

<b>Algemene gegevens</b>	
PPS-nummer	AF15225
Titel	FightFlu
Topsector en innovatiethema	Agri&Food
Projectleider (onderzoek)	Nancy Beerens
PPS-coördinator (namens private partij)	Erik de Jonge/Marloes Busscher
Contactpersoon overheid	Marc de Bode
Status (lopend of afgerond)	Lopend
Type onderzoek (F, T of V)	F/T
Werkelijke startdatum	1-10-2016
Werkelijke einddatum	31-12-2020
Organisatie- / bestuursstructuur	Er is een consortium opgericht waarin partijen deelnemen die allen een link hebben met vogelgriep onderzoek of vogelgriep problematiek in de praktijk. Ook de overheid en het bedrijfsleven maken deel uit van het consortium. WBVR zal de projectleider leveren. Er zijn deelnemende partijen en adviserende partijen. Onder de deelnemende partijen worden die partijen verstaan die een deel van het werk zullen uitvoeren. Onder de adviserende partijen worden de partijen verstaan die advies kunnen geven op go/no go momenten en op die momenten dat er nog verdere invulling van deelprojecten nodig. Er is een AIO aangesteld, die de verbindende factor zal zijn tussen alle partijen die werkzaamheden binnen deze PPS uitvoeren. Ook zal wetenschappelijke output beter geborgd zijn als het project onderdeel is van een PhD traject.
Begeleidingsstructuur (klankbordcie., etc.)	Het consortium zal elk half jaar bij elkaar komen. Resultaten zullen dan gerapporteerd worden aan alle leden van het consortium. De leden zien op deze manier toe op de voortgang en kwaliteit. Na afronding van project 1 zal het consortium bijeenkomen om te besluiten over het gebruik van de proxy in de projecten 4 en 5. Als er een GO wordt gegeven voor het gebruik van de proxy zal deze worden gebruikt in de projecten 4 en 5. Als er geen goede proxy beschikbaar komt in project 1 zullen de projecten 4 en 5 m.b.v. klassieke data (verzameling) worden ingevuld. O.b.v. het advies van alle leden van het consortium zullen de financiers (bedrijfsleven en de overheid) een keus maken voor de deelprojecten onder project 5.
Korte omschrijving inhoud (max. 4 regels)	Wilde-vogels zijn het reservoir van vogelgriep in de natuur. In dit project willen we meer inzicht krijgen op de interactie tussen pluimvee en wilde vogels, om besmetting van pluimvee bedrijven in de toekomst te voorkomen.

<b>Planning en voortgang (indien er wijzigingen zijn t.o.v. het projectplan svp toelichten)</b>	
Loopt de PPS volgens planning?	Nee, het project heeft vertraging opgelopen. De private partner in dit project is AVINED. De AVV voor de pluimveesector heeft lang op zich laten wachten. Daardoor is een deel van de projecten veel later gestart. AVINED heeft toegezegd de private bijdrage te voldoen over 2019/2020, en met terugwerkende kracht over 2018.

Zijn er wijzigingen in het consortium/de projectpartners?	Nee
Is er sprake van vertraging en/of uitgestelde opleverdatum?	Ja. De PPS is met vertraging van start gaan in oktober 2016. Ook heeft het project vertraging opgelopen doordat tweemaal een ophokplicht voor uitloop kippen werd ingesteld in verband met vogelgriep, in 2016/2017 en 2017/2018. Verdere vertraging is opgelopen door ziekte van de AIO (2018) die werkzaam is op dit project.

**Highlights: geef een korte beschrijving van de belangrijkste resultaten** (deze beschrijving wordt als publieke samenvatting op de websites van de TKI's/topsectoren geplaatst)

Wilde-vogels zijn het reservoir van vogelgriep in de natuur. In dit project willen we meer inzicht krijgen in de interactie tussen pluimvee en wilde vogels, om besmetting van pluimveebedrijven in de toekomst te voorkomen. Omdat vogelgriep slechts een aantal bedrijven per jaar treft, is deze ziekte lastig te onderzoeken. In **project 1** werd onderzocht of het mogelijk is om de overdracht van darmbacteriën van wilde vogels naar pluimvee te gebruiken als maat voor dit contact. Helaas bleek darmfora geen bruikbare informatie te geven over contact tussen pluimvee en wilde vogels. Dit onderzoek is inmiddels afgerond, en er werd een eindrapportage geschreven (bijlage 1). Dit project heeft geresulteerd in een wetenschappelijke publicatie, en momenteel wordt gewerkt aan 2 opvolgende publicaties.

