 levels in ruminants. *Appl Environ Microbiol* 72: 5359-5366.
- Smith WH, Huggins MB. 1982. Successful treatment of experimental *Escherichia coli* infections in mice using phage: its general superiority over antibiotics. *J Gen Microbiol* 128: 307-318.
- Smith WH, Huggins MB. 1983. Effectiveness of phages in treating experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves, piglets and lambs. *J Gen Microbiol* 129: 2659-2675.

Smith HW, Huggins MB, Shaw KM. 1987. The control of experimental *Escherichia coli* diarrhoea in calves by means of bacteriophages. *J Gen Microbiol* 133: 1111-1126.
Soothill JS. 1992. Treatment of experimental infections of mice with bacteriophages. *J Med Microbiol* 37: 258-261.

Sulakvelidze A, Alavidze Z, Morris Jr. JG. 2001. Bacteriophage therapy. *Antimicrob Agents Chemother* 45: 649-659.

Swidsinski A, Mendling W, Loening-Baucke V, Ladhoff A., Swidsinski S, Hale LP, Lochs H. 2005. Adherent biofilms in bacterial vaginosis. *Obstetr Gynecol* 106: 1013-1023.

van Duijkeren E, Ikawaty R, Broekhuizen-Stins MJ, Jansen MD, Spalburg EC, de Neeling AJ, Allaart JG, van Nes A, Wagenaar JA, Fluit AC. 2008. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains between different kinds of pig farms. *Vet Microbiol*. 126: 383-389.

Verbeken G, De Vos D, Vanechoutte M, Merabishvili M, Zizi M, Pirnay J-P. 2007. The European regulatory conundrum of phage therapy. *Future Microbiol* 2: 485-491.

Vitiello CL, Merrill CR, Adhya S. 2005. An amino acid substitution in a capsid protein enhances phage survival in mouse circulatory system more than 1000-fold. *Virus Res* 114: 101-103.

Wagenaar JA, Van Bergen MA, Mueller MA, Wassenaar TM, Carlton RM. 2005. Phage therapy reduces *Campylobacter jejuni* colonization in broiler chickens. *Vet Microbiol* 19: 275-283.

Weber-Dabrowska B, Mulczyk M, Gorski A. 2000. Bacteriophage therapy of bacterial infections: an update of our institute's experience. *Arch Immunol Therap Experiment* 48: 547-551.

Wedgwood RJ, Ochs HD, Davis SD. 1975. The recognition and classification of immunodeficiency diseases with bacteriophage phiChi 174. *Birth Defects Orig Artic Ser* 11: 331-338.

Whitman WB, Coleman DC, Wiebe WJ. 1998. Prokaryotes: the unseen majority. *PNAS* 95: 6578-6583.

Other relevant sources

FDA 21 CFR Part 172 (Federal Register / Vol. 71, No. 160 / Friday, August 18, 2006 / Rules and Regulations / 47729-32): Food Additives Permitted for Direct Addition to Food for Human Consumption; Bacteriophage

Preparation.

<http://www.voedingscentrum.nl/NR/rdonlyres/4E6011C9-7FED-47B4-A31A-EDA304693947/o/ASSESSMENTREPORT061110.pdf>

Häusler T. 2008. Literature list on phages. <http://www.bacteriophage-therapy.info/ECF40946-8E2F-4890-9CA6-D390A26E39C1/Phage%20therapy%20literature.html>

Fytobiotica

Kader en maatschappelijke relevantie

Wereldwijd is er in de laatste jaren een zorgwekkende toename van resistentie van bacteriën tegen antibiotica vastgesteld. De Wereldgezondheidsorganisatie constateert met name de toename van fatale longinfecties (*Streptococcus pneumoniae*), tuberculose (*Mycobacterium tuberculosis*), ernstige darmaandoeningen door resistente *Salmonella*, *Campylobacter* en *E.coli* species en huidaandoeningen of problemen bij de wondgenezing door de MRSA bacterie (methicilline-resistente *Staphylococcus aureus*) (WHO, 2002). Het risico voor het optreden van deze resistente bacteriën is gerelateerd aan de intensiteit van de toepassing van antibiotica. In het begin werden multiresistente kiemen voornamelijk in ziekenhuizen en medische centra aangetroffen. Recent onderzoek heeft echter de aandacht gevestigd op het risico dat bacteriën (MRSA en anderen), die door het gebruik van antibiotica bij dieren resistent zijn geworden, overgedragen kunnen worden op de mens. Deze overdracht kan plaatsvinden via direct contact met huisdieren zoals honden of tijdens het verzorgen van dieren (landbouwhuisdieren). Overdracht via voedsel, dat besmet is met resistente bacteriën lijkt eveneens mogelijk (EFSA, 2008).

Onderzoek in Nederland en elders heeft een toename in de verspreiding van de MRSA bacterie bij varkens en varkenshouders maar ook bij pluimvee, runderen en paarden en honden aangetoond. Deze bevindingen zijn gedocumenteerd in de MARAN-rapporten, die de resultaten van het monitoring-programma van het gebruik van antibacteriële middelen in dieren en de antibacteriële resistentie in bacteriën uit dieren en dierlijke producten in Nederland sinds 2002 regelmatig samenvatten. De gevolgen

van het aantonen van de MRSA bacterie zijn divers: door het mogelijke risico voor de volksgezondheid dat verbonden is aan het optreden van deze bacteriën is het imago van de veehouderij beschadigd en vragen consumenten om garanties voor de veiligheid van voedsel van dierlijke oorsprong. Ook de persoonlijke situatie van varkenshouders en hun families, die dragers van de MRSA-bacterie zijn, staat ter discussie. Er zijn beperkingen gekomen voor de toegang tot ziekenhuizen, omdat patiënten aldaar ontvankelijker zijn voor infecties door MRSA bacteriën. Deze situatie heeft tenslotte tot de vraagstelling geleid, of en hoe het gebruik van antibiotica in de veehouderij te verminderen is, en welke alternatieven voor antibiotica ter beschikking staan.

Het bestrijden van infectieziekten: voorkomen is beter dan genezen

De ontwikkeling van antibiotica aan het begin van de 20^{ste} eeuw was een van de belangrijkste mijlpalen in de medische zorg, omdat hierdoor bacteriële infecties, die vaak levensbedreigend voor mens of dier waren, behandeld konden worden. Voor de behandeling van acute bacteriële infecties zijn antibiotica tot op heden onmisbaar. Om het optreden van resistentie bij bacteriën te vermijden, zullen de regels voor een terughoudend antibiotica gebruik (*prudent use*) aangescherpt moeten worden en de toepassing en het voorschrijven voorbehouden blijven aan ziektegevallen met een duidelijke diagnose. In de commerciële dierhouderij worden (en moeten) antibiotica tegenwoordig echter ook ter preventie van ziekten in de vorm van koppelbehandelingen toegepast. Daarnaast worden zij echter in sommige gevallen ter verbetering van slechte hygiënische omstandigheden en managementproblemen ingezet. Deze toepassing in een relatief lage dosis is onwenselijk en waarschijnlijk één van de belangrijkste veroorzakers voor de toename van resistente bacteriënpopulaties bij dieren. Voor dit ongewenst gebruik dat in de laatste jaren duidelijk is toegenomen, moeten op korte termijn alternatieven worden ontwikkeld.

De mogelijkheden om door genetische selectie, verbetering van houderijvormen en optimalisering van de voeding en bedrijfshygiëne het infectierisico en het optreden van infectieziekten te verminderen, waardoor ook het gebruik van antibiotica zal afnemen, werden reeds in de beleidsnota Nationale Agenda Diergezondheid (Nationale Agenda Diergezondheid 2007-2015: Voorkomen is beter dan genezen; Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, Oktober, 2007) genoemd, en zullen hier niet verder toegelicht worden.

Alternatieven voor antibiotica

Het wetenschappelijke onderzoek naar mogelijke alternatieven voor het gebruik van antibiotica in de hedendaagse commerciële dierhouderij kent drie verschillende speerpunten, die onafhankelijk zijn van onderzoeksacti-

viteiten naar nieuwe antibiotica, die volgens bekende mechanismen werken.

Antimicrobiële peptiden

Alle vertebraten (gewervelde), invertebraten, planten en schimmels beschikken over antimicrobiële peptiden (AMP) als een onderdeel van hun natuurlijke afweersysteem. Deze peptiden, die in het algemeen uit 10 – 50 aminozuren bestaan, worden in het Engels aangeduid als defensins. De meest veelbelovende groep zijn kationische peptiden, omdat deze een breed antimicrobieel spectrum tegen gram-positieve en gram-negatieve bacteriën, tegen schimmels, en sommige virussen en parasieten bezitten. Tot nu toe zijn meer dan 1300 van dergelijke peptiden geïdentificeerd, die de groei van bacteriën op zeer verschillende manieren kunnen remmen, b.v. door lysis van de celwand of door interacties met signaalmoleculen (Hermoso et al., 2007). Talloze farmaceutische bedrijven hebben een of meerdere van deze peptiden in ontwikkeling voor toepassing in de humane geneeskunde. Het mag worden verwacht, dat op langere termijn dergelijke kationische peptiden ook voor diergeneeskundige toepassingen ter beschikking komen. Op dit moment is echter nog niet duidelijk of bacteriën ook tegen deze peptiden resistentiemechanismen kunnen ontwikkelen.

Naast de groep van kationische peptiden werden diverse enzymen op hun mogelijke therapeutische toepassing ter bestrijding van bacteriële infectieziekten onderzocht. Deze enzymen tasten de integriteit van de bacteriële celwand van gram-positieve micro-organismen aan, die uit peptidoglycaanmoleculen bestaat. Zij worden derhalve ook aangeduid als BCWHs (bacterial cell wall hydrolases). De eerste groep van BCWHs waren de virolysinen (heden als endolysinen aangeduid), enzymen die door bacteriofagen worden gevormd. Bacteriële BCWHs worden als autolysinen en BCWHs van eukaryoten (planten en dieren) worden als lysozymen beschreven. Tegen lysozymen kunnen gram-positieve bacteriën resistentie ontwikkelen (Gordon et al., 2005). Een andere groep van eiwitten is de z.g. lantibiotica (lantionine-containing antibiotica) groep. Zij schakelen het lipide II uit, een essentieel structurelement van de celwand van gram-negatieve bacteriën (Willey and Van der Donk., 2007).

Gezien de chemische eigenschappen (de stabiliteit van dergelijke peptiden is beperkt) en het risico dat tegen deze stoffen resistentie kan ontstaan, is de groep van antimicrobiële peptiden minder aantrekkelijk om als alternatieven voor conventionele antibiotica in de veehouderij te worden toegepast.

Probiotica en prebiotica

De term probiotica verwijst naar micro-organismen die voor de gastheer, de mens of het dier, wenselijk zijn; de term prebiotica naar stoffen, die de groei van deze wenselijke bacteriën b.v. in de darm van de gastheer kunnen bevorderen (Shanahan, 2004). Het meest bekende voorbeeld voor een probioticum zijn lactobacillen, die *van nature* in bepaalde zuivelproducten voorkomen en het melkzuur produceren. Hierdoor verandert de pH waarde in hun leefomgeving, waardoor andere (pathogene) micro-organismen zich niet meer kunnen vermenigvuldigen of zelfs gedood worden. Onderzoek heeft echter aangetoond, dat niet alleen melkzuurbacteriën maar ook talloze andere micro-organismen een positief effect op de gezondheidsstatus van dieren (en mensen) hebben. Het werkingsmechanisme is niet voor alle probiotica precies bekend. Bediscussieerd worden de productie van bactericinen (antibiotica-achtige stoffen die andere bacteriën remmen), de remming van de aanhechting van pathogenen aan darmcellen (een voorwaarde voor de invasie van bacteriën en de productie van bacteriële toxinen). De directe competitie tussen probiotica en pathogenen (aangeduid als *competitive exclusion*), wordt echter als een van de meest belangrijke positieve effecten van probiotica gezien. Tevens moduleren probiotica de reactiviteit van het immuunsysteem in de darm. Het intestinale immuunsysteem speelt een zeer belangrijke rol voor de algehele immunologische immuun-competentie (lichaamseigen afweer) van mens en dier. Onderzoek heeft aangetoond dat door de toediening van probiotica de productie van pro-inflammatoire signaalstoffen (cytokinen) verminderd wordt, terwijl een toename van de productie van lichaamseigen anti-inflammatoire cytokinen gemeten kan worden. Dit mechanisme lijkt te verklaren, waarom probiotica niet alleen een positief effect op de darmflora en ontstekingsprocessen in de darm hebben, maar ook tot verlichting van de symptomen bij andere ziekten leiden, die door ontstekingsreactie gekenmerkt zijn, zoals artritis en huidaandoeningen.

Prebiotica zijn gedefinieerd als niet-verteerbare voedselcomponenten, die een positieve werking op mens en dier uitoefenen door stimulatie van een of meer bacteriesoorten (meestal lactobacillus en bifidobacter species) in de dikke darm (colon), waardoor een toename van de productie van kleine vetzuren zoals boterzuur, een pH-verlaging en preventie van de adhesie van pathogenen gemeten kan worden (Bengman, 2005). De gecombineerde toepassing van pro- en prebiotica wordt als synbiotische toediening beschreven.

Ondanks het feit dat de werkingsmechanismen van probiotica en prebiotica zeker niet geheel bekend zijn, kan worden gesteld dat deze een positief effect op de darmflora uitoefenen en deze in balans houden, waardoor een positief effect op het immuunsysteem tot stand komt (Geier et al., 2007). Zodoende kunnen probiotica en prebiotica een duidelijke bijdrage aan het voorkomen van ziekten leveren en ontstekingsprocessen in de darm

verminderen, waardoor de opname van nutriënten (voederconversie) verbetert. Een therapeutische toepassing ter behandeling van acute infectieziekten is niet mogelijk.

In Europa zijn talloze pro- en prebiotica door de EFSA (FEEDAP Panel) op hun effectiviteit en veiligheid beoordeeld en geregistreerd door opname in het Communautaire Repertorium voor Toevoegingmiddelen op basis van de Verordening EG/1831/2003. Probiotica en prebiotica zijn slechts tijdelijk werkzaam. Hierdoor is het noodzakelijk deze dagelijks (via het voer of drinkwater) toe te dienen. De hieraan verbonden kosten (die hoger zijn dan een toediening van antibiotica in een lage dosis) weerhouden echter veehouders vaak om deze middelen toe te passen.

Secundaire plantenmetabolieten: fytobiotica

Traditioneel werden planten in de vorm van kruidenmengsels of kruidenthees toegepast ter voorkoming en behandeling van uiteenlopende gezondheidsklachten waaronder infectieziekten. Het gebruik is vaak gebaseerd op ervaring en mist in veel gevallen een goede wetenschappelijke onderbouwing. Bepaalde kruiden (waaronder knoflook, oregano, tijm enz) worden tevens sinds eeuwen ter conservering van voedsel toegepast, omdat ze antibiotisch werkzame stoffen bevatten. Deze antibiotische stoffen hielpen ook darmaandoeningen te voorkomen *c.q.* zij werken ook bij de gastheer antibiotisch tegen ziekteverwekkers en hebben een positief effect op de darmflora.

De biologische werkingen van dergelijke kruiden heeft in de laatste jaren toenemende belangstelling ervaren en recent wetenschappelijk onderzoek richt zich op volgende eigenschappen van inhoudstoffen van planten, aangeduid als secundaire plantenmetabolieten (SPM), phytochemicals of fytobiotica.

Antimicrobiële eigenschappen van fytobiotica

Tallose inhoudstoffen van planten hebben antimicrobiële eigenschappen. Voor de plant zijn deze stoffen noodzakelijk om een besmetting van hun wortels en bladeren door micro-organismen uit de omgeving (het z.g. biofouling) te voorkomen. Een kort literatuuronderzoek naar artikelen, die dergelijke antimicrobiële eigenschappen beschrijven, leverde meer dan 8800 literatuurreferenties op. Van deze plantenmetabolieten zijn echter slechts enkele ook werkzaam tegen belangrijke ziekteverwekkers bij mens en dier. Daarnaast worden in vele van deze wetenschappelijke artikelen de onderzoeksmethoden (b.v. de compositie en chemisch-fysische eigenschappen van het plantenextract) onvoldoende beschreven en beperkt zich het onderzoek op een beschrijving van enkele *in vitro* proeven (*proof of principle*). Desondanks vormen deze onderzoeken een waardevolle basis voor verder onderzoek met geavanceerde onderzoekstechnieken.

Enkele van de bekende planten, die antimicrobiële stoffen bevatten, zoals bijvoorbeeld oregano en knoflook worden reeds in de biologische veehouderij toegepast. Ook voor deze toepassing is een nadere onderbouwing wenselijk, en een begin hiervoor werd gemaakt in het FYTO-V project (Project-Nr. 872.271.01, zie www.fyto-v.nl), waarbij met name de kwaliteit van enkele bestaande (commerciële) producten, die in Nederland verkrijgbaar zijn en hun mogelijke effecten op de gezondheid van dieren onderzocht werden.

De positieve eigenschappen van fytobiotica kunnen door verschillende mechanismen verklaard worden, die duidelijk verschillen van de werking van klassieke antibiotica. Een van de vaak beschreven eigenschappen van deze middelen is de remming van de communicatie tussen bacteriën.

Fytobiotica remmen de communicatie tussen bacteriën

Om te overleven beschikken bacteriën (en andere micro-organismen) over een breed scala aan communicatietechnieken. Zo is het onder meer cruciaal voor pathogenen om “te weten” wanneer een voldoende aantal (quorum) bacteriën bij elkaar is om een aanval op de gastheer in te zetten, want bij een te laag aantal zal de lichaamseigen afweer deze onmiddellijk uitschakelen (Reading and Sperandio, 2005). Om te bepalen of het quorum inderdaad behaald is, worden signaalmoleculen uitgezonden, die door andere bacteriën werden geregistreerd (vandaar de Engelse term *quorum sensing*). Tot nu toe zijn slechts enkele van deze signaalmoleculen bekend, waaronder de groep van geactyleerde homoserine lactones (AHL), die door gram-negatieve bacteriën gevormd wordt, en het *agr* systeem in gram-positieve organismen, dat via peptiden (AIP – autoactivating peptides) de activering of repressie van verschillende genen controleert. Het *agr* systeem is complex; voor belangrijke pathogenen zijn verschillende typen (*agr A – D*) beschreven. De belangrijkste doelstructuur (effector) van het *agr* systeem is het RNAIII. RNAIII reguleert honderden van genen, waaronder relevante virulentie factoren. Beide groepen van signaalstoffen werken volgens het 2-fasen principe, dit betekent dat zij vergelijkbaar met hormonen bij zoogdieren hun werking pas na binding aan specifieke receptoren uitoefenen, en dat in de bacteriecel tevens peptiden gevormd worden, die de vorming van AIPs onderdrukken (negatief feed-back mechanisme). Stoffen, die antagogenen of inhibitoren van deze receptoren zijn, onderbreken dit signaalsysteem. Hierdoor neemt de virulentie van pathogenen duidelijk af en de gevoeligheid voor gebruikelijke antibiotica duidelijk toe. Onderzoek heeft aangetoond, dat verscheidene plantaardige stoffen, onder meer plantaardige fenolen en polyfenolen, die in vele (geneeskragtige) planten kunnen worden aangetoond, het *quorum sensing* systeem van micro-organismen kunnen remmen.

Succesvolle inhibitoren van het bacteriële communicatiesysteem kunnen ook de vorming van biofilms voorkomen. De term biofilm verwijst naar een cluster van bacteriën, die aan een biologisch grensvlak (lucht-weefsel zoals in de longen of

vloeistof-weefsel zoals b.v. in urinewegen of de melkklier) hechten en zich vervolgens met een extracellulaire matrix omgeven. Bacteriën, die in een dergelijke biofilm leven zijn zeer ongevoelig tegen alle tot nu toe bekende antibiotica en onder *in vivo* omstandigheden nauwelijks te bestrijden. Deze biofilms worden als belangrijkste oorzaak voor het persisteren van infecties gezien, waardoor langdurige behandelingstrajecten noodzakelijk worden. Deze langdurige toepassing van antibiotica is een van de belangrijkste factoren die tot de toename van multiresistente bacteriënpopulaties geleid hebben.

Fytobiotica, die als *quorum sensing* inhibitoren en/of biofilm inhibitoren werken worden als de meest veelbelovende alternatieven voor antibiotica in de preventie van infectieziekten gezien (Lewis and Ausubel, 2006; Vattem et al., 2007). Verscheidene *quorum sensing* inhibitoren, allen van plantaardige oorsprong, zijn reeds in ontwikkeling voor klinische toepassing in de humane geneeskunde.

Fytobiotica kunnen resistentie-mechanismen beïnvloeden

Een speciaal onderzoeksgebied richt zich op het identificeren van stoffen of stofklassen, die de resistentieontwikkeling bij bacteriën blokkeren en/of voorkomen. Een van de meest belangrijke mechanismen die tot het ontstaan van resistentie leiden, en ook een belangrijke rol bij de resistentie van biofilms tegen antibiotica spelen, zijn efflux pompen. Efflux pompen zijn membraaneiwwitten, die bij gram-positieve en gram-negatieve bacteriën schadelijke moleculen (hier antibiotica), die de celwand passeren, onmiddellijk weer uit de cel pompen, waardoor deze antibiotica hun doelstructuur binnen de bacteriële cel niet bereiken en derhalve niet werkzaam zijn. Dergelijke effluxpompen worden niet alleen bij prokaryoten (bacteriën) maar ook bij eukaryoten gevonden; ze spelen een belangrijke rol bij de functie van biologische barrières, zoals de darmbarrière en de bloed-hersen barrière. Inmiddels is bekend dat vele geneesmiddelen waaronder antibiotica substraten voor deze efflux pompen (aangeduid als ABC-transporters) zijn. Het vervolgonderzoek naar remmers van deze transporters leverde een aantal nieuwe stoffen op, die verwant zijn aan antidepressiva en antihistaminica en tegelijkertijd antibiotische eigenschappen bezitten en de werking van antibiotica duidelijk kunnen versterken (Kristiansen et al., 2007). Talloze plantaardige stoffen blijken eveneens deze effluxpompen van bacteriën te kunnen remmen. Dit wordt als basis voor de ontwikkeling van nieuwe geneesmiddelen of combinaties van geneesmiddelen gezien, teneinde antibioticaresistentie te voorkomen.

Anti-inflammatoire eigenschappen van fytobiotica

Andere wenselijke eigenschappen van vele plantaardige stoffen zijn hun antioxidatieve (voorkomen of verminderen van het ontstaan van schadelijke (zuurstof) radicalen in een cel) en ontstekingsremmende werking. Enkele honderden wetenschappelijke artikelen beschrijven antioxidatieve

eigenschappen van bepaalde plantenmetabolieten, waarbij ook hier polyfenolen een belangrijke groep vormen. In de humane geneeskunde richt zich dit onderzoek voornamelijk op de beïnvloeding van chronische ziekten zoals kanker en gewrichtsaandoeningen (reuma). De cellulaire biochemische processen en genen, die door deze stoffen beïnvloed worden, zijn voor een groot gedeelte geïdentificeerd (zie bij voorbeeld Kwon et al., 2007).

Dergelijke anti-inflammatoire en immuun-stimulerende eigenschappen van fytobiotica (al dan niet uit eenzelfde plant/plantextract) zijn een wenselijke bijwerking van stoffen, die als alternatieven voor antibiotica geselecteerd worden. De selectie van individuele fytobiotica zal gebaseerd moeten worden op het individuele ziektebeeld, zoals darmaandoeningen bij varkens (speendiarree) en pluimvee (natte mest syndroom) of multifactorielle luchtwegaandoeningen bij kalveren. Tevens laat dit biochemische en moleculair-biologische onderzoek mogelijkheden herkennen, om wenselijke antioxidatieve and immunologische, de afweer versterkende, objectief te meten. Zij vormen dus belangrijke biomarkers voor de beoordeling en vergelijking van producten. In het kader van het Fyto-V project werd een eerste en succesvolle aanzet gemaakt om te demonstreren dat dergelijke moleculair-biologische onderzoekstechnieken ook in praktijkproeven kunnen worden toegepast.

Ad hoc maatregelen ter vermindering van het antibioticum gebruik en toekomstige ontwikkelingen

Ter behandeling van acute infectiezieken zullen zowel in de humane als in de diergeneeskunde conventionele antibiotica ook in de toekomst nodig zijn. Om het gebruik van antibiotica te beperken tot de behandeling van acute (diagnostisch bevestigde) infecties zullen *ad hoc* maatregelen zich erop moeten richten de toepassing van antibiotica voor de preventieve en zootecnische toepassing duidelijk te verminderen.

Als eerste *ad hoc* aanpak lijkt het wenselijk het gebruik van middelen, die tot een verbetering van de natuurlijke afweermechanismen bij dieren kunnen leiden, te intensiveren en de kennis en acceptatie van deze middelen in de reguliere dierhouderij te verbeteren. Middelen zoals pro- en prebiotica hebben hun positieve werking in de ziektepreventie bewezen, en verscheidene probiotica en prebiotica zijn op hun effectiviteit en veiligheid door de EFSA gecontroleerd en vervolgens als veevoederadditieven geregistreerd. Het gebruik van deze middelen ter preventie van infectieziekten en ter verbetering van gezondheid en prestatie van dieren dient gestimuleerd te worden, ondanks het feit dat de kostprijs van deze middelen vaak hoger is dan de huidige prijs voor (bulk) antibiotica zoals b.v. tetracyclinen en bepaalde macrolide antibiotica. Deze zijn voor een belangrijk deel voor de toename in het algehele antibioticumgebruik verantwoordelijk en spelen

een vooraanstaande rol bij het ontstaan van resistente bacteriënpopulaties bij landbouwhuisdieren.

Een veelbelovende optie voor een verdergaande vervanging van antibiotica in de ziektepreventie is het gebruik van plantaardige producten (fytobiotica). Wetenschappelijk onderzoek heeft de werking van deze stoffen duidelijk aangetoond. Het tot nu toe beschikbare onderzoek is echter onvolledig betreffende de toepassing van plantaardige stoffen bij dieren, en indicatiegebieden en doseringvoorschriften bij orale toediening zouden moeten worden ontwikkeld. Dit onderzoek zou zich ook moeten richten op de identificaties van biomarkers (biochemische parameters en genen), die de werkzaamheid van deze middelen aantonen.

Zoals reeds beschreven hebben secundaire metabolieten van planten niet alleen een specifieke werking op het immuunsysteem van het dier, maar ook zeer goed gedefinieerde effecten op bacteriële populaties, waardoor de effectiviteit van antibiotica toeneemt en de prevalentie van resistentie afneemt. Dit betreft voornamelijk het communicatiesysteem (*quorum sensing*) van bacteriën, hetgeen hun virulentie en ontstaan van therapieresistente biofilms bepaalt. Aanvullend onderzoek zou moeten bevestigen, dat deze effecten ook bij typische dierlijke pathogenen aantoonbaar zijn, en/of welke producten inderdaad voor een orale toepassing in aanmerking komen.

Een belangrijke voorwaarde om de acceptatie van dergelijke natuurlijke middelen, die passen in het concept van een duurzame landbouw, is het verhogen van de kennis omtrent hun werking, maar ook hun beperkingen. Een onjuiste toepassing, b.v. bij een acute ziekte-uitbraak, een te korte behandelingsduur en onjuiste combinaties van therapeutica en dergelijke natuurlijke middelen hebben in het verleden het vertrouwen in de waarde hiervan vaak ondermijnd.

Een wenselijke optie is het oprichten van een (diergeneeskundig) Kenniscentrum Alternatieven voor Antibiotica. Dit centrum zou oplossingsgericht moeten werken en zodoende een aanvulling vormen op de bestaande structuren en werkgroepen, die het gebruik van antibiotica en het voorkomen van resistentie tegen antibiotica monitoren. Taken van dit kenniscentrum omvatten de communicatie met de verschillende onderzoeksgroepen in Nederland en de gebruikers. Daarnaast zou het centrum een rol in de kwaliteitsbewaking en bij het opstellen van standaards en testprotocollen kunnen vervullen, waardoor ook het bedrijfsleven gestimuleerd kan worden om een bijdrage aan deze ontwikkelingen te leveren. Een aantal van deze vraagstellingen zijn reeds in het project *Fyto-V* (LNV-872.271.01) aan de orde geweest, maar hier vanuit een ander invalshoek, namelijk het ontwikkelen van fytotherapie als middel bij het reduceren en/of behandelen van dierziekten in de biologische landbouw.

De meest belangrijke taak van een dergelijk kenniscentrum zal zijn te zorgen voor een adequate verspreiding van actuele onderzoeksresultaten naar dierenartsen, het bedrijfsleven en de productieketens en naar de veehouder, teneinde de kennis van en motivatie voor deze aanpak te bevorderen.

Literatuur

Geselecteerde referenties (review artikelen)

EFSA: 2008. Food borne antimicrobial resistance as a biological hazard. Opinion of the Panel on Biological Hazards. Adopted on 9 July, 2008.

MARAN Rapporten; zie <http://www.cvi.wur.nl/NL/publicaties/rapporten/maranrapportage/>

WHO, 2002: Antimicrobial resistance, Fact Sheet. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/>

WHO 2004: Second joint FAO/OIE, WHO Expert Workshop on non-human antimicrobial usage and antimicrobial resistance: management options. <http://whqlibdoc.who.int/hq/2004/>

Bengmark, S. 2005: Probiotics and synbiotics in clinical medicine. *Gastroenterology Clinics of North America*. 34, 413 – 436.

Geier, M.S., Butler, R.N., Howarth, G.S., 2007. Current insights into the pathogenesis and new therapeutic options: probiotics, prebiotics and synbiotics. *Int. J. Food Microbiology*. 115, 1–11.

Gordon, Y.J., Romanowski, E.G., Mcdermott, A.M., 2005. A review of antimicrobial peptides and their therapeutic potential as anti-infective drugs. *Curr. Eye Res.* 30, 505-515.

Hermoso, J.A., Garcia, J.L.M. Garcia, G., 2007. Taking aim on bacterial pathogens: from page therapy to enzybiotics. *Current Opinion Microbiol.*, 10, 461-472.

Kristiansen, J.E., Hendricks, O., Delvin, T., Butterworth, T.S., Aagaard, L., Christensen, J.B., Flores, V.C., Keyzer, H., 2007. Reversal of resistance in microorganisms by help of non-antibiotics. *J. Antimicrobial Chemotherapy*, 59, 1271 – 1279.

Kwon, K.H., Barve, A., Yu, S., Huang, M.T., Kong, A.N., 2007. Cancer chemoprevention by phytochemicals: potential molecular targets, biomarkers and animal models. *Acta Pharmacol Sin.* 28, 1409-21.

Lewis, K., Ausubel F.M., 2006. Prospects for plant-derived antibacterials. *Nature Biotechnology*, 24, 1504-1507.

Parisien, A., Allain, B., Zhang, J., Mandeville, R., Lan, C.Q., 2007. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases and antimicrobial peptides. *J. Appl. Microbiol.*, 104, 1-13.

Reading, N.C., Sperandio, V., 2005. Quorum sensing: the many languages of bacteria. *FEMS Microbiol. Lett* 254, 1-11.

Shanahan, F., 2004: Probiotics in inflammatory bowel disease – therapeutic rationale and role. *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, 809-818.

Vattem, D.A., Mihaljik, K., Crixell, S.H., LcLean, R.J.C., 2007. Dietary phytochemicals as quorum sensing inhibitors. *Fitoterapia* 78, 302-310.

Willey, J.M., Van der Donk, W.A., 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annual Rev. Microbiol.*, 61, 477 – 501.

Farmacologische antimicrobiële strategieën

Inleiding

Voor ieder nieuw antibioticum dat wordt ontwikkeld ontstaat al na enkele jaren een resistentie [1]. Op dit moment wordt geschat dat 70% van de infecties die in het ziekenhuis in de USA worden opgelopen resistent zijn tegen een of meerdere antibiotica. Met uitzondering van de recent ontwikkelde smal-spectrum antibiotica daptomycine en linezolide zijn er in de laatste 40 jaar geen klinisch relevante nieuwe klassen antibiotica ontdekt. We dreigen de strijd te verliezen. Traditionele antibiotica kunnen bacteriën doden (bacteriocide werking) of remmen de groei (bacteriostatische werking). Dit type werkingsmechanismen is in eerste instantie effectief maar veroorzaakt selectiedruk op de bacterie en bevordert daarmee de groei van antibioticaresistente stammen [2].

Het is de hoogste tijd voor de ontwikkeling van nieuwe strategieën. Het zou wenselijk kunnen zijn om de bacterie niet direct te doden of de groei ervan te belemmeren, maar om te proberen bacteriën te ontwapenen. Strategieën dus die ingrijpen op de virulentie [2]. Resistentievorming kan op deze wijze worden voorkomen. Bij deze benadering kan worden gedacht aan beïnvloeding van de toxinerwerking, het toxinetransport en de toxineafgifte, remming van de adhesie van de bacteriën, remming van de quorum-sensing of beïnvloeding van de regulatie van de virulentie expressie of aan het bevorderen van de fagocytose.

Remming van de toxinerwerking

Verschillende pathogene bacteriën veroorzaken hun toxische effecten op de gastheer door de inwerking van toxines. Door deze toxinerwerking direct of indirect (via het moduleren van de respons op het toxine van de gastheer) te

voorkomen kan de toxiciteit van de pathogene bacteriën worden verhindert. Antilichamen tegen difterie, botulinus of tetanus zijn voorbeelden van directe remming van toxines. Vanwege het dreigende bioterrorisme wordt veel onderzoek gedaan naar directe anti-toxines. Het botulinum neurotoxine en het plantentoxine ricine kunnen in aërosolvorm worden gebracht en zo als biologische wapens worden gebruikt. Strategieën om deze toxines te neutraliseren zijn van belang. Voor anthrax is de situatie ingewikkelder. Anthrax wordt als inerte spore geleverd, waarmee vervolgens in delende bacteriën het toxine wordt gevormd. Via een systemische infectie met *Bacillus anthracis* komt het anthrax-toxine in de bloedbaan. Agressieve therapie met antibiotica kan de bacteriële groei weliswaar remmen, maar de reeds gevormde bacteriële anthrax-toxinen in de bloedbaan kunnen alsnog tot de dood leiden [3]. Het anthraxtoxine bestaat uit twee toxinen, het edema toxine en het letale toxine. Deze twee toxines hebben dezelfde groep die aan de receptor bindt, het protectieve antigen (PA), maar hebben onderscheidende enzymatische actieve groepen, de edema (of oedeem) factor (EF) en de letale factor (LF). EF is een calcium-, calmoduline-afhankelijk adenylaacyclase en LF is een zink-afhankelijk metalloprotease die de meeste mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKK) splitst en daarmee de intracellulaire signaaltransductie routes verstoort. Dit voorbeeld toont aan dat specifieke kennis van dit proces mogelijkheden tot interventie biedt. Zo zijn er peptiden ontworpen om de toxische werking van LF op macrofagen te remmen [4]. Het blijkt ook mogelijk om het PA te moduleren en daarmee de entree van het anthrax-toxine te beïnvloeden [5]. Ook reeds bekende stoffen die voor een ander doeleinde zijn ontwikkeld blijken soms onverwachte activiteit te hebben. Het antiarrhythmicum amiodaron en de calciumantagonist bepridil remmen de entree van het anthraxtoxine doordat de voor opname kritische endosomale acidificatie wordt geremd [6]. Vermindering van de virulentie hoeft niet altijd te verlopen via directe beïnvloeding van de pathogene eiwitten. Ook kan op indirecte wijze de toxine werking worden verminderd. Een goed voorbeeld om dit te illustreren is het mogelijke gebruik van Cl⁻ kanaalblockers om de downstream effecten van het cholera toxine te remmen. Deze Cl⁻ kanaalblockers zijn in eerste instantie onderzocht om toe te passen bij cystic fibrose waarbij er sprake is van een defect in het cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) eiwit. Stoffen uit de 2-thioxo-4-thiazolidinone klasse zijn goede CFTR remmers en zijn toegepast om de effecten van het cholera toxine te verminderen [7].