In **project 2** werden wilde vogels bemonsterd om de aanwezigheid van vogelgriep virussen in de populatie te bestuderen. Van 1 februari 2019 tot en met 31 augustus werden (niet-real time) 3733 wilde vogels getest op vogelgriep, waarvan er 360 positief waren. 14 eenden bleken positief voor H5 virus, maar er werd geen HPAI virus gevonden. In respons op de HPAI detecties in Oost-Europese landen aan het einde van 2019 zijn wij weer overgegaan op real-time screening. Tussen 1 september 2019 en 15 januari 2020 zijn 2672 wilde vogels getest, van 17 verschillende soorten, maar merendeels wilde eenden. Er werden 618 vogels positief getest, van 8 verschillende vogelsoorten. Er werden 33 eenden H5 positief getest, dit bleken laag pathogene varianten van het virus. Daarnaast werd binnen dit project ervaring opgedaan met GPS-tracking van wilde vogels. Het toepassen van GPS tracking geeft meer inzicht in de migratie van vogels. Eerst wordt ervaring opgedaan met het zenderen van kokmeeuwen, waarvan de resultaten gebruikt worden voor een modelleringsstudie. Vervolgens zullen buizerds worden gezenderd. Tijdens de recente HPAI uitbraken hebben we gezien dat buizerds gevoelig zijn voor HPAI virussen, waarbij veel sterfte optrad. Of buizerds ook in sommige gevallen een infectie kunnen overleven is niet bekend; daarvoor is retrospectief serologisch onderzoek nodig. Over hun migratiegedrag in Nederland is ook weinig bekend. Door buizerd te vangen en bloed af te nemen voor serologisch onderzoek en vervolgens te voorzien van een GPS zender kunnen we belangrijke informatie verzamelen. Mogelijk kunnen buizerds en andere roofvogels in de toekomst fungeren voor de vroege signalering van HPAI virussen in wilde vogels. De GPS-tracking van buizerds zal van start gaan bij voldoende resterend budget n 2020.

In **project 3** werd gestart met de Netwerkanalyses, waarin het contact tussen wilde vogels en pluimvee beschreven wordt, en het risico voor introductie van AI ingeschat kan worden. Uitbraken van ongeveer 22 hoog-pathogene aviaire influenza (HPAI) gevallen zouden geassocieerd kunnen zijn met de nabijheid of aanwezigheid van bepaalde wilde vogelsoorten. Daarbij spelen meerdere factoren een rol, zoals de aanwezigheid van een vogelsoort die het virus meeneemt tijdens de migratie (een zogenaamde risicosoort) en/of een lokale soort die niet migreert, maar die wel het virus kan overbrengen, en de aanwezigheid van een geschikte habitat rondom een bedrijf voor dergelijke vogelsoorten. We hebben de afgelopen maanden een selectie gemaakt van de mogelijke risico-variabelen, en met Sovon hebben we nu toegang tot de tel- en verspreidingsgegevens van deze risico-vogelsoorten. De analyse is gebaseerd op het vergelijken van de ruimtelijke situatie (habitat en vogelsoorten) rondom de pluimveebedrijven waar een uitbraak is geweest met controle pluimveebedrijven zonder uitbraken. De methode van de selectie van deze controlebedrijven moet secuur en weloverwogen gebeuren, waarbij we controle bedrijven selecteren op in ieder geval gelijk bedrijfstype en daarnaast binnen een bepaalde minimale en maximale afstand. Door het beperkte aantal uitbraken, maar wel heel veel mogelijke verklarende variabelen (vogelsoorten en habitatvariabelen), is het uitvoeren van een goede statistische analyse moeilijk. We hebben ervoor gekozen om deze potentiële verklarende variabelen mee te nemen in een statistische analyse (een Random Forest) die in staat is om de belangrijkste variabelen die gekoppeld zijn aan de kans op HPAI uitbraak, aan te wijzen. Voor het uitvoeren van deze analyses is het van essentieel belang dat we goede representatieve controle bedrijven selecteren. We zijn nu druk bezig met dit proces. Echter laten de eerste (zeer voorlopige) resultaten al zeer interessante patronen zien: verschillende eendachtigen en

meeuwachtigen komen uit deze analyse als mogelijke risicosoorten naar boven. Na het uitvoeren van deze analyse, zullen we deze informatie gebruiken om een voorlopige risk map voor HPAI uitbraken gegeven de belangrijkste wilde vogelsoorten van Nederland te maken. De analyse wordt momenteel aangepast, en de eerste resultaten worden de komende maanden verwacht. Deze analyse kan op lange termijn misschien aangevuld worden met temporele data zodat er een voorspelling kan worden gedaan per seizoen of maand.