Remming van het transport van het toxine

Er kan ook bescherming worden geboden door te voorkomen dat het bacteriële toxine op de plaats van werking komt. Een goed voorbeeld om de effectiviteit van deze benadering te illustreren is het reeds lang bekende cholestyramine. Deze stof wordt gebruikt om galzuren te binden en wordt

ingezet ter behandeling van hypercholesterolemie of van de diarree die kan ontstaan bij patiënten met de ziekte van Crohn, die een post-ileale resectie hebben ondergaan. Cholestyramine bindt ook de toxines van *Clostridium difficile* waardoor inflammatie en diarree wordt voorkomen.

Verskillende pathogenen maken gebruik van een soort injectiesysteem dat de bacteriële toxines direct in het cytosol van de gastheercel kan brengen.

Dit type III secretie systeem (TTSS) kan op verschillende manieren geremd worden. In *Pseudomonas aeruginosa* bijvoorbeeld bevordert het PcrV eiwit, dat op de tip van het injectiesysteem zit, de binding aan de membraan van de zoogdiercel. Daarmee wordt op uiterst effectieve wijze het *P.aeruginosa* cytotoxine in de cel van de gastheer gebracht [8]. Een antilichaam (anti-PcrV) dat bindt aan dit eiwit remt de translocatie van het toxine.

Op vergelijkbare wijze zijn antilichamen ontwikkeld tegen de type III secretie door *Yersinia pestis*, de bacterie die de builenpest (Eng. Bubonic plague) veroorzaakt. LcrV is het *Y.pestis* ortholoog van PcrV. Een antilichaam tegen dit eiwit voorkomt *Y.pestis* geïnduceerde apoptose van de gastheercel en bevordert de fagocytose [9].

Ook kleine organische moleculen blijken effectief het TTSS te kunnen inhiberen [10, 11]. Een verdere ontwikkeling van deze moleculen zouden interessante virulentieremmers kunnen zijn.

Remming van de adhesie van de bacteriën

Het menselijk lichaam heeft allerlei manieren ontwikkeld om de adhesie van grote hoeveelheden bacteriën te voorkomen. Zo worden de epitheelcellen via 'shedding' voortdurend verwijderd en bevat de 'epithelial lining fluid' van de luchtwegen, de darmen en de urogenitale wegen mucus en moleculen die de aanhechting van bacteriën voorkomen. Deze intensieve endogene beschermingswijze geeft het belang aan van het voorkomen van adhesie van bacteriën. Bacteriën komen vaak voor in een biofilm. Een groep bacteriële cellen die vastgehouden worden in een beschermende extracellulaire matrix. Dergelijke 'biofilm bacteriën' zijn moeilijker bereikbaar voor antibiotica of (bij schoonmaken) voor detergentia. Ook lagere groeisnelheden, stress-tolerantie en resistentie van 'biofilm bacteriën' kunnen er toe bijdragen dat deze bacteriën minder goed op antibiotica reageren.

Chronische terugkerende infecties zoals die voorkomen bij cystic fibrose patiënten of bij urineweg infecties kunnen dan het gevolg zijn.

Helaas worden er zeer diverse adhesie-eiwitten geproduceerd door verschillende bacteriën. Interessant is echter dat sommige pathogene species zoals *P.aeruginosa* en *Candida albicans* adhesie moleculen bevatten die wel homologe receptor bindingsdomeinen omvatten. Hierdoor lijkt het mogelijk om anti-adhesie therapieën voor beide species tegelijkertijd te ontwikkelen [12].

Rationeel ontwikkelde stoffen die ingrijpen op de adhesie zijn de piliciden [13]. Piliciden remmen de vorming van pili of fimbriae. Pili zijn betrokken

bij de adhesie en invasie van bacteriën. Cellulaire bacteriële chaperone eiwitten binden pili-subunits, die vervolgens via usher-kanalen aan de buitenmembraan worden geplaatst. Piliciden interfereren met dit sterk geconserveerde chaperone-usher systeem. Dit aangrijpingspunt voor piliciden heeft voordelen omdat dit de moleculaire processen tussen chaperones en de pilus-subunits zeer goed bekend zijn en sterk zijn geconserveerd in verschillende bacteriën. Pili worden door zowel Gram-positieve als Gram-negatieve bacteriën geproduceerd. Dit kan dus een goed beginpunt zijn voor rationeel ontwerp van nieuwe breed toepasbare antibacteriële middelen [14].

Quorum-sensing remmers

Het onschadelijk maken van bacteriën kan worden bereikt door er voor te zorgen dat bacteriën geen groot leger kunnen vormen. Een enkele bacterie heeft veelal geen kans om een infectie te veroorzaken of om weefselschade te geven. Zo'n enkele bacterie zal snel worden opgeruimd door het immuunsysteem. Er is een kritische hoeveelheid bacteriën nodig om een infectieus proces te starten. Een dergelijke kritische massa wordt een 'quorum' genoemd. Overigens kan ook een groot aantal bacteriën nog steeds ineffectief zijn in hun aanval als hun functies niet worden gecoördineerd. Deze coördinatie kunnen bacteriën bewerkstelligen via een communicatie-netwerk dat wel 'quorum sensing' wordt genoemd [15].

Elke bacterie scheidt moleculen af, die als auto-inducers in de micro-omgeving terecht komen. De concentratie van deze auto-inducers is evenredig met de bacteriële dichtheid totdat een kritische concentratie of het quorum is bereikt. Is het quorum aanwezig dan is dat het signaal voor het tot expressie brengen van verschillende bacteriële genen voor bijvoorbeeld de regulatie van de reproductie, de virulentie factoren en defensiemechanismen. *P.aeruginosa* gebruikt zijn quorum-sensing systeem bijvoorbeeld om de biofilmsynthese te reguleren en blijken er 39 genen onder controle van quorum-sensing te staan [16].

Er zijn twee quorum-sensing systemen [17]. Gram-positieve bacteriën gebruiken kleine peptiden die in de bacteriën worden gevormd als auto-inducers. Deze 'autoinducing polypeptides' (AIPs) worden vervolgens actief uit de bacterie getransporteerd en binden aan receptoren van naburige bacteriën en leiden daar tot een fosforyleringscascade en genexpressie. Hierdoor worden er onder andere nog meer AIPs gevormd.

De autoinducers van Gram-negatieve bacteriën worden geproduceerd door een LuxI enzym en verlaten via passieve diffusie de bacterie. Deze autoinducers zijn acyl-homoserine lactonen (AHL). Zij accumuleren zowel in de extra- als intra-cellulaire ruimte. Als de concentratie AHL hoog genoeg is binden ze aan de intracellulaire LuxR receptor. Een dergelijk AHL-LuxR complex bindt aan promotor regio's van genen die onder controle van dit systeem staan [17], waardoor er meer AHL geproduceerd wordt.

Inactivering van dit quorum-sensing systeem geeft de mogelijkheid om nieuwe breed spectrum antibiotica te ontwikkelen. Voor Gram-negatieve bacteriën blijken AHL analoga in staat om de receptor te blokkeren [18]. Veel van deze lactonen zijn echter baselabel en zijn substraat voor zoogdier paraoxonases en dus niet optimaal voor therapeutische doeleinden. Gehalogeneerde furanen lijken te reactief te zijn, hetgeen therapeutisch gebruik bemoeilijkt. De recent beschreven *P.aeruginosa* quorum sensing agonist TP-1 (dus een quorum-sensing mimeticum) is structureel niet verwant aan de endogene signaalmoleculen en zou daardoor een interessant startpunt zijn voor nieuwe quorum-sensing antagonisten [19]. Niet alleen antagonisten van de LuxR receptor maar ook stoffen die de synthese van AHL inhiberen zouden quorum-sensing remmers kunnen zijn. LuxI homologen synthetiseren AHLs met behulp van de cofactor S-adenosylmethionine (SAM). Analoga van SAM zoals het S-adenosylhomocysteine en het S-adenosylcysteine remmen de synthese van AHLs [20]. Quorum-sensing kan uiteraard ook geremd worden door de afbraak van de AHL signaalmoleculen te bevorderen door het toevoegen van lactonases [21].

Recent is een quorum-sensing remmer gevonden, die voorkomt in de bast van de *Hamamelis virginiana* (de toverhazelaar). De stof hamamelitannine is een ester van D-hamamelose (2-hydroxy-methyl-D-ribose) met twee moleculen gallinezuur. Dit polyfenol remt infectie door methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) en methicilline-resistente *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) [21].

Verscheidende natuurlijke producten lijken goede antimicrobiële effecten te vertonen. Knoflook, hoewel teruggerekend van een muis infectie model in een dosis van 50 knolletjes voor iemand van 80 kg, lijkt een quorum-sensing remmer [22]. Ook andere polyfenolen zoals quercetine hebben goede antimicrobiële activiteit [23] hetgeen via remming van de quorum-sensing te verklaren lijkt te zijn. Combinatie therapie waarbij klassieke antibiotica worden gebruikt samen met polyfenolen zijn zeer interessant [24]. De variatie aan werkzame natuurstoffen lijkt onuitputtelijk. De antibacteriële werking van olijfoliecomponenten bijvoorbeeld is in de reguliere geneeskunde niet goed doorgedrongen [25].

Modulering van transcriptie van virulentiefactoren

Een goed voorbeeld om modulering van transcriptie van virulentiefactoren te illustreren vormt de stof virstatine [26]. Bij screening van moleculen die het op het niveau van de *V.cholerae* cholera toxine promotor kunnen ingrijpen werd virstatine gevonden. Virstatine remt de transcriptieregulator ToxT waardoor (via beïnvloeding van de vorming van een tweetal virulentiefactoren) het cholera toxine niet meer kan werken. Virstatine blijkt de binding van het cholera toxine aan het darmepitheel en daarmee intestinale kolonisatie met *V.cholerae* te voorkomen. Het is ook gelukt om op

transcriptieregulatie niveau het secretie apparaat (TTSS-*vide supra*) te beïnvloeden in enteropathogene *E.coli* [27] en deze bacterie daarmee onschadelijk te maken.

Verhoging fagocytose

Ten einde bacteriële infecties te voorkomen of te bestrijden heeft het lichaam een uitgebreid netwerk van fagocyterende immuuncellen, zoals neutrofielen, macrofagen of dendritische cellen. De eerste stap in de fagocytose is de herkenning van bacteriën. Vervolgens zal de fagocyterende cel het actine cytoskelet herrangschikken en middels podia de bacterie opnemen. De bacteriën worden dan in een intracellulaire vacuole gebracht en blootgesteld aan reactieve (oxidatieve) zuurstofvormen (reactive oxygen species-ROS).

Bacteriën zijn in staat om een groot arsenaal aan ontwijkende strategieën te ontwikkelen voor deze fagocytering. *Yersinia* bijvoorbeeld produceert een scala aan eiwitten om aan fagocytose te ontkomen. *Yersinia* gebruikt een type III secretie systeem (TTSS) om de eiwitten in de fagocyt te brengen. Het eiwit YopH bijvoorbeeld is een tyrosine phosphatase dat de fagocytering door macrofagen remt [28]. Het eiwit YopE dat door *Yersinia* wordt afgegeven beïnvloedt het RhoGTPase in fagocyten waardoor de fagocytose niet goed kan verlopen. Sommige bacteriën kunnen zich verdedigen tegen de reactieve zuurstofvormen die door fagocyten worden gebruikt om bacteriën te doden. Verschillende bacteriën maken catalases en hydroperoxidases om zich tegen deze ROS te beschermen. De catalases en peroxidases die door *P.aeruginosa* tot expressie wordt gebracht verloopt via de transactiveringsfactor *oxyR* [29]. Remming van de *oxyR* gereguleerde vorming van antioxidant eiwitten vormt een zeer interessante target om bijvoorbeeld *P.aeruginosa* te bestrijden. Een bacterie die moeilijk te bestrijden is en die bijvoorbeeld een rol speelt bij cystic fibrose.

Virulentie-remmers zijn veelbelovend

Resistentie komt tot stand doordat via de klassieke weg van het doden van het pathogeen de sterkste (resistente) pathogenen overblijven die zich dan weer delen. Bij het remmen van de virulentie, bijvoorbeeld via de hier beschreven routes van remming van de werking of het transport van het toxine; of door remming van de adhesie van bacteriën; of door op transcriptie niveau in te grijpen in adhesie, toxine vorming of secretie; of door quorumsensing remmers toe te passen wordt de bacterie als het ware van zijn wapens ontdaan. Er wordt geen selectiedruk uitgeoefend en er ontstaat op deze wijze dus geen resistentie. Men zou kunnen zeggen dat de ontwapende bacterie dan verliest van de gastheer. Uiteraard moet de gastheer nog wel in staat zijn om de onschadelijke bacterie uit te schakelen.

Een ander voordeel om een antibioticum te ontwikkelen dat is gebaseerd op remming van de virulentie is dat de natuurlijke microflora niet wordt

aangetast. De werking kan dan heel specifiek gericht zijn. Het kan zelfs zo zijn dat verschillende virulentiefactoren actief zijn of worden op verschillende momenten na de infectie. Verdere kennis op dit gebied kan een nadere specificiteitsverbetering geven van de nieuwe therapeutica. Bij het testen van virulentie-remmers moet worden bedacht dat methoden die gebruikt worden voor conventionele antibiotica zoals de disc-diffusie techniek of verdunningsexperimenten in kweekmedium, niet geschikt zijn voor het testen van virulentieremmers. Deze virulentieremmers zouden getest kunnen worden middels nieuw te ontwikkelen gen-reporter assays. Ook zullen cellulaire systemen of zelfs in vivo systemen (met de gastheer) beter geschikt zijn het effect van de ontwapening van de bacterie te bepalen. In deze laatste experimentele set-up zijn de effecten van de therapeutica op de gastheer mee te meten.

Economische aspecten

Omdat nieuwe virulentieremmende antibiotica specifieker (voor een bepaalde bacterie) zullen zijn, zal het moeilijker worden om te komen tot breedspectrum antibiotica. Voor de farma-industrie betekent dit dat nieuwe block busters niet direct zijn te verwachten. Investeringsmogelijkheden worden daardoor moeilijk. Specifiek werkende stoffen zullen worden ingezet in een beperkte markt en dus is een geringe omzet te verwachten. Een stimulerende rol van de overheid is daarom essentieel om desondanks tot nieuwe antimicrobiële therapeutica te komen!

Aanbevelingen

- Nieuwe antimicrobiële therapie zou bij voorkeur gericht kunnen zijn op het onschadelijk maken de virulentie van bacteriën. Er zijn diverse aangrijpingspunten te definiëren. Met virulentieremmers wordt resistentieproblematiek omzeild!
- Er is behoefte aan nieuwe (cellulaire of in vivo) testsystemen om de effectiviteit van virulentie-remmers te kunnen meten.
- Er zijn reeds verschillende interessante lead compounds beschreven die nadere uitwerking (via structuurmodificaties) behoeven.
- Opvallend is dat verschillende lead-structuren rijk zijn aan fenolische hydroxylgroepen. Ook verschillende natuurlijke antibiotica bevatten fenolische structuren. De natuurlijke antibiotica verdienen meer aandacht.
- Specifieke virulentieremmende antibiotica zullen specifieke (voor een bepaalde bacterie) werking vertonen. Voor de farma-industrie betekent dit dat nieuwe block busters niet direct zijn te verwachten. Een stimulerende rol van de overheid is daarom essentieel!

Literatuur

- [1] S.V. Lynch, J.P. Wiener-Kronish. Novel strategies to combat bacterial virulence. *Curr. Opin. Crit. Care* 14, 593-599 (2008).
- [2] A.E. Clatworthy, E. Pierson, D.T. Hung. Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nature Chem. Biol.* 3, 541-548 (2007).
- [3] G.J.A. Rainey, J.A.T. Young. Antitoxins: novel strategies to target agents of bioterrorism. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 721-726 (2004).
- [4] B.E. Turk, T.Y. Wong, R. Swarzenbacher, E.T. Jarrell, S.H. Leppla, R.J. Collier, R.C. Liddington, L.C. Cantley. The structural basis for substrate and inhibitor selectivity of the anthrax lethal factor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 60-66 (2004).
- [5] B.A. Krantz, R.A. Melnyk, S. Zhang, S.J. Juris, D.B. Lacy, Z. Wu, A. Finkelstein, R.J. Collier. A phenylalanine clamp catalyzes protein translocation through the anthrax toxin pore. *Science* 309, 777-781 (2005).
- [6] A.M. Sanchez, D. Thomas, E.J. Gillespie, R. Damoiseaux, J. Rogers, J.P. Saxe, J. Huang, M. Manchester, K.A. Bradley. Amiodarone and bepridil inhibit anthrax toxin entry into host cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51, 2403-2411 (2007).
- [7] T. Ma, J.R. Thiagarajah, H. Yang, N.D. Sonawane, C. Folli, L.J.V. Galietta, A.S. Verkman. Thiazolidinone CFTR inhibitor identified by high-throughput screening blocks cholera toxin induced intestinal fluid secretion. *J. Clin. Invest.* 110, 1651-1658 (2002).
- [8] Y. Imamura, K. Yanagihara, Y. Fukuda, Y. Kaneko, M. Seki, K. Izumikawa, Y. Miyazaki, Y. Hirakata, T. Sawa, J.P. Wiener-Kronish, S. Kohno. Effect of anti-PcrV antibody in a murine chronic airway *Pseudomonas aeruginosa* infection model. *Eur. Respir. J.* 29, 965-968 (2007).
- [9] A. Zauberman, S. Cohen, Y. Levy, G. Halperin, S. Lazar, B. Velan, A. Shafferman, Y. Flashner, E. Mamroud. Neutralization of *Yersinia pestis*-mediated macrophage cytotoxicity by anti-LcrV antibodies and its correlation with protective immunity in a mouse model of bubonic plague. *Vaccine* 26, 1616-1625 (2008).

- [10] D.L. Hudson, A.N. Layton, T.R. Field, A.J. Bowen, H. Wolf-Walz, M. Elofsson, M.P. Stevens, E.E. Galyov. Inhibition of type III secretion in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by small-molecule inhibitors. *Antimicrobial Agents Chemother.* 51, 2631-2635(2007).
- [11] R. Nordfelth, A.M. Kauppi, H.A. Norberg, H. Wolf-Watz, M. Elofsson. Small-molecule inhibitors specifically targeting type III secretion. *Infect. Immun.* 73, 3104-3114 (2005).
- [12] K.K. Lee, L. Yu, D.L. Macdonald, W. Paranhych, R.S. Hodges, R.T. Irvin. Anti-adhesion antibodies that recognize a receptor-binding motif (adhesin-tope) inhibit pilus/fimbrial-mediated adherence of *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* to asialo-GM1 receptors and human buccal epithelial cell surface receptors. *Can. J. Microbiol.* 42, 479-486 (1996).
- [13] V. Aberg, F. Almqvist. Pilicides. Small molecules targeting bacterial virulence. *Org. Biomol. Chem.* 5, 1827-1834 (2007).
- [14] Y.M. Lee, F. Almqvist, S.J. Hultgren. Targeting virulence for antimicrobial chemotherapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* 3, 513-519 (2003).
- [15] M.E. Taga, B.L. Bassler. Chemical communication among bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 100 (Suppl. 2), 4549-4554 (2003).
- [16] M. Whiteley, K.M. Lee, E.P. Greenberg. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 96, 13904-13909 (1996).
- [17] K.A. Melstrom, J.W. Smith, R.L. Gamelli, R. Shankar. New perspectives for a new century: Implications of pathogen responses for the future of microbial therapy. *J. Burn Care Res.* 27, 251-264 (2006).
- [18] M. Hentzer, M. Givskov. Pharmacological inhibition of quorum sensing for the treatment of chronic bacterial infections. *J. Clin. Invest.* 112, 1300-1307 (2003).

- [19] U. Müh, B.J. Hare, B.A. Duerkop, M. Schuster, B.L. Hanzelka, R. Heim, E.R. Olson, E.P. Greenberg. A structurally unrelated mimic of a *Pseudomonas aeruginosa* acylhomoserine lactone quorum-sensing signal. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 103, 16948-16952 (2006).
- [20] M.R. Parsek, D.L. Val, B.L. Hanzelka, J.E. Cronan, E.P. Greenberg. Acyl homoserinelactone quorum-sensing signal generation. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*, 96. 4360-4365 (1999).
- [21] M.D. Kiran, N.V. Adikesavan, O. Cirioni, a. Giacometti, C. Silvestri, G. Scalise, R. Ghiselli, V. Saba, F. Orlando, M. Shoham, N. Balaban. Discovery of a quorum-sensing inhibitor of drug resistant staphylococcal infections by structure-based virtual screening. *Mol. Pharmacol.* 73, 1578-1586 (2008).
- [22] T. Bjarnsholt, P. Ø. Jensen, T.B. Rasmussen, L. Christophersen, H. Calum, M. Hentzer, H.P. Hougen, J. Rygaard, C. Moser, L. Eberl, N. Høiby, M. Givskov. Garlic blocks quorum sensing and promotes rapid clearing of pulmonary *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Microbiology* 151, 3873-3880 (2005).
- [23] M. Li, Z. Xu. Quercetin in a lotus leaves extract may be responsible for antibacterial activity. *Arch. Pharm. Res.* 31, 640-644 (2008).
- [24] R.D. Lin, Y.P. Chin, W.C. Hou, M.H. Lee. The effects of antibiotics combined with natural polyphenols against clinical methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Planta Med.* 74, 840-846 (2008).
- [25] G. Bisignano, A. Tomaino, R. Lo Cascio, G. Crisafi, N. Uccella, A. Saija. On the in-vitro antimicrobial activity of oleuropein and hydroxytyrosol. *J. Pharm. Pharmacol.* 51, 971-974 (1999).
- [26] D.T. Hung, E.A. Shakhnovich, E. Pierson, J.J. Mekalanos. Small molecule inhibitor of *Vibrio cholerae* virulence and intestinal colonization. *Science* 310, 670-674 (2005).
- [27] A. Gauthier, M.L. Robertson, M. Lowden, J.A. Ibarra, J.L. Puente, B.B. Finlay. Transcriptional inhibitor of virulence factors in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4101-4109 (2005).
- [28] J. Celli, B.B. Finlay. Bacterial avoidance of phagocytosis. *Trends Microbiol.* 10, 232-237 (2002).
- [29] G.W. Lau, B.E. Britigan, D.J. Hassett. *Pseudomonas aeruginosa* OxyR is required for full virulence in rodent and insect models of infection and for resistance to human neutrophils. *Infect. Immun.* 73, 2550-2553 (2005).

Een immunologische visie

Samenvatting

Het immunologische aangrijpingspunt van veel antimicrobiële strategieën bij de behandeling van infecties is de versterking van de natuurlijke weerstand ofwel het aangeboren (innate) immuunsysteem. Zo blijken nieuwe antibacteriële strategieën, pre- en probiotica en bacteriofagen dit innate immuunsysteem te manipuleren. Er blijken diverse potentiële targets voor de toepassing van agonisten, antagonistische en adjuvantia beschikbaar die als alternatieven voor antibiotica gebruikt kunnen worden gebaseerd op hun bactericide activiteit. Er zijn echter ook risico's verbonden aan de toepassing van dergelijke therapieën: er kan overstimulatie of blokkering van essentiële moleculen en/of route optreden. Infectieuze organismen kunnen de geselecteerde aanknopingspunten van de bactericide werking omzeilen. Zo kunnen genetische variatie van de gastheer en het infectieuze organisme en hun consequenties voor de werking van het innate immuunsysteem zowel de efficiëntie en de toxiciteit van de bactericide component beïnvloeden.

Inleiding en probleemstelling

Het gebruik van antibiotica bij productiedieren wordt steeds minder maatschappelijk geaccepteerd, en houdt een steeds groter risico in op resistentieontwikkeling tegen enkelvoudige en multipole antimicrobiële geneesmiddelen. Daarmee wordt de gezondheid van mens en dier bedreigd. Naast deze alarmerende toenemende trend is er een duidelijke neerwaartse trend van nieuwe antimicrobiële therapieontwikkeling door de farmaceutische industrie.

Antibiotica worden wereldwijd voor 50% gebruikt in de veterinaire sector:

20% met een therapeutisch doel en 80% profylactisch als voeradditieven en als groeipromotoren. Men vermoedt dat 40 à 80% van deze toedieningen niet zinvol is. Naar verwachting zal bij het niet langer gebruiken van antibiotica als groeibevorderaar in de productiedieren sector, *dysbacteriose* als belangrijkste en primair negatief effect optreden. De belangrijkste oorzaak daarvan wordt gedacht een veel fragieler microbiel evenwicht in de darm te zijn. Dysbacteriose is daarbij te omschrijven als een onevenwichtige overgroei van bepaalde bacteriesoorten (waaronder pathogenen) ten koste van andere soorten, waarbij deze laatste vooral een belangrijke rol lijken te spelen bij de opbouw van immuniteit van de darmmucosa op jonge leeftijd, het blokkeren van receptoren voor potentiële pathogenen en het verhinderen dat pathogenen zich aan diverse verschillende receptoren binden. Interactie van bepaalde, zich bij dysbacteriose vermenigvuldigende, bacteriesoorten met de darmwand kan aanleiding geven tot een reactie van de darmwand hierop. Dysbacteriose kan zowel in de dunne als dikke darm optreden. In de dunne darm is veelal sprake van een acute en levensbedreigende dysbacteriose; die in de dikke darm is meer subklinisch en chronisch van aard en leidt - mede vanwege de vaak optredende diarree - tot verslechtering van de productieresultaten. Er is een toenemend arsenaal van componenten die als vervangers voor antibiotica in het voer worden voorgesteld en die vooral gericht zijn op het herstel en de stabiliteit van de endogene darmmicrobiota ter voorkoming van deze genoemde dysbacteriose, zoals: prebiotica, probiotica, synbiotica, bacteriofagen, plasmiden, vaccins, antimicrobiële peptiden, antistoffen, enzymen, en vooral fytotherapeutica.

Daarnaast worden antibiotica natuurlijk ook wijdverbreid ingezet ter behandeling van infecties per injectie bij de mens, gezelschapsdieren en productiedieren. Ook daarbij is er bij alle drie toepassingsgebieden sprake van een overmatig gebruik met vergelijkbare risico's op resistentie en inductie van immunologische hyperreactiviteit of juist systemische immuunsuppressie. Dezelfde componenten worden eveneens gebruikt als alternatieven voor de therapeutische toepassing van antibiotica. Omdat de microbiota in de darm een dergelijk wezenlijke rol spelen in de opbouw van het immuunapparaat op jonge leeftijd en er veelvuldig naar gestreefd wordt naar parenterale toedieningsvormen van (alternatieven voor) antibiotica is de compositie en functie van de intestinale microflora van groot belang.

Aangeboren (innate) immuniteit en de intestinale microflora

Er is een subtiele balans in de darm tussen de endogene microbiota en componenten van zowel het aangeboren en adaptieve immuunsysteem en verstoringen in een of meer van deze leidt dan tot infectie, lokale en/of systemische ontsteking en hyperreactiviteit, en auto-immuunziekte. Naast niet-specifieke barrières (maagzuur, galzouten, peristaltiek, en verteringsenzymen) en kolonisatieresistentie. De darmmicrobiota zal op direct en

indirecte wijze een interactie met het immuunsysteem aangaan wanneer de bacteriën getransloceerd zijn over de darmwand en binden aan pathogene herkenningreceptoren (PRR) met hun pathogene geassocieerde moleculen (PAMP). Gram-negatieve bacteriën zoals *Escherichia coli* en LPS induceren daarbij de vorming van IL-10, induceren de expressie van ICAM-1, interferon-gamma receptor en MHC moleculen op epitheelcellen. Gram-positieve bacteriën zoals diverse *Lactobacilli* stammen, induceren de afgifte van TGF- β , TNF- α , IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12 en IL-18 en stimuleren de antistofproductie tegen parenteraal aangeboden antigenen. Juist de combinatie van IL-10 en TGF- β is cruciaal voor de opbouw van een sterk immunoregulatorisch netwerk en de inductie van tolerantie tegen voedsel-geassocieerde antigenen in het darmslijmvlies en voorkomen daarmee chronische infecties en ontstekingen. Bij de inductie van mucosale tolerantie blijkt er een belangrijke regulerende en T-cel aansturende rol te zijn voor subpopulaties van dendritische cellen (DC). Daarnaast worden er T-cel gemedieerde cytokines gemaakt: IL-12, IFN- γ en IL-2 zijn geassocieerd aan Th1 cellen die betrokken zijn bij intracellulaire ontstekingsreacties. Th2 cellen daarentegen worden gekenmerkt door de productie van IL-4, IL-5 en IL-13 en zijn betrokken bij antistofproductie en overgevoelighedsreacties. Probiotische *Lactobacilli* stimuleren de fagocytose en productie van zuurstof en stikstofradicalen, versterkte IgA antistofproductie en versterken de integriteit van het darmepitheel en al deze effecten dragen bij tot een versterkte weerstand tegen infecties.

Ziekteweerstand en immuniteit

Wanneer (potentiële) pathogenen het dier toch binnendringen, moet het micro-milieu waarin deze micro-organismen terechtkomen zodanig zijn dat het dier niet ziek wordt. M.a.w. het dier moet een optimale weerstand hebben tegen binnendringende ongewenste micro-organismen. Er zijn verschillende niveaus waarop aan deze weerstand wordt bijgedragen:

- een optimale kolonisatieresistentie, d.w.z. zorgen voor een stabiele, gunstige microflora in een optimaal maagdarmmilieu waardoor ongewenste micro-organismen niet kunnen koloniseren.
- een goed functionerende maagdarmwand, zowel wat betreft de secretie van verteringsenzymen en de absorptie van nutriënten als wat betreft het zich niet kunnen hechten van ongewenste micro-organismen en het kunnen passeren van eventuele toxinen (vanuit het darmlumen naar weefsels en bloedbaan) en elektrolyten (in omgekeerde richting).
- een hoge immuniteit, lokaal (in het maagdarmkanaal) en/of systemisch, waardoor het dier ongewenste micro-organismen ook maximaal actief kan bestrijden.

De natuurlijke weerstand bestaat uit specifieke systemen (huid, maagzuur, enzymen in speeksel) en uit cellen en moleculen die voorkomen in bloed

en ook in bijvoorbeeld melk. De cellen zijn vooral granulocyten, macrofagen en natuurlijk voorkomende killercellen (de NK cellen). De moleculen zijn o.a. enzymen van het complementsysteem, cytokines, laag moleculaire verbindingen (zoals eicosanoiden, reactieve zuurstofradicalen en stikstofmonoxide), antimicrobiële peptiden (zoals defensines) en acute fase eiwitten. De immunologie maakt onderscheid tussen algemene of aangeboren weerstand (innate immuniteit) en specifieke (acquired immunity) weerstand. Het afweersysteem is te beschouwen als bestaande uit een integratie van deze beide systemen. De koppeling tussen deze twee systemen kan worden beïnvloed via optimalisatie van omgevingsinvloeden (zoals hygiëne, welzijn, soorteigen gedrag, beweging, huisvesting en voeding). Dit noemt men immunomodulatie. De mate van immunomodulatie is deels afhankelijk van de erfelijke achtergrond en is daarmee potentieel onderwerp van fokkerij en gerichte selectie.

De natuurlijke ziekte weerstand is gebaseerd op de herkenning van evolutionair geconserveerde homologe epitopen (homotopen) door serumeiwitten en receptoren die in kiemlijnconfiguratie voorkomen en die tot diverse moleculaire families behoren. Homotopen zijn geassocieerd met kankercellen en infectieuze organismen. Voorbeelden van serumeiwitten die als homotoop-bindende eiwitten zijn lipopolysaccharide bindende eiwitten (LBP), C-reactief eiwit (CRP), mannose-bindend eiwit (MBP) en waarschijnlijk natuurlijke antistoffen (NAb). Vooral de binding van de homotopen die indicatief zijn voor microben aan oplosbare eiwitten als onderdeel van het aangeboren afweersysteem is belangrijk voor de verwijdering van deze infectie.

Het immuunsysteem is niet statisch, maar constant actief en het niveau van de weerstand (de immunestatus) schommelt bij gezonde dieren rond het niveau van de optimale natuurlijke immuniteit. De immuniteit beweegt zich dus continu binnen een zekere bandbreedte zonder dat het dier ziek is. Als de bandbreedte groter is, dan kan de infectiedruk groter zijn voor het dier ziek wordt. Nieuwe ontwikkelingen in de immunologie stellen ons in staat diverse immuunparameters van een dier te bepalen. Deze parameters geven inzicht in de immunestatus. Naar verwachting is de immunestatus in de huidige veestapel te laag bij het veelvuldig en/of in ernstige mate optreden van bedrijfsgebonden aandoeningen. Door gerichte analyse van relevante immuunparameters kan bij bijvoorbeeld runderen de bepaling daarvan mogelijk ook in melk plaatsvinden. Op deze wijze kan de immunestatus van koeien op een objectieve wijze worden gekoppeld aan factoren in de bedrijfsvoering, de gezondheid en de genetische afstamming.