Vanwege het relatief lage aantal HPAI-uitbraken in Nederland die voor deze analyse kunnen worden gebruikt, wordt een vergelijkbare analyse ook uitgevoerd met gebruik van de laag-pathogene aviaire influenza (LPAI)-uitbraken in Nederland. De LPAI-analyse wordt uitgevoerd binnen het LNV-Beleidsondersteunend project BO-43-013.04-011. De roadmap AI is specifiek gericht op HPAI. In Nederland kunnen wij voor LPAI introducties putten uit enkele honderden uitbraken, waardoor de bovengeschetste problemen met de statistische analyse bij HPAI-uitbraken, geen rol spelen bij de LPAI-analyse. Het is in zijn algemeenheid de vraag of er aan introducties van HPAI- en LPAI virus op pluimveebedrijven verschillende mechanismen ten grondslag liggen, beiden hebben namelijk hun oorsprong in contaminatie van de omgeving van pluimveebedrijven door wilde watervogels. Het is aannemelijk dat er gemeenschappelijke factoren kunnen spelen bij de introductie van HPAI en LPAI, maar wellicht (en dat weten we alleen als we dat uitzoeken) ook factoren die specifiek alleen voor HPAI of LPAI gelden; beide opties zijn voor preventie van AI beleidsrelevant. Via dit onderzoek krijgen wij daar antwoord op. Er is een hechte samenwerking tussen de betrokken onderzoekers voor zowel de HPAI als de LPAI analyse. Er is een voordeel bij de HPAI analyse die de LPAI analyse niet heeft, en dat is namelijk de tijdcomponent. Beide analyses kunnen een ruimte (gebied/regio) component analyseren, maar met name de HPAI analyse kan iets met een tijd/seizoen component doen omdat de tijd van introductie vrij scherp bekend is. Door de aard van de LPAI data, bij veel van bedrijven wordt slechts 1x per jaar verzameld, voor kalkoenbedrijven elke productieronde en voor uitloopbedrijven 1x per kwartaal, is het niet goed mogelijk om een goede schatting te hebben van de tijd van introductie (behalve voor de uitloopbedrijven). Dat betekent dat het moeilijker is om een relatie te maken met bijvoorbeeld de tijd dat migrerende wilde watervogels aankomen in Nederland en weer vertrekken; dit kan echter wel voor de uitloopbedrijven worden gerealiseerd. Net als bij de HPAI-analyse zijn de afgelopen maanden de verschillende gegevens bij elkaar gehaald en zijn de eerste statistische analyses uitgevoerd. De eerste resultaten worden in de komende maanden verwacht. De modellen zullen uiteindelijk worden aangevuld met nieuwe gegevens verkregen uit project 2 en 4.

In **project 4** wordt onderzoek gedaan naar de transmissie van vogelgriep van wilde vogels naar pluimvee via de omgeving. Direct contact tussen wilde vogels en pluimvee speelt waarschijnlijk geen grote rol bij de transmissie van het virus. Het virus wordt overgedragen via de feces van een geïnfecteerde wilde vogel op erf of uitloop. Tijdens de HPAI epidemieën in 2014, 2016 en 2017 werd het virus steeds in smienten aangetoond. Er wordt gedacht dat smienten mogelijk de "carriers" van het virus zijn, die het virus met zich meedragen zonder er zelf (erg) ziek van te worden. Smienten trekken in de herfst vanuit broedgebieden in Rusland naar Nederland om te overwinteren. De winterpopulatie van smienten in Nederland is erg groot, rond de 900.000 vogels, terwijl er in de zomer maar enkele broedparen aanwezig zijn. Smienten leven in meren, maar komen ook aan land om te grazen en worden daarom ook vaak gezien in de landbouwgebieden rond pluimveebedrijven. In 2019 werd binnen een WOT-O onderzoeksproject binnen WBVR een dierproef uitgevoerd waarbij smienten werden besmet met HPAI H5N8 virus uit 2016. Er werden slechts weinig ziekte symptomen gezien, maar de uitscheiding van virus bleef gedurende 10 dagen aanwezig. Uit de stal met de besmette smienten werden bedding en zwemwater verzameld. Dit werd aangeboden als bedding of drinkwater aan 10 kippen, die individueel in hokjes gehuisvest waren. Geen van de kippen werd besmet door bedding, maar 6 van de 10 kippen raakten besmet door het water. Het virus in water bleef zeer lang infectieus, voor meer dan 6 dagen. Terwijl het virus in bedding al na enkele uren niet infectieus meer was. Dit laat zien met name besmette feces in water/in een vochtige omgeving zeer infectieus is voor kippen. In 2020 wordt dit project afgerond met nauwkeurige bepalingen van de virus hoeveelheid in het water in de tijd, en wordt de reproductie ratio (R0) berekend. Deze waarden kunnen dan vervolgens in infectiemodellen worden geïmplementeerd.