Om de effecten van toediening van antibiotica, in productiedieren te kunnen meten is het cruciaal dat natuurlijke weerstand objectief gemeten kan worden. Dit kan bereikt worden door het identificeren van biomarkers die het niveau van de natuurlijke weerstand bepalen. Door het meten van

deze biomarkers kan dan op elk willekeurig moment de status van de natuurlijke weerstand bepaald worden evenals de invloed van omgevingsfactoren zoals voeding, (chronische) stress, infecties (verloop, frequentie, hygiëne) en overige immuunmodulatoren. Ook dierenwelzijnaantasting wordt daarmee beter meetbaar voordat zich niet-klinische of klinische verschijnselen ontwikkelen. Naast de immunomodulatoren wordt de natuurlijke weerstand bepaald door de genetische achtergrond van de dieren. De geselecteerde biomarkers kunnen ook een belangrijke rol spelen in de selectie en fokkerij van dieren met een verhoogde natuurlijke weerstand. De hedendaagse veehouderij maakt gebruik van moderne hybride rassen, die zijn ontstaan door decennia lang te selecteren op productie onder geoptimaliseerde huisvestings- en managementomstandigheden. Deze selectie of fokkerij is echter (te) eenzijdig geweest, waardoor andere belangrijke aspecten niet meegegaan zijn. Daardoor zijn in de huidige veehouderij de dieren vaak niet meer in balans en missen ze bepaalde robuustheidskenmerken om zich aan te kunnen passen aan veranderende omstandigheden, waardoor ze veranderingen in de omgeving of ziektes minder goed kunnen opvangen. Over de betekenis van de genetische aanleg op de gezondheid en welzijn van de dieren is nog veel onbekend

Werkingsmechanismen van antibiotica

Het (overmatig) gebruik van antibiotica in productiedieren kan leiden tot een aantal bijwerkingen. Zo kunnen antibiotica inwerken op de vorming van de celwand van bacteriën, de nutriëntenbalans verstoren of de intermediaire stofwisseling verstoren. Veel bacteriën kunnen zich echter snel aanpassen aan deze omstandigheden en aldus resistentie ontwikkelen. Belangrijk hierbij is dat de zwakkere en meer gevoelige bacteriën door de antibiotica gedood zullen worden terwijl juist de sterkere en meer pathogene bacteriën resistentie zullen ontwikkelen vanwege positieve selectie onder deze evolutionaire druk. De normale darmmicrobiota beschermen zich tegen invasie door pathogene bacteriën en gisten tijdens infecties door het afscheiden van natuurlijke verbindingen zoals acidophile en andere bacterines, organische zuren, vluchtige vetzuren en peroxides. Daarnaast zullen de natuurlijke microbiota (*Lactobacili* en *Bifidobacterien*) aanhechtingsplaatsen van invasieve organismen bezetten en daarmee kolonisatie voorkomen (kolonisatieresistentie). Groei van pathogenen, maar ook van de endogene microbiota, kan leiden tot de productie van bacteriële toxines die een enorme ongecontroleerde stimulatie van het immuunsysteem kunnen veroorzaken en daarmee levensbedreigende situatie kunnen veroorzaken.

Het gebruik van vooral breed spectrum antibiotica kan daarnaast leiden tot overgroei door gisten en schimmels. Deze overgroei kan daarmee ook een staat van immuunsuppressie veroorzaken zoals bekend is van *Candida*

infecties als gevolg van antibioticagebruik die de cellulaire immuniteit onderdrukken, endocrinopathiën veroorzaken en de productie van autoantistoffen induceren. Ook kan de fagocyterende capaciteit, de migratoire capaciteit en de intracellulaire toxiciteit van monocyten en neutrofiële granulocyten worden geremd. Deze activiteiten zijn indicatief voor de activiteit van antibiotica op het niveau van de natuurlijke ziekte-weerstand ofwel het innate immuunsysteem. Dit heeft grote consequenties voor de snelle, en alomtegenwoordige bescherming tegen infecties, maar ook op de inductie van de sterk specifieke adaptieve immuniteit. Parenteraal antibioticumgebruik leidt eveneens tot verlies van belangrijke nutriënten waaronder die welke belangrijk zijn bij het opbouwen van de immunologische weerstand tegen infecties. Zo treden verliezen in mineralen (magnesium, zink,) en vitamines (vitamine A, B12, K) op en deze verliezen aan micronutriënten kunnen vaak maar moeizaam worden aangevuld met voeders die voornamelijk worden samengesteld op basis van macronutriënten. Daardoor kunnen sommige infecties gemakkelijk persistent worden. Door de frequent met antibioticumgebruik geassocieerde diarree treedt daarenboven een niet-selectief nutriëntenverlies op. Zo kan een antibioticumgeïnduceerd verlies van zink worden aangetoond waarbij dit zink een belangrijke rol speelt bij de inductie van een effectieve immuunrespons tegen virale en bacteriële infecties en in de regulatie van ontstekingsreacties wat van groot belang is bij de vaak jonge productiedieren.

Effectiviteit van antibiotica

Geen van deze voorgestelde alternatieven blijkt echter even efficiënt, reproduceerbaar en robuust als antibiotica in het bereiken van dit resultaat. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de unieke werkingsmechanismen van antibiotica. Zo remmen antibiotica sluimerende subklinische infecties waardoor de metabole kosten van de activiteit van het innate immuunsysteem. Dit ondanks het feit dat veel van de antibiotica in subtherapeutische doses worden toegediend en die lager zijn dan de minimale inhibitie concentraties (MIC) voor pathogenen. Desondanks induceren deze toegepaste doses antibioticumresistentie in pathogene bacteriën. Daarnaast is het onduidelijk hoe dergelijke (sub)therapeutische doses van antibiotica de productie van groeiremmende metabolieten (zoals aanwezig in de gal) of het nutriëntengebruik van geselecteerde micro-organismen kunnen afremmen. Hierbij spelen de beïnvloeding door antibiotica van de dikte van het darmepitheel en het totale darmoppervlak een nog groten-deels onbegrepen rol.

Veel antibiotica hebben bijwerkingen die afhankelijk zijn van de chemische opmaak van de verbindingen. Tevens blijken vrijwel alle antibiotica die via de voeding als groeibevorderaar worden toegediend in staat een accumulatie van ontstekingscellen te veroorzaken in de darm. Deze ontsteking leidt

enerzijds tot versterkte intracellulaire cytotoxiciteit tegen bacteriën en anderzijds kan daarmee de inductie van de innate immuniteit door fagocyterende cellen (macrofagen en neutrofiële granulocyten) worden geremd. Als een consequentie treedt verhoogde intestinale permeabiliteit op. De extracellulaire concentraties van de antibiotica is waarschijnlijk te gering om een antimicrobieel effect te sorteren. Fagocyterende cellen echter kunnen tot wel 100-voudige accumulatie van de omgevingsconcentratie van antibiotica vertonen. Dit doordat zowel parenterale als per injectie toegediende antibiotica leiden tot het vrijmaken van cytokines zoals IL-1 β en TNF- α . IL-1 β induceert op zijn beurt productie van het neuropeptide CCK (cholecystokinine) dat leidt tot verminderde eetlust tijdens immunostimulatie. Toediening van antistoffen gericht tegen CCK resulteert in verbeterde eetlust. Daardoor kan de proinflammatoire respons compleet met de inductie van cytokinenafgifte worden geremd waardoor verdere lichaams- en gewichtsgroei van het dier meer wordt toegestaan dan dat de groei wordt versterkt. De darm wordt verondersteld in een constante staat van gecontroleerde ontsteking te verkeren en het is van levensbelang voor het organisme ervoor te zorgen dat de fysiologische processen optimaal verlopen. Darm geassocieerde problemen, zoals chronische ontstekingen zijn meer het gevolg van een te sterke dan van een te zwakke immuunrespons. Dit inzicht wordt ondersteund met moderne inzichten in de immunologie waarbij men ervan uitgaat dat op jonge leeftijd een gecontroleerde blootstelling aan infecties leidt tot een essentieel sterke opbouw van een immunoregulatorisch netwerk in de darmmucosa waardoor ontstekingen en lokale infecties worden onderdrukt. Wanneer een dergelijk netwerk niet krachtig genoeg wordt aangelegd of functioneert, wordt deze potentiële sterke en schadelijke immuunreactiviteit niet adequaat onderdrukt en treden klinische verschijnselen op. Hierbij spelen accumulatie van inflammatoire cellen, zoals neutrofiële granulocyten een belangrijke rol, maar ook lokale cytokinenproductie, en een dikkere darmwand. Antibioticumalternatieve componenten zouden dus in staat moeten zijn deze chronische darmontsteking krachtig te onderdrukken.

Veel antimicrobiële groeistimulators hebben een vergelijkbaar effect in verschillende productiedieren, zoals varkens en kippen, ondanks het feit dat deze dieren een sterk verschillende compositie van de darmmicrobiota hebben. Gebruik van deze middelen tijdens de groei en de ontwikkeling van de dieren zal resulteren in belangrijke verschuivingen in de darmmicrobiota. Hier lijkt een gemeenschappelijk werkingsmechanisme aan ten grondslag te liggen. Deze antibiotica vormen een sterk heterogene groep van verbindingen die verschillende effecten hebben op verschillende groepen micro-organismen (waaronder gram positief versus gram negatief). Deze micro-organismen in de darm zullen normaliter door kolonisatie-resistentie de groei van pathogenen remmen maar ook de groei van het

individu. Deze antibacteriële groei bevorderaars worden daarom soms ook wel groei toelaatbaarheidfactoren genoemd.

Alternatieven gebaseerd op immunomodulatie

Voor zover het de immunologische activiteit van antibiotica of hun alternatieven betreft zal de basis van het werkingsmechanisme gebaseerd zijn op *immunomodulatie*, dat de manipulatie van het immuunsysteem inhoudt in zowel positieve (immunostimulatie of immuunpotentiëring) als in negatieve (immuunsuppressie) zin. Immuunsuppressie is van belang bij transplantatie en bij immunopathologie veroorzaakt door autoimmuniteit, terwijl immuunpotentiëring noodzakelijk is om de weerstand van de gastheer tegen infecties te vergroten. Specifieke immunostimulatie is gericht tegen een enkel antigeen, zoals een vaccin voor een bepaalde infectieziekte. Niet-specifieke immunomodulatie is gericht op het induceren een gegeneraliseerde verschuiving in de immuunactiviteit tegen een groot aantal verschillende antigenen. Via immunomodulatie kunnen lokale bedrijfsgebonden infecties worden gecontroleerd met het additionele voordeel dat zij specifieke immuunresponsen versterken, zoals die bij gebruik van vaccins tegen levensbedreigende infectieziekten. Naast fytotherapeutica staan er momenteel drie groepen van natuurlijk voorkomende antimicrobiële producten in de belangstelling en die gebruikt kunnen worden als antibioticum: bacteriofagen, bacteriële celwand hydrolases (BCWH) en antimicrobiële peptiden (AMP).

Bacteriofagen

Bacteriofagen kunnen bacteriën lyseren wanneer ze gehecht zijn aan mucosale oppervlakken in wanneer deze in het bloed voorkomen. Bacteriofagen doen dit door de cel een enzym te laten produceren, lysine, dat bestaat uit een holine en tenminste een peptidoglycaan hydrolase. Er zijn diverse enzymen die hierbij een rol spelen, zoals lysozymes en amidases. Deze moleculen binden met een hoge affiniteit aan de bacteriële membraan. Deze fagen doden exclusief de bacteriën waarin ze zijn vermenigvuldigd. Er bestaan echter wel risico's aan deze therapie aangezien sommige fagen de productie van toxines kunnen induceren en anderen kunnen wanneer ze geïntegreerd raken in het genoom van de bacterie leiden tot immuniteit van de bacterie tegen de faag en dit kan vervolgens de virulentie van de bacterie veranderen. Door de lysis van de bacterie kunnen delen van het bacteriële genoom door de fagen worden opgenomen en daarmee kunnen fagen toxines en virulentiefactoren transporteren van de ene naar de andere bacterie. Wanneer men nu deze fagen systemisch dan wel mucosaal (parenteraal) toedient kan er een specifieke immuunrespons tegen worden opgewekt waardoor de werking van de enzymen wordt geneutraliseerd. Het blijkt echter dat neutraliserende antistoffen niet eerder worden opgewekt dan wanneer de fagen tenminste zeven maal worden toegediend terwijl de bactericide activiteit tegen de gevoelige patho-

gene bacterie vaak met een enkele toediening wordt gerealiseerd. Bacteriofagen repliceren zelfstandig zolang de bacteriën waar ze specifiek voor zijn in grote aantallen aanwezig zijn. Wanneer de bacteriën afnemen zullen ook de fagen afnemen en verwijderd worden, dit betekent dat fagen zelflimiterend zijn. Bacteriën zullen resistentie tegen fagen ontwikkelen. Deze resistentie zal echter altijd achterlopen bij de veel hogere mutatie en replicatiesnelheid van de fagen. Chemische antibiotica induceren bacteriële onbalans met risico op overgroeien door *Pseudomonas sp.* en *Clostridium difficile* die ernstige diarree en additionele infecties kunnen veroorzaken. De hogere bacteriële specificiteit van fagen leidt tot minder beschadiging in de endogene bacteriële microflora. Het is daarom wel noodzakelijk de specifieke bacterie tijdens de infectie te kennen alvorens de faagtherapie te starten. Op fagen gebaseerde therapieën blijken zeer efficiënt, hoog specifiek en relatief kosten effectief.

Bacteriële celwanden hydrolases

Bacteriële celwand hydrolases zijn bacteriële enzymen die het celwand peptidoglycaan netwerk (mureine) specifiek binden en vervolgens afbreken. Zelfs lysozymes blijken na denaturatie door verhitting non-enzymatische bactericide activiteit te bevatten. Naast lysozymes komen er ook autolysines bestaande uit membraangebonden eiwitten van de bacterie voor. Tevens komen er virolysinen voor die gecodeerd worden door dubbelstrengs faag DNA. Omdat deze bactericide werking totaal verschillend is van die van de meeste antibiotica zijn deze enzymen bruikbaar tegen resistente bacteriën. Het belangrijkste nadeel van deze enzymen is dat zij Gram negatieve bacteriën slecht afbreken vanwege de lipopolysaccharidenlaag die de peptidoglycaanlaag beschermt. Daar staat tegenover dat, in tegenstelling tot faagtherapie, er bij therapie met bacteriële celwand hydrolases geen kwesties spelen van immunogeniciteit, toxiciteit en ontwikkeling van bacteriële resistentie.

Anti-microbiële peptiden

Antimicrobiële peptiden vormen een grote familie van natuurlijk voorkomende peptiden, van 1 tot 5 kDa en met een positieve lading bij neutrale zuurgraad, afkomstig van diverse bronnen met verschillende structuren en functionaliteiten. Zo zijn er tenminste 700 eukaryotische AMP, bacteriocines en faag gecodeerde AMP. De eukaryotische AMP bestaan tenminste uit de defensines, cathelicidines en histatines en zijn vaak afkomstig van macrofagen, plasmacellen en cytotoxische T-cellen. Bij de productie van AMP zijn alle slijmvliesoppervlakken betrokken wat het belang onderstreept van intacte slijmvliezen voor de afweer. Een van de bactericide mechanismen is de vorming van ionkanalen en poriën in de celmembraan van de bacterie en daarmee vormen AMP een belangrijk onderdeel van de natuurlijke innate immuniteit. Daarnaast wordt de synthese van de celmembraan geremd, hebben sommige AMP een ribonuclease (RNase) of

deoxyribonulcease (DNase) activiteit die leidt tot DNA degradatie, en kunnen AMP als bacteriocines binden aan specifieke receptoren waardoor letale membraanverstoringen optreden. De AMP binden aan nieuw gevonden G-eiwit gekoppelde receptoren en beïnvloeden daarmee als endogene antibiotica allerlei processen, zoals chemotaxie van neutrofiële granulocyten en monocytten en helper T-cellen. AMP activeren daarnaast mestcellen en induceren zij angiogenese. AMP blijken in staat de activatie van transcriptiefactoren te induceren en dat kan optreden na binding van LPS (van Gram-negatieve bacteriën) aan CD14. Hierdoor treedt fosforylering op van I κ B dat gedegradieerd wordt en NF κ B vrijmaakt. Deze transcriptiefactor transloceert naar de kern en bindt aan consensusmotieven in het DNA die de transcriptie van diverse immuun gerelateerde genen aanstuurt. Deze DNA motieven blijken sterk geconserveerd in de evolutie en zijn bekend voor vele van deze induceerbare peptide antibiotica. Deze AMP hebben in het algemeen een zeer hoge specificiteit omdat ze toxisch zijn voor bacteriestammen die nauw gerelateerd zijn aan de producerende stam. De eukaryotische AMP zijn echter breed-spectrum antibacteriële middelen die zowel pathogene als residente bacteriën en zelfs eukaryotische cellen doden. Toch zijn juist de snelle en potente bactericide werking, de slechts geringe mate van resistentieontwikkeling en de brede toepasbaarheid bij bacteriële, schimmel- en virusinfecties veelbelovend als alternatief voor antibioticumtherapie.

Fytotherapie

Bovendien blijkt immunomodulatie de acute immuunsuppressie te remmen die geïnduceerd wordt door stress, infecties, voedingsgerelateerde problemen, vruchtbaarheidsproblemen, maar ook chronische inflammatoire condities. Voorbeelden van succesvolle immunomodulatie die bijvoorbeeld via voeding kan worden geïnduceerd en die bewezen effecten hebben omvatten β -glucanen uit schimmelcelwanden, fungal immunomodulatorische eiwitten (FIP) afkomstig uit medicinale paddenstoelen, en geselecteerde kruiden. Fytotherapeutica zijn bioactieve plantaardige inhoudstoffen die de gezondheid van dieren, vooral melkkoeien, kunnen bevorderen. Dergelijke bioactieve stoffen zijn aanwezig in saponine en tannine houdende planten en deze beïnvloeden de reproductie efficiëntie, de melkproductie, de vleeskwaliteit en de methaanproductie. Daarnaast blijken deze componenten besmetting met nematoden te remmen. Uiteraard wordt thans getracht deze fytotherapeutica geschikt te maken als alternatieven voor therapeutische behandeling van infecties.

PUFA's

Meervoudig onverzadigde vetzuren (poly unsaturated fatty acids, PUFA) zijn bekend vanwege hun vermogen gezondheidsmodulerende effecten te veroorzaken. Linolzuur (18:2n-6) en α -linoleenzuur (18:3n-3) zijn essentiële

vetzuren die bij veel zoogdieren via het dieet moeten worden opgenomen omdat deze dieren ze niet zelf kunnen maken. Door verdere polymerisatie worden membraanstructuren opgebouwd en deze vetzuren zijn de synthesebron voor eicosanoiden, zoals prostaglandines en leukotrienen, die in veel fysiologische processen betrokken zijn. De immunomoduloire activiteit van deze PUFA blijkt vooral gebaseerd te zijn op hun vermogen de cytokinenproductie van immuuncellen te beïnvloeden. Een dieet van n-3 PUFA's EPA en DHA blijkt de immuniteit tegen infecties met *Listeria monocytogenes* te remmen waarbij de productie van IL-12 en IFN- γ maar ook klaring van de infectie significant is afgenomen. Daarentegen blijkt dat de *Listeria*-specifieke T-cel reacties *in vitro* niet zijn aangetast. Daarmee blijken deze PUFA vooral in te grijpen op de innate immuuncomponent en daarmee de immuniteit tegen infecties te beïnvloeden. Zo worden dendritische cellen geremd in hun activatiecapaciteit na blootstelling aan LPS van Gram-negatieve bacteriën, hetgeen resulteert in verminderde cytokinenproductie (van TNF- α , IL-12 en COX-2 mRNA expressie) en T-cel stimulatievermogen. De regulatie van deze eicosanoiden blijkt een belangrijk mechanisme om infectie geïnduceerde ontsteking te remmen omdat veel van deze factoren (bijvoorbeeld PGE₂ en LTB₄) een sterke proinflammatoire activiteit bezitten en inflammatoire cellen kunnen rekruteren naar de plaats van de infectie geïnduceerde ontsteking. In de synthese van eicosanoiden blijkt fosfolipase A₂ een belangrijk enzym dat arachidonzuur (n-6 PUFA) van de fosfolipiden afsplitst en door verdere actie van cyclooxygenase en lipoxygenase worden prostaglandines en leukotrienen genereert. Door toepassing van neutraliserende antistoffen tegen PLA₂ worden ontstekingsremmende effecten verwacht met behoud van de bactericide werking van de gebruikte (alternatieven voor) antibiotica.

Probiotica

Net als fytotherapeutica blijken ook probiotica, waaronder men levende darmbacteriën verstaat met een gezondheidsbevorderende werking en vooral bestaande uit *Lactobacillen*, *Lactococcus*, *Bifidobacterien* gebruikt te worden als groei en gezondheidsbevorderaars en daarmee ook als therapeutikum bij infecties. Probiotica bestaande uit *Lactobacilli*, *Enterococci* and *Bifido's* zijn gebruikt om darminfecties, diarree en sepsis te voorkomen. Het werkingsmechanisme zal bestaan uit een combinatie van competitie voor aanhechtingsplaatsen, nutriënten, en groeiremming door andere, pathogene, bacteriën. Orale toediening van probiotica leidt tot versterkte antistofresponsen, versterkte tolerantie voor oraal toegediende antigenen, voorkoming van infecties door *Helicobacter pylori*, remming van de ziekte van Crohn, remming van de ontwikkeling van allergie, verminderde schimmel en bacteriële infecties ook in andere slijmvliezen dan de darm, en zelfs remming van tumorgroei. Hierbij blijkt vooral de modulerende activiteit op dendritische cellen van belang waardoor er een vorm van T-cel tolerantie

wordt versterkt waarbij regulatoire T-cel populaties nadrukkelijk zijn betrokken. Probiotische effecten kunnen eveneens worden veroorzaakt door toediening van prebiotica die de fysiologische functies van een beperkt aantal darmbacteriën bevorderen. Dit zijn in het algemeen niet-verteerbare voedingsingrediënten zoals fructo-oligosacchariden, inulin, lactulose, en van melk afkomstige caseïne derivaten. Ook symbiotische combinaties van prebiotica met probiotica en eventueel met nog toegevoegde enzymen en organische zuren, blijken een vergelijkbare toepassing te kunnen hebben.

Biomarkers en immunomodulators

Het zoeken naar alternatieven voor antibiotica wordt bemoeilijkt door het ontbreken van eenduidige biomarkers voor gezondheid bij mens en dier. Ofschoon vele humorale parameters van het immuunsysteem en het neuro-endocriene systeem bekend zijn en nauwkeurig kunnen worden bepaald in serum, ontbreken nog eenduidige testen voor de bestudering van cellulaire aspecten van gezondheid. Vanuit de immunologie worden diverse oplosbare parameters (antistoffen, cytokinen, acute fase eiwitten, complementenzymen), celgebonden receptoren (Toll-like receptoren, mannosereceptor, scavengerreceptor) en cellulaire parameters (natural killer cellen, monocyten/macrofagen, T-cel subsets) geacht informatief te zijn als biomarkers voor de gezondheidsstatus van een individu. De validatie van dergelijke biomarkers en de vaststelling van hun prognostische waarde voor gezondheid hebben nog onvoldoende plaatsgevonden. Vele invloeden op de gezondheid en het welzijn zijn bekend en deze modulators zijn geassocieerd aan de leefstijl, de fysieke leefomgeving, de houderij, de voeding, het stressniveau en de infectiedruk. De effecten van deze modulators (zoals gemeten via de biomarkers) op de gezondheid en hun potentiële toepassing voor de preventie van ziekte en daarmee het faciliteren van optimale groei, gezonde productie en verlengde levensverwachting bij productiedieren zijn op dit moment nog onvoldoende bekend. Dit betreft niet alleen daar waar het modulatie via therapeutica (inclusief de momenteel nog toegepaste antibiotica) betreft maar ook potentiële nieuwe toepassingen via geselecteerde voedingscomponenten, voedseladditieven en functional foods.

Conclusies

- Vele bioactieve inhoudstoffen worden thans voorgesteld als alternatieven voor antibiotica die middels de voeding kunnen worden aangeboden en die snelle groei en optimale productie bij behoud van welzijn en een goede gezondheid van dieren gunstig beïnvloeden.
- Er ontbreekt echter kennis over de selectie van biomarkers die gevalideerd zijn en die een voldoende prognostische waarde hebben om de effecten van deze voedseladditieven en modulators van de gezondheid objectief en consistent te kunnen bepalen.

- Antibioticumalternatieven dienen ontstekingsremmend te werken, bij te dragen tot een sterk immunoregulatorisch netwerk en vooral een effect te hebben in de opbouw en activiteit van het aangeboren of natuurlijke weerstandssysteem.
- Het zoeken naar geschikte alternatieven dient gebaseerd te zijn op een gedegen, nu nog grotendeels ontbrekende, interdisciplinaire kennis van de microbiologie, immunologie, fysiologie in combinatie met chemie, farmacologie en diervoeding.
- De Nederlandse onderzoeksinstituten hebben in principe deze kennis in huis maar deze kennis wordt thans slechts gefragmenteerd ingezet. Grote nationale onderzoeksprogramma's met gedegen financiering en in samenwerking met het bedrijfsleven en boerenorganisaties kunnen een voorsprong op dit internationale onderzoeksgebied garanderen.

Referenties

Jeurink PV, Lull Noguera C, Savelkoul HFJ, Wichers HJ. Immunomodulatory capacity of fungal proteins on the cytokine production by human peripheral blood mononuclear cells. *Int Immunopharmacol* 2008; 8: 1124-1133.

Lull C, Wichers HJ, Savelkoul HFJ. Antiinflammatory and immunomodulating properties of fungal metabolites. *Mediators Inflammation* 2005; 2005(2): 63-80.

Parisien A, Allain B, Zhang J, Mandeville R, Lan CQ. Novel alternatives to antibiotics: bacteriophages, bacterial cell wall hydrolases, and antimicrobial peptides. *J Appl Microbiol* 2007; 104: 1-13.

Savelkoul HFJ, Tijhaar E. Diergezondheid en immunomodulatie van de natuurlijke weerstand. *Tijdschrift Diergeneeskunde* 2007; 132: 764-769.

Zinkernagel RM. On natural and artificial vaccination. *Annu Rev Immunol* 2003; 21: 515-546.

Zinkernagel RM. On immunity against infections and vaccines: credo 2004. *Scand J Immunol* 2004; 60: 9-13.

Een veterinair perspectief

Inleiding

De toenemende antimicrobiële resistentie in pathogenen wordt wereldwijd als één van belangrijkste bedreigingen voor de volksgezondheid gezien. Het aanhoudend gebruik van relatief grote hoeveelheden antibiotica in dier- en veehouderij blijft daarmee zonder gewijzigd beleid, potentieel een belangrijke bron voor antibiotica resistente micro-organismen. De dierhouder en de gebruiker van dierlijke producten in de gehele gebruikersketen lopen het risico met deze resistente micro-organismen in aanraking te komen (FAO/OIE/WHO Report 2003, 2004 & 2006).

In elke dierhouderij komen van tijd tot tijd infecties voor. Als deze ziekten niet met antibiotica bestreden worden dan komt de gezondheid van de dieren en mogelijk ook van mensen daar waar het gaat om zoönosen ernstig onder druk te staan. Daarom moet het huidige antibiotica gebruik worden omgebogen naar een 4 V benadering: Voorkomen, Verminderen, Verfijnen en Vervangen. Dit is gebaseerd op het *voorkómen* dat infecties optreden of ernstige gevolgen hebben en indien ze toch optreden behandelingen toepassen, die leiden tot het gerichter inzetten van antibiotica door verbetering van diagnostische mogelijkheden (*verfijnen*) of het inzetten van antibiotica beperkt (*verminderen*). In ieder geval is het streven naar een duurzaam veehouderijsysteem een basisvoorwaarde.

De gevolgen van antibiotica resistentie doen zich tot nu toe voornamelijk voelen in de humane geneeskunde en gezondheidszorg. Desondanks lijkt het met kracht ter hand nemen van de ontwikkeling van alternatieven voor het gebruik van antibiotica een relatief lage prioriteit te hebben. Echter, ondanks de notie dat de incentives liggen in een andere maatschappelijke sector, lijkt het dringend noodzakelijk om in de landbouwhuisdieren

antibiotica gebruik te beperken tot het uiterst noodzakelijke en waar mogelijk de toepassing van effectieve alternatieven voor het gebruik van antibiotica te bevorderen. Een efficiënte benadering van de antibiotica resistentie problematiek en toepassing van alternatieve strategieën kan alleen worden gerealiseerd indien zowel het gebruik in de humane medische sector, bij de gezelschapsdieren en bij landbouwhuisdieren geïntegreerd wordt aangepakt.

Nog zijn krachtige alternatieve middelen met antimicrobiële eigenschappen niet beschikbaar. Daarmee is daadwerkelijke vervanging van antibiotica door nieuwe alternatieve middelen een oplossing voor de langere termijn (> 8 jaren).

Voor de ontwikkeling van reële alternatieven voor antibiotica zijn diverse strategieën denkbaar. De vraag die we hier proberen te beantwoorden is welke van de alternatieve strategieën het meest zinvol en kansrijk zijn in een bijdrage aan vermindering van de antibiotica-resistentie problematiek.

Op zoek naar alternatieven

De duurzaamheid en diergezondheid ondersteunende strategieën worden ten onrechte gezien als alternatieven voor antibioticagebruik. De effectiviteit van de meeste van deze strategieën is beperkt in vergelijking met de krachtige primaire antibiotica. De toepassing ervan heeft dan ook slechts zin als de inzet geschiedt in het kader van aanvullende maatregelen tot beperking van inductie van resistentie en beperking van de verspreiding van resistente micro-organismen.

Bij alternatieven voor het gebruik van antibiotica onderscheiden we drie principes: 1. Exclusie van pathogenen: geen infectie, 2. Vaccins: preventie van ziekte en 3. Alternatieven: een generatie nieuwe innovatieve middelen die interfereren in vitale functies van pathogenen zelf.

Bij het genereren en gebruik van alternatieve middelen voor antibiotica in de veehouderij moeten we de belangrijke vragen stellen die gelden voor 'klassiek' antibiotica gebruik. Alleen dan kan de inzet van deze nieuwe middelen in mens of dier verantwoord geschieden. Voor de dierhouderij zijn de belangrijkste vragen bij toepassing van alternatieve middelen voor antibiotica: 1) Zijn de middelen die worden ingezet economisch haalbaar en even krachtig bij het bestrijden van bacteriële infecties als de huidige antibiotica? 2) Leiden alternatieve middelen tot een positieve selectiedruk op resistentie en potentieel risico voor de volksgezondheid? Voor het beantwoorden van deze vragen zal het nodig zijn experimentele evaluaties uit te voeren in daarvoor geschikte modellen. Onderzocht moet worden of zulke modellen voorhanden zijn of kunnen worden ontwikkeld.

De resistentie problematiek omvat de moleculair biologische aspecten zoals het ontstaan van mutaties of het opnemen van nieuw genetisch materiaal. Verspreiding van bestaande resistenties vindt plaats op moleculair niveau door interacties tussen micro-organismen en spreiding van

micro-organismen in het milieu (gastheren inbegrepen). Elk van deze processen kent een eigen dynamiek. Voor een efficiënt en verantwoord toekomstig gebruik van antibiotica maar ook voor efficiënte inzet van alternatieven voor antibiotica is het noodzakelijk dat meer kennis over de epidemiologie van resistentie en de moleculaire epidemiologie van resistentiegenen wordt ontwikkeld. Er dient vervolgens een analyse gemaakt van risicofactoren die het vóórkomen of de verspreiding van resistentie bevorderen. Een gedegen risico analyse moet vooraf gaan aan verantwoord gebruik van (alternatieven voor) antibiotica.

Alternatieven voor antibioticagebruik

Voorkómen van ziekte en antibioticagebruik in de veehouderij: exclusie van pathogenen
Exclusie van pathogeen door filtratie, toegangscontrole etc., vaak onder één noemer gebracht als SPF-houderij, zal zeker leiden tot verminderd antibioticagebruik. Hoewel de technologie direct beschikbaar is lijkt toepassing op grote schaal belemmerd te worden op grond van economische en maatschappelijke bezwaren t.a.v. dit type houderij (geen uitloop, volledige klimaat beheersing). Hoewel wetenschappelijke onderbouwing voor de z.g.n. welzijnsbezwaren feitelijk ontbreekt, speelt dat een belangrijke rol in de maatschappelijke acceptatie die nodig is om een houderij voor varkens en kippen met een maximaal niveau van bio-security succesvol te maken. In de reguliere dierhouderij (gangbaar, biologisch) kunnen maatregelen die de insleep van infectieziekten beperken ook een positief effect hebben op het voorkomen van gebruik van antibiotica. Maar omdat het 'open' systemen betreft is het effect daarvan in principe beperkt.

Nanopartikels van edelmetalen (goud, zilver) blijken bijzondere eigenschappen te hebben. Recent worden de antiseptische eigenschappen van zilver gebruikt voor coating van medische instrumenten, kunstledematen, ziekenhuismeubelen en zelfs linnengoed. Kunststof-coating met daarin calciumfosfaat-zilver nanopartikels blijkt zeer effectief. Het calciumfosfaat wordt door de micro-organismen opgegeten en dan komen daarna de toxische zilver deeltjes vrij. Na apoptose van de bacterie worden de deeltjes worden daarna doorgegeven naar volgende micro-organismen (Loher et al., 2008). Coating van bedrijfsruimten en instrumenten kan in de toekomst mogelijk het hygiënebeleid danig ondersteunen. De vinding is in productie genomen en kan mogelijk voor de veterinaire praktijk ondersteuning bieden bijv. in SPF houderij en bij houderijen waar regelmatige ontsmetting moet plaats vinden vóór het ontvangen van nieuwe dieren t.b.v. mesterij.

Voorkómen van ziekte en antibioticagebruik: Vaccinatie

Vaccinatie maakt gebruik van het dier-eigen immuunsysteem en maakt toepassing van antibiotica overbodig. De bescherming is afhankelijk van de kwaliteit van het vaccin maar is in veel gevallen levenslang. Er is zeer

beperkt sprake van positieve selectiedruk. Gebruik van effectieve vaccins in de dierhouderij leidt i.h.a. niet tot nieuwe risico's voor de volksgezondheid. Het gebruik van vaccins leidt bij juiste toepassing in LBH tot weinig risicomomenten. Echter de toepassing dient wel 'State of the Art' en dus preventief te gebeuren. Dat vereist meer discipline dan soms in de dierhouderij wordt opgebracht (dosis, leeftijd, timing). Vaccinatie tijdens ziekte kan leiden tot dragerschap. Ook een risicofactor bij gebruik in LBH is imperfecte vaccinatie die leidt tot dragerdieren die een infectiebron kunnen vormen waarmee mensen in aanraking kunnen komen. Ook het gebruik van weliswaar zeer effectieve levende vaccins kan leiden tot dragerschap bij gevaccineerde dieren of hun koppelgenoten.

Het ontwerpen van een vaccin design wordt bemoeilijkt doordat niet altijd de 'correlaten van bescherming' bekend zijn. Vaak is alleen de respons van een ziekmakende (letale) infectie bekend. Welke elementen van de bacterie dan opgenomen dienen te worden in een beschermend vaccin is op grond daarvan niet altijd vast te stellen. Het opsporen van de vitale elementen die geschikt zijn voor vaccinatie kan worden bevorderd door bestuderen van gastheer-pathogeen interacties met nieuwe x-omics technieken (genomics, proteomics etc.). De geïdentificeerde elementen die betrokken zijn bij vroege beschermende immuunreactiviteit kunnen in een vaccin worden opgenomen.

Het ontwikkelen van een veilig en breed werkend vaccin d.w.z. een vaccin dat alle varianten van het micro-organisme aanpakt wordt ook bemoeilijkt doordat van veel pathogenen talloze varianten voorkomen (serotypen, strains). Die hebben niet alle een voor de hand liggend geconserveerd virulentie element of een geconserveerd element dat tot immuunreactie en neutralisatie leidt. Bovendien dienen bij het ontstaan van nieuwe virulente stammen dienen vaccins te worden aangepast op deze factoren.

Voor bepaalde antibacteriële vaccins voor de mens is de z.g.n. conjugaat-technologie ontwikkeld om dit probleem te tackelen. Een conjugaat-vaccin lost twee problemen tegelijk op. Het leidt tot een efficiënte immuunrespons inductie omdat de respons tegen sterk geglycosileerde eiwitten of polysacchariden wordt versterkt en bovendien kunnen veel verschillende elementen in een vaccin worden opgenomen. Tot nu toe is die voor dieren te duur geacht. Voorlopig lijkt het voor veel bacteriële pathogenen echter de enig begaanbare route.

Kosten baten analyse is niet eenvoudig te maken omdat elk vaccin slechts één of een beperkt aantal ziekten bestrijdt en het aantal cruciale ziekten niet eenvoudig is aan te geven. Samenstelling van een evenwichtig pakket vergt nadere studie. Algemene kosten baten analyses laten zien dat vaccins behoren tot de beste geneesmiddelen die beschikbaar zijn. De kosten van vaccinontwikkeling en registratie zijn hoog en de doorlooptijd lang. Een voor de hand liggende keuze is om bij pathogenen die zoönosen veroorzaken zonder in de dierlijke gastheer te leiden tot ziekte (kip, varken vs

Salmonella en *Campylobacter*) te besluiten geen nieuwe vaccins geschikt voor dier maar voor mens te ontwikkelen. Verder ligt de prioriteit eerst bij zoönosen (bijv. Q-fever) en vervolgens bij ziekten die ernstige economische verliezen tot gevolg hebben en het dierenwelzijn sterk negatief beïnvloeden. Ziekten waar nog in het geheel geen vaccins tegen zijn dienen voorrang te krijgen. De beperkingen van bepaalde vaccinontwikkelingen zijn duidelijk aangegeven door Dr. Segers elders in deze bundel onder andere voor *E.coli* O157:H7 en MRSA.

Omdat in varken het respiratoire ziekten complex zeer belangrijk is dienen tegen de veelal secundaire bacteriële infecties vaccins te worden ontwikkeld. Voor enkele van deze pathogenen zijn vaccins beschikbaar, maar verbeterde diagnostiek en evenwichtige multi-vaccins zijn nodig om tot reductie van antibiotica gebruik te komen. Voor *S.suis* zijn dringend vaccins nodig die een breed serotype-spectrum kunnen bestrijden. Ontwikkeling van een vaccin tegen *Serpulina hyodysenteria* is tot nu toe te moeilijk gebleken. Financiering van het precompetitieve traject gebaseerd op gastheer pathogeen interactieonderzoek zou hier mogelijk tot een doorbraak kunnen leiden.

In kippen is bestrijding van *Salmonella* effectief in het reduceren van het aantal humane infecties afhankelijk van de lokale prevalentie van bepaalde serovars (*S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*, UK). Voor nieuwe serovars (*S.Java*, NL) moet dan alsnog naar alternatieven worden gezocht. Voor de industrie heeft een vaccin tegen *Clostridium perfringens* een hoge prioriteit.

Voor runderen zijn er vaccins waar verbetering wenselijk is maar niet van zeer grote invloed op antibiotica gebruik. Investing in effectieve bestrijding van mastitis en para-TBC hebben meer prioriteit. De kalversector neemt relatief het grootste deel van de antibiotica consumptie voor zijn rekening. Vaccin ontwikkeling is niet opportuun. De kwetsbare gezondheidsconditie vindt zijn oorzaak in gekozen managementsysteem en voercondities.

Voorkomen of verminderen van infectie met bacteriofagen en lytische enzymen

Geselecteerde bacteriofagen doden bacteriën door ze op een gastheer-specifieke wijze te lyseren: zgn lytische cyclus. Dit in tegenstelling tot antibiotica die i.h.a. de groei remmen en niet gastheerspecifiek ook nuttige flora remt in haar groei. Voor de faagactiviteit is nodig dat de bacteriën metabool actief zijn. Het is een therapie die ook in multi-antibiotica resistente micro-organismen effectief is bij toepassing in het dier alsook bij toepassing op producten. Fagen zijn veilig, komen in de natuur voor en op allerlei voedingsproducten (groente, fruit etc.) en hebben een GRAS status (Generally Regarded As Safe). De duur van de bescherming door fagen is beperkt omdat snel resistentie optreedt. Maar fagen muteren sneller dan bacteriën en dat leidt tot steeds weer nieuwe fagen met nieuwe therapeutische mogelijkheden. Slechts indien geschikte vitale pathway blokkers voor faag-resistentie worden

ontwikkeld zal de toepassing van bacteriofagen een meer solide basis krijgen, omdat deze middelen het ontstaan van faag-resistentie zullen voorkomen. Een voorlopig alternatief is toepassing van een cocktail van fagen voor een gastheer waarbij de fagen ieder tegen een verschillend deel van een virulentie factor zijn gericht kan het risico van resistentie drastisch verminderen.

Resistenties die in bacteriën ontstaan tegen specifieke bacteriofagen maken het middel bacteriofaag onwerkbaar maar leveren niet veel meer problematiek dan dat er geen reductie van ongewenste blootstelling aan pathogenen plaats vindt. Toepassing van faagtherapie in de overgangsfase naar meer duurzame therapie of toepassing van preventieve middelen is betrekkelijk veilig en eenvoudig. Rekening dient gehouden met het voortdurend optreden van resistentie en de noodzaak nieuwe non-resistente fagen te isoleren.

Lytische enzymen zijn enzymen, die kunnen leiden tot de dood van de micro-organismen die er mee in aanraking komen. Lytische enzymen van bacteriofagen (lysinen) zijn ver geëvolueerde moleculen die door fagen worden geproduceerd om de celwand van de bacterie die de fagen produceert te digesteren zodat de geproduceerde fagen vrij komen. De endolysinen bereiken en degraderen het peptidoglycaan door laesies die in het membraan worden gemaakt door zgn. holinen. Dit leidt tot lysis van de bacteriële cel. Endolysinen zijn ook actief als gezuiverd rDNA eiwit.

Applicatie leidt tot snelle lysis van de bacterie. Endolysinen zijn selectief voor het species specifiek peptidoglycaan. Dat maakt ze tot veel belovende krachtige antibacteriële middelen omdat ze op grond van deze specificiteit de nuttige flora onaangestast laten. Lytische enzymen zijn effectief tegen Gram+ bacteriën. Resistenties zijn nog niet beschreven.

Deze antimicrobiële activiteit is interessant omdat ze is gebaseerd op een nieuw mechanisme, een beperkt bacterieel spectrum heeft, niet wordt beïnvloed door bestaande (multi) resistentie voor antibiotica resistente en bovendien wordt aangenomen dat de kans dat er resistentie tegen wordt ontwikkeld gering is (Fischetti, 2005; Borysowsky et al., 2006,). Dat kan leiden tot het genereren van een heel repertoire aan nieuwe antibiotische eiwitten (Lopez et al., 1997). De uit fagen geïsoleerde enzymen hebben een specificiteit voor de bacteriën waartegen de fagen gericht zijn (bijv. streptokokken, stafylokokken, bacillus, listeria). De werkingsbreedte binnen klassen en subklassen van bacteriën wordt onderzocht. Omdat de vier klassen van endolysinen verschillende onderdelen van de bacteriële targetmoleculen degraderen kan het nuttig effect synergistisch zijn. De specificiteit van de enzymen gebruikt kunnen worden voor snelle diagnostische bepaling van bacteriële typen en subtypen. De therapie, die nu voor toepassing in humane setting wordt ontwikkeld met het faag lysine Cp1-1 bleek in experimentele pneumococcon meningitis effectief en wordt als een zeer veel belovende benadering gezien (Grandgirard et al., 2008). Ook voor Streptokokken-sepsis is experimenteel gevonden dat de toepassing zeer

effectief is ook daar waar als gevolg van multi-resistente pathogenen geen remedie meer voorhanden is (Jado et al., 2003).

De lysinen worden vooral gebruikt tegen bacteriën die muceuze membranen koloniseren omdat dit met klassieke antibiotica vaak niet heel effectief is. Bij de huidige stand van zaken worden ze voornamelijk gezien als middelen die effectief systemisch maar ook mucosaal (maag-darmkanaal, oog, urogenitaal, ademhalingswegen) kunnen worden toegepast. Natuurlijk wordt ook hard gewerkt aan middelen die analoog aan de lysinen ook gram negatieve bacteriën zouden kunnen aanpakken op een vergelijkbare wijze o.m. door gebruik te maken van destabilisatie van het buiten membraan in combinatie met lytische enzymen m.n. transglycosylasen. Op grond van hun rol in het celwand metabolisme wordt deze klasse van moleculen geacht een rol te kunnen spelen als breed spectrum bactericide middel (Scheurwater et al., 2008).

Positieve selectiedruk op resistentie tegen lysinen is tot nu toe niet waargenomen en wordt op grond van de geconserveerde vitale mechanismen niet erg waarschijnlijk geacht. Indien deze zou ontstaan gelden dezelfde overwegingen als voor huidige klassieke antibiotica.

Risicofactoren bij gebruik in LBH zijn niet bekend. Niet uitgesloten kan worden dat bij systemisch gebruik van intacte eiwitten of polypeptiden een immuunrespons van de gastheer het herhaald effectief gebruik van hetzelfde middel bemoeilijkt. Het produceren van getrunceerde elementaire structuren kan hiervoor een oplossing bieden. De aard van de problematiek zal in dieren en mens vergelijkbaar zijn. Experimenteel is gevonden dat de enzymen in geringe hoeveelheden (nanogram-microgram range) toegediend actief zijn. Toepassing bij speendiarree in biggen, bij necrotische enteritis in kippen maar ook ter bestrijding van Salmonella's en Campylobacter in kippen en varkens kunnen potentieel een enorme impact hebben op antibiotica gebruik en volksgezondheid. Van lytische enzymen mag verwacht worden dat toepassing op midden lange termijn beschikbaar komen bij voldoende investering (3-5).

Interferentie met spreiding van dragers van resistentie: "DNase-therapie (darm)"

Het risico van resistentie-inductie mogelijk worden beperkt door het gebruik van antibiotica te laten vergezellen van een combinatie met DNase therapie. Daarbij is het idee dat bij degradatie van bacteriën als gevolg van antibiotica gebaseerde blokkade van vitale mechanismen (celwand, eiwitmetabolisme) er DNA vrijkomt dat de drager is/kan zijn van resistentie factoren. Het gebruik van DNA'se zou kunnen voorkomen dat de overdracht van resistentie plaats vindt. In mensen wordt bij verschillende experimentele therapieën DNase gebruikt bijv. bij behandeling van cystic fibrose met verhoogde DNA concentraties in luchtwegmucus. Voor toepassing in de dierhouderij lijkt deze relatief kostbare benadering voorlopig echter niet voor de hand liggend.

Innovatieve strategieën voor interferentie in overlevings- & virulentie-strategieën

Naast de huidige antibiotica zijn er nog tal van andere mogelijkheden welke de bacteriële strategie om de gastheer ziek te maken, pareren. Bovendien mag worden verwacht dat op grond van de snelle ontwikkelingen in de moleculaire en genetische kennis van bacteria nog meer nieuwe mogelijkheden in zicht komen. Het verantwoord gebruik van nieuwe generaties antibiotica gebaseerd op nieuwe strategieën zal leiden tot een relevante reductie van bacteriële infecties en ziekten die daar het resultaat van zijn. Van groot belang is dat voor dit type benadering voldoende fondsen kunnen worden geworven om de ontwikkelingen door te zetten vanuit de basale nieuwsgierigheid naar de toepassingsmogelijkheden

Interferentie in anti-virale mechanismen van bacteria; "innovatieve pathway blokkers"

Recent zijn grote vorderingen zijn gemaakt bij het ontrafelen van de mechanismen waarmee bacteriën (prokaryoten) zich tegen virussen (bacteriofagen) beschermen. (Young, 2008; Brouns et al., 2008). Prokaryoten integreren korte fragmenten van viraal genomisch DNA in korte repeterende palindroom sequenties (CRISPR's). Na transcriptie van zulke sequenties komt er een cascade op gang van activiteiten waarvan het resultaat is dat geïnterfereerd wordt in de virus replicatie. De herkenning van virale sequenties door bacteriële receptoren leidt tot een vorm van 'geheugen'. Bij volgende ontmoetingen met hetzelfde virus ontstaat resistentie. De Wageningse groep (Brouns et al, 2008) was de eerste die heeft laten zien welke eiwitten onmisbaar zijn bij dit proces. Het resultaat van dit onderzoek geeft aan dat we steeds meer beginnen te begrijpen van de mechanismen die bacteriën in verschillende milieus gebruiken om te overleven. Verwacht wordt, dat die kennis ook kan leiden tot methoden en producten die deze verdedigingsmechanismen blokkeren en daarmee de bacteriën gevoelig maken voor virussen. Faagtherapie, die nu nog wel eens wordt beschouwd als een therapie die snel tot resistentie leidt en dus geen duurzaam effect heeft, kan straks door toepassing van nieuwe interferenties in het resistentiemechanisme, tot een van de nieuwe zeer effectieve strategieën tegen bacteriële infecties leiden.

Interferentie in suppressie van RNA-silencing

PAMP's, "pathogen associated molecular patterns" zijn structuren in pathogenen die, in de gastheer die wordt geattaqueerd, een sequentie van gebeurtenissen in gang zet bij de bestrijding van dat pathogeen. Er wordt een subset van micro-RNA's gereguleerd waarbij de interactie met de receptoren voor deze PAMP's de Toll Like Receptors (TLR) van de gastheer dendritische cellen een belangrijke rol speelt (Janssens & Beyaert, 2003). De rol van micro RNA's in de innate immuniteit van de gastheer is nog niet geheel bekend (De Diego et al., 2008). Recent is wel duidelijk geworden, dat interferentie met deze gastheerstrategie door onderdrukking van het

RNA-silencing mechanisme van de gastheer (Navarro L et al., 2008) door bacteriën, maar ook door virussen, wordt gebruikt om in de gastheer (plant of dier) de defensie te ontregelen en zo tot infectie en vervolgens ziekte te leiden. Onze toenemende kennis van deze gastheer ontregelings-trucs van pathogenen kan ons in staat stellen het pathogeen aan te pakken op een mechanisme waar dit tot nu toe niet is gebeurd. Mogelijk zijn gastheren te selecteren die beter dan andere gebruik maken van de innate immuniteit ofwel minder gevoelig zijn voor de ontregeling door de micro-organismen. Selectie voor verbeterde innate immuunrespons (PAMP super-responders) lijkt mogelijk.

Inactivatie van “transformatie of transductie” complexen door vaccinatie of competitie

Als de overdracht van de resistentiefactoren tussen bacteriën verhinderd kan worden is het risico van het verspreiden van bestaande resistenties mogelijk te beperken. De ‘levensduur’ van de huidige antibiotica kan hiermee op een veilige wijze worden verlengd. Daarbij wordt gedacht aan moleculaire structuren die competiteren om de ‘docking sites’ van de transformatie en transductie complexen, maar ook zou gedacht kunnen worden aan vaccinatie waarbij gevormde antistoffen deze complexen inactiveren. In principe is een strategie met farmacologische aanpak eenvoudiger. De aanpak via vaccinatie levert mogelijk systemisch voldoende activiteit op maar zou wel eens onvoldoende selectief en effectief kunnen zijn op niveau van immuunrespons aan de mucosa.

Natuurlijke (peptide) antibiotica

- *Klassieke peptide antibiotica* worden meestal in bacteria en schimmels geproduceerd en structuren omvatten van twee of meer aminozuur varianten vergelijkbaar met penicilline (Hancock & Chapple, 1999). De nadelen die aan bestaande antibiotica kleven gelden ook voor deze peptiden.
- *Natuurlijke antibiotische peptiden* komen in alle levende organismen voor. Ze worden in de cel via het ribosoom geproduceerd in alle levende organismen als onderdeel van het innate immuunsysteem. Ze vormen een onderdeel van de primaire natuurlijke afweer (Linde et al., 2008). Het gebruik in een omgeving waar ze niet natuurlijkerwijs voorkomen kan leiden tot nieuwe toepassingen. Echter indien resistentie ontstaat kunnen ze hun werking in subtiel in evenwicht zijnde ecosystemen niet goed meer uitoefenen. Het toekomstige gebruik is daarom omgeven met moeilijk in te schatten risico's.
- Bacteriën lijken zich steeds vaker niet als individu maar als een multi-cellulair-achtige organisatie te gedragen. Veel bacteriën maken peptiden waardoor ze fysiek met elkaar in verbinding staan. Recent is gevonden dat contact (poly)peptiden niet altijd het individuele bacteriewelzijn dienen (Engelberg-Kulka et al., 2008). Ze leiden tot geprogrammeerde cel-dood

(PCD) die niet alleen in multi-cellulaire eukaryoten maar ook in bacteria voorkomt. In *E.coli* komt een toxine-anti-toxine module voor die ook in andere bacteriën wordt gevonden op het chromosoom. De inductie van het systeem is gebaseerd op stress condities (substraatgebrek, antibiotica) maar ook op inductie van een z.g.n. additie module die door een plasmide pro-faag wordt geproduceerd. Gebleken is dat als de productie van het toxine molecule op gang komt er een onomkeerbaar PCD proces in gang wordt gezet in de bacterie. Inductie van bacteriële suïcide met specifieke poly-peptiden is ook voor andere micro-organismen beschreven (e.g. bacillus, pseudomonas, mycobacteriën). Engelberg-Kulka et al. (2006) suggereren, dat dit aanknopingspunten biedt voor het van buitenaf in gang zetten van dit PCD proces.

- In een heterogene populatie (fenotype noise) vormen de overlevende individuen (bacteriën) van een catastrofe, met eenzelfde fenotype, de basis voor een nieuwe populatie (Ackerman et al., 2008). Dit lijkt een normale evolutie. Het lijkt er echter op dat in bepaalde gevallen de individuen die de catastrofe niet overleven zich zelf opofferen door een geprogrammeerde celdood in gang te zetten. Deze inductie van bacteriële suïcide is een uiterste vorm van het altruïsme die we wel meer zien in insecten of micro-organismen die voor elkaar substraat zijn of produceren. Sommige pathogene toxinen komen pas vrij als de cel die ze produceert zelf lyseert (pneumolysine, shiga-toxin, toxinen van *C. difficile*). Ackerman et al. (2008) laten voor *Salmonella* zien dat een subgroup van 100 bacteriën voldoende is in de catastrofe situatie om te overleven en voordeel te halen uit de catastrofe bijv. effectieve infectie en pathogenese als beloning voor de overlevende populatie. De kennis van deze destructieve samenwerking in bacteriële populaties kan ons leiden naar peptiden of andere structuren, die in staat zijn om deze inductie van buiten af tot stand te brengen. Op grond van het mechanisme mag specificiteit worden verwacht en geringe neiging tot resistentie inductie. Behalve voor *Salmonella* is het fenomeen ook beschreven voor streptokokken en *Clostridium difficile*.
- Bacteria groeien in kolonies of in lagen die oppervlakten bedekken zgn. biofilms. Zulke biofilms vormen een probleem bij invasieve therapieën (naalden, katheters, endoscopen). Bacteriën in zo'n biofilm zitten, blijken gemeenschappelijke afweer te ontwikkelen tegen fagocyten van de gastheer (mens/dier) en produceren antibiotische stoffen. Zo is in mariene bacteriën een stof gevonden, violaceïne, die bijv. een atterende amoëbe doodt. Deze stof wordt alleen gemaakt door bacteriën in een biofilm aanwezig zijn, maar niet door individuele bacteriën. Deze ontdekking geeft aanleiding te denken dat wanneer bacteriën in een biofilm worden gekweekt zij stoffen zouden kunnen produceren die voor bepaalde klassen pathogenen dodelijk zouden kunnen zijn (Matz et al., 2008). Natuurlijk is aan deze recent ontdekte zeer potente stoffen nog wel

veel werk nodig voor ze gebruikt kunnen worden maar voor de lange termijn en voor bepaalde categorieën van pathogenen mn. parasieten, zouden zij zeker een zeer belangrijke bijdrage kunnen leveren.

Conclusies

De neiging bestaat om bij het ontwikkelen van nieuwe innovatieve strategieën toch hoofdzakelijk te kiezen voor aanpassing of verbetering van bestaande strategie in plaats van nieuwe wegen in te slaan. Bij alternatieven voor antibiotica lijkt het kiezen voor de veilige routes niet voor de hand liggend. Voor het bestrijden van bacteriële infecties zijn middelen nodig die veilig, krachtig, selectief en betrouwbaar zijn. Middelen die ‘een beetje helpen’ lossen de problematiek van huidige antibiotica gebruik niet op. Het maken van keuzen tussen de verschillende alternatieve strategieën is helaas niet eenvoudig omdat de ontwikkeling niet in alle gevallen even ver is. Toch moeten we niet in de valkuil stappen dan toch maar bij de ‘bekende’ middelen te blijven doorontwikkelen terwijl potentieel zeer krachtige strategieën op de plank blijven liggen. Er is zoveel nader onderzoek nodig, dat de keuze tussen de verschillende strategieën mogelijk wordt.

Bij het maken van keuzen kan worden gedacht in twee richtingen: Ten eerste aan verschillende strategieën: preventie (vaccinatie) en therapeutische benadering (meeste overige benaderingen). Ten tweede kan gedacht worden aan sequentiële ontwikkelingen. Omdat van geen van de besproken benaderingen bij voorbaat vaststaat dat die een oplossing biedt over het geheel scala van pathogenen kan het verstandig zijn een in de tijd evoluerende benadering te kiezen. Starten met wat nu een haalbare uitdaging lijkt zoals geselecteerde vaccins, faagtherapie ondersteund door lysinen, natuurlijke bactericide peptiden en vervolgens insteken op nieuwe ontwikkelingen gebaseerd op blokkade van nader te identificeren vitale pathways zoals bijv. blokkade van faagresistentie en RNA-silencing.

- Endemische of bedrijfsgebonden ziekten zijn oorzaak van veel antibioticumgebruik. Belangrijke inspanningen zijn daarom vooral nodig in de vaccinontwikkeling tegen een geselecteerd spectrum van pathogenen. Voor varkens en kippen zijn luchtweg- en respectievelijk darmaandoeningen het meest prominent. Een gewogen prioriteitstelling is noodzakelijk. Nadeel van de vaccin benadering is dat voor ieder micro-organisme en subtype daarvan een nieuw vaccin dient ontwikkeld en geregistreerd. De vaccinbenadering lijkt een bekend traject maar elk nieuw vaccintarget vereist nieuwe innovatieve strategieën. Omdat bovendien de voor de hand liggende vaccinbenaderingen reeds zijn gevolgd ligt het voor de hand aan te nemen dat de ‘moeilijke’ zijn over gebleven. De inspanningen voor goede, veilige, breed werkende vaccins dienen dus niet onderschat. Zoals aangegeven lijkt het voor bepaalde zoönotische micro-organismen verstandig toch een vaccinontwikkeling te initiëren. Voor andere lijkt het meer voor de hand liggend om vaccins voor ‘humane’ toepassing

te ontwikkelen. Zolang regelgeving niet dwingend is zal investering in vaccins ter preventie van zoönosen van buiten de veterinaire sector moeten komen.

- Verwacht mag worden dat ‘whole genome’ benadering voor verschillende micro-organismen zal leiden tot het ontdekken van meer vitale pathways, waarvan de blokkering leidt tot een antibiotisch effect. De antibiotische middelen van de toekomst zullen zijn gebaseerd op kennis van moleculaire ‘pathways’, die met behulp van –omics-technieken (genomics, proteomics, metabolomics) ontrafeld kunnen worden. De interventie is gebaseerd op moleculaire structuren, die bepaalde activiteiten blokkeren of juist induceren. De verdere ontwikkeling ervan is nog maar pas begonnen. Noodzakelijke investering in deze technologie is een belangrijke strategische keuze.
- Toepassing van deze nieuwe alternatieve strategieën kan het gebruik en de behoefte aan bestaande typen antibiotica drastisch verminderen ook omdat die antibiotische therapieën in veel gevallen meer generiek werkzaam zijn dan vaccins of toe te passen op species niveau. Echter de ontwikkeling van deze nieuwe generatie van antibiotische middelen zal nog enige tijd vergen.
- Faag-resistentieblokkers zullen van de faagtherapie een zeer sterk alternatief voor antibiotica gaan maken. (Endo)lysinen vormen een aantrekkelijk alternatief. Maar voor Gram- bacteriën is deze strategie nog onvoldoend ontwikkeld.
- De ontwikkeling van de interferentie methoden voor RNA-silencing kan op basis van huidige kennis nog niet dierexperimenteel worden aangepakt. Ze zijn echter wel heel aantrekkelijk omdat ze een voor het pathogeen vitaal mechanisme ataqueren. Een investering in verdere “proof of principles” is lijkt in de naaste toekomst wel degelijk interessant. Inactivatie van transductie-complexen lijkt een directe benadering die van belang is omdat ze de verdere ontwikkeling van resistentie kan beperken en daarmee het gebruik van krachtige goedkope antibiotica kan verlengen. Het is een benadering die voornamelijk op een farmacologische aanpak berust en goede modellen voor primaire en high-throughput evaluatie dienen nog ontwikkeld te worden.
- Peptide antibiotica kunnen op verschillende wijzen worden ingezet. De nieuwe suicide-inductie is wel heel interessant omdat ze een vitaal mechanisme aanpakken en escape uit dit mechanisme mogelijk een non-pathogene variant ten gevolge heeft. Echter hier moet nog veel onderzoek gedaan worden alvorens duidelijk is welke de sleutelstructuren zijn die moeten worden aangepakt. Bacteriële antibiotische stoffen vergen nog veel aandacht alvorens specifieke toepassing tot stand zal komen. Het betreft een hele generatie van nieuwe structuren waarvan er enkele al bekend zijn. Hun experimentele evaluatie op toepassing, risico, veiligheid, resistentie en efficiëntie verdienen zeker aandacht.

- Of één van deze middelen de antibiotica zal vervangen is de vraag. Het ligt meer in de verwachting dat een repertoire van antibiotische strategieën zal worden ontwikkeld waarvan de afwisseling en strategische inzet het duurzaam therapeutisch gebruik moet verzekeren. Er zijn dus wel alternatieven voor antibiotica maar het vergt nog veel inventiviteit en strategisch inzicht om te komen tot de meest gewenste ontwikkelingen.

Realisatie

De belangrijkste positieve effecten van alternatieven voor antibioticagebruik zijn te verwachten in de humane sector. De dierhouderij vormt 'slechts' een route die multi-resistentie aanlevert. Revenuen voor het aanpakken van de problematiek komen echter niet bij de dierhouder terecht. Indien niet regelgeving en cultuur in de dierhouderij mede worden aangepast blijft het 'dweilen met de kraan open' (Bondt et al., 2008). Nodig is dus allereerst een bewustwordingsproces t.a.v. deze problematiek, dat draagvlak creëert voor verandering in attitude. Een gestructureerde aanpak dient plaats te vinden op basis van 'benchmarking', intensieve begeleiding en vorming. Voor een economische analyse van deze problematiek is een separate studie noodzakelijk gebaseerd op een inhoudelijke en technische strategie die uitgewerkt is voor bestaande en nieuwe alternatieven voor antibiotica.

De noodzakelijke veranderingen in de dierhouderij die hiervoor nodig zijn kunnen alleen tot stand komen indien alle betrokkenen de handen ineen slaan zowel voor het ontwikkelen van een geïntegreerde strategie als voor financiering. De vorming van een consortium dat zich tot taak rekent de realisatie van een duurzame dierhouderij tot stand te brengen waarin de problematiek die samenhangt met antibiotica gebruik wordt opgelost kan een eerste stap zijn op deze weg. Samenwerking is nodig tussen Overheid, Productschappen, Universiteiten en Onderzoeksinstituten, samen met het biotechnologie georiënteerde bedrijfsleven. Financiering zou deels kunnen komen uit een overheidsbijdrage, zodat het agrarische bedrijfsleven meegaat met de innovatieve Nederlandse biotechnologie in de onvermijdelijke ontwikkelingen die er op dit terrein aankomen.

Afkortingen

Cp1-1	Lysine van faag CP-1
LBH	Landbouwhuisdieren
MRSA	Methicilline Resistente Staphylococcus Aureus
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PCD	Programmed cell death
TLR	Toll like receptor (receptor voor non-self signalen)

Referenties

Ackermann, Martin, Barbel Stecher, Nikki E. Freed, Pascal Songhet, Wolf-Dietrich Hardt & Michael Doebeli, Self-destructive cooperation mediated by phenotypic noise. *Nature* 2008, 454:987-90

Bondt N, Bokma-Bakker, Bergevoet RHM, Centrale registratie diergeneesmiddelengebruik, Rapport LEI 2008-031 ten behoeve van LNV, 2008.

Borysowski J, Weber-Dabrowska B, Górski A. Bacteriophage endolysins as a novel class of antibacterial agents. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2006 ;231(4):366-77.

Brouns et al., Small CRISPR's RNA's Guide antiviral defense in prokaryotes, *Science* 321, 5891, 960-964.

De Diego et al., Sensing, presenting, and regulating PAMP's. *Schering Found Symp Proc*. 2007; (3):83-95.

Engelberg-Kulka H, Amitai S, Kolodkin-Gal I, Hazan R (2006) Bacterial Programmed Cell Death and Multicellular Behavior in Bacteria. *PLoS Genet* 2(10): e135. doi:10.1371/journal.pgen.0020135

Fischetti VA. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *Trends Microbiol*. 2005; 13(10):491-6

Grandgirard D, Loeffler JM, Fischetti VA, Leib SL. Phage lytic enzyme Cpl-1 for antibacterial therapy in experimental pneumococcal meningitis. *J Infect Dis*. 2008 Jun 1;197(11):1519-22

Hancock REW & Chapple DS, Peptide antibiotics *Anitmicrob. agents & Chemother*. 1999 43: 1317-23

Jado I, López R, García E, Fenoll A, Casal J, García P; Spanish Pneumococcal Infection Study Network. Phage lytic enzymes as therapy for antibiotic-resistant *Streptococcus pneumoniae* infection in a murine sepsis model. *J Antimicrob Chemother*. 2003, 52(6):967-73

Janssens S & Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*. 2003 16(4):637-46.

Kondejweski LH, Farmer SW, Wishart DS, Kay CM, Hancock REW, Hodges RS Effect of ring size of grammicidin S analogs on structure, antibacterial and hemolytic activity. *J. Biol. Chem* 271: 2561-68.

Linde A., C.R. Ross, E.G. Davis, L. Dib, F. Blecha, and T. Melgarejo, Innate Immunity and Host Defense Peptides in Veterinary Medicine. *J Vet Intern Med.* 2008, 22(2):247-65.

Loher S, Schneider OD, Maienfisch T, Borkony S, Stark WJ. Micro-organism-Triggered Release of Silver Nanoparticles from Biodegradable Oxide Carriers Allows Preparation of Self-Sterilizing Polymer Surfaces. *Small*, 2008; 4 (6), 824-832 DOI: 10.1002/sml.200800047

López R, García E, García P, García JL. The pneumococcal cell wall degrading enzymes: a modular design to create new lysins? *Microb Drug Resist.* 1997 3(2):199-211

Matz C, Webb JS, Schupp PJ, Phang SY, Penesyan A, et al. (2008) Marine Biofilm Bacteria Evade Eukaryotic Predation by Targeted Chemical Defense. *PLoS ONE* 3(7): e2744.

Navarro L et al., 2008 Suppression of the microRNA pathway by bacterial effector proteins, *Science.* 2008 321(5891):964-7

1st Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment, Geneva, 2003

2nd Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Management options, Oslo, 2004

Report Joint FAO/OIE/WHO Expert consultation on Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance, Seoul, Republic of Korea 2006.

Report Joint FAO/OIE/WHO Expert consultation on Antimicrobial use in aquaculture and antimicrobial resistance, Annex 5: Guidelines for responsible and prudent use of antimicrobial agents in veterinary medicine, Seoul, Republic of Korea 2006.

Schneider A, Stachelhaus T, Mahariel MA Targetted alteration of the substrate specificity of peptide synthetases by rational module swapping *Mol. Gen. Geneti.* 257: 460-64

Scheurwater E, Reid CW, Clarke AJ. Lytic transglycosylases: bacterial space-making autolysins. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008;40(4):586-91

Young RF *Molecular biology: Secret Weapon*, *Science* 321 5891 922-923

Consultaties

Dr. Jan Dirk van der Klis, De Schothorst, Lelystad (070808)

Dr. Marcel van Bergen, ASG Centraal Veterinair Instituut (CVI)

Prof dr. Peter Groot-Koerkamp, ASG Veehouderij Lelystad

Dr. Kitty Maassen, ASG Centraal Veterinair Instituut (CVI)

Prof. Dr. Dik Mevius, ASG Centraal Veterinair Instituut (CVI)

Dr. Jan ten Napel, ASG Veehouderij Lelystad.

Drs. Vincent Rijsman, ASG Centraal Veterinair Instituut (CVI)

Prof. Dr. Mari Smits, ASG Veehouderij Lelystad

Prof. Dr. Jaap Wagenaar, Faculteit der Diergeneeskunde Universiteit Utrecht
& ASG Centraal Veterinair Instituut (CVI).

De auteurs

Eric Claassen^{1,2,3} en Markwin P. Velders⁴

1. Zelfstandig ondernemer,
2. Immunoloog, Hoogleraar “Kennisvalorisatie in de life sciences” Erasmus Medisch Centrum Rotterdam,
3. Hoogleraar Businessmanagement & Entrepreneurship Athena Instituut VU Amsterdam,
4. Manager Operations, Biosciences TNO

Frank Schuren, Jos van der Vossen, Roy Montijn en Niek Snoeij
Microbiële Genomics groep, TNO Kwaliteit van Leven, Zeist

Ruud.P.A.M. Segers
Microbiological R&D, Intervet/Schering-Plough Animal Health, Boxmeer,
The Netherlands

Mario Vaneechoutte¹, Maya Merabishvili², Gilbert Verbeken³, Daniel De Vos³,
Jean-Paul Pirnay³

1. Laboratory of Bacteriology Research, Ghent University Hospital, University of Ghent, Ghent, Belgium
2. Eliava Institute of Bacteriophage, Microbiology and Virology, Tbilisi, Georgia
3. Laboratory for Molecular and Cellular Technology, Burn Unit, Hospital Centre of the Base – Queen Astrid, Brussels, Belgium

Johanna Fink-Gremmels
Universiteit Utrecht, Faculteit Diergeneeskunde, Div. Veterinaire Farmacologie, Farmacie en Toxicologie

Aalt Bast
Vakgroep Farmacologie en Toxicologie, Faculty of Health, Medicine and Life Sciences, Universiteit Maastricht

Huub F.J. Savelkoul
Celbiologie en Immunologie Wageningen Universiteit

Wim J.A. Boersma
Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR, Lelystad

Colofon

© 2009 Directie Kennis & Innovatie, Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

Rapport DKI nr. 2009/dk115

Teksten mogen alleen worden overgenomen met bronvermelding.

Deze uitgave kan schriftelijk of per e-mail worden besteld bij de directie Kennis onder vermelding van code 2009/dk115 en het aantal exemplaren.

Oplage 400 exemplaren

Samenstelling Tonnie Greutink, Janny Beumer, Albert Meijering

Opmaak en druk Den Haag media groep

Projectbegeleiding Dienst Bedrijfsvoering i.o. bedrijfsuitgeverij ministerie van LNV