In **project 5** worden methoden onderzocht om wilde vogels uit de uitloop te weren. Eind december 2019 is een laser geïnstalleerd bij een pluimveebedrijf dat meerdere malen werd getroffen door LPAI introducties. De uitloop van dit bedrijf wordt 24 uur per dag gemonitord door videocamera's. Er wordt onderzocht of de laser effect heeft op aantal bezoeken van wilde (water)vogels en bezoektijd aan uitloop. Daarvoor worden periodes met en zonder gebruik van laser met elkaar vergeleken, en wordt ook mogelijke gewenning van de vogels aan de laser onderzocht in 2020. Op dit moment worden de verdere onderzoeksplannen binnen dit project ingevuld in overleg met de sector. Hiervoor is een onderzoeksplan opgesteld (zie bijlage 2).

**Maatschappelijke toepassing: geef een korte beschrijving van de maatschappelijke bruikbaarheid/opbrengst**

Deze studie zal meer inzicht geven in de contactnetwerken tussen wilde vogels en pluimvee. Meer inzicht in het verloop van het contact tussen wilde vogels en pluimvee, en de mogelijke overdracht van vogelgriep tijdens deze contacten, zal leiden tot betere preventie maatregelen.

**Knelpunten: geef een korte beschrijving van de eventuele inhoudelijke knelpunten**

De private partner in dit project is AVINED. Helaas is de toekenning van de AVV voor de pluimveesector pas in april 2018 rond gekomen. Per 1 januari 2019 is de bijdrage van de bedrijven toegezegd voor de resterende periode. Maar hierdoor is een deel van projecten beschreven in het werkplan nog niet van start gaan.

Daarnaast heeft project 1 geen proxy opgeleverd, en kan deze niet gebruikt worden om de interactie tussen pluimvee en wilde vogels te kwantificeren in project 3, 4 en 5. Gezien deze situatie, is er reden om het projectplan voor de resterende periode aan te passen. Hiervoor is een aangepast projectvoorstel ingediend.

**Aantal opgeleverde producten in 2019 (geef in een bijlage de titels en/of omschrijving van de producten of een link naar de producten op openbare websites)**

Wetenschappelijke artikelen (*)	Rapporten	Artikelen in vakbladen	Inleidingen/workshops/invited lectures	Aangevraagde octrooien /first filings	Spin-offs (**)
1. Limited changes in the fecal microbiome composition of laying hens after oral inoculation with wild duck feces. Schreuder J et al. 2019. Poultry Sci. Sep 20. pii: pez526. doi: 10.3382/ps/pez526					

Verwacht u het komende jaar een octrooiaanvraag?

NEE

**Bijlage 1**

**EINDRAPPORT  
'FIGHT FLU'  
– PROJECT 1: 2017-2019 -**

*Project 1: Vaststellen van een proxy voor de interactie  
pluimvee-wilde vogels*

**Francisca Velkers en Janneke Schreuder  
11-12-2019**

## **Inhoudsopgave**

<i>Algemene gegevens project</i> .....	7
<i>Betrokken personen voor project 1 en affiliaties</i> .....	7
<i>Hypothese en aanpak</i> .....	8
<i>Veldstudies bij leghennen met en zonder uitloop</i> .....	8
<i>Nadere analyses voor PhD project</i> .....	8
<i>Resultaten en conclusies veldstudies</i> .....	9
<i>Dierexperimenten bij GD</i> .....	9
<i>Resultaten dierexperiment</i> .....	9
<i>Conclusies dierexperiment</i> .....	9
<i>Wat kunnen we met de resultaten tot nu toe?</i> .....	10
<i>Overzicht wetenschappelijke publicaties en bijeenkomsten</i> .....	10
<i>Praktische kennis van toepassing voor de sector</i> .....	10
<i>Bijlage. 1. Opzet van cross-sectionele studie</i> .....	12
<i>Bijlage 2. Opzet van longitudinale studie</i> .....	12

## Algemene gegevens project

<b>PPS-nummer</b>	AF15225
<b>Titel</b>	FightFlu
<b>Topsector en innovatiethema</b>	Agri&Food
<b>Projectleider (onderzoek)</b>	Nancy Beerens
<b>PPS-coördinator (namens private partij)</b>	Erik de Jonge, Sanne van Zanen
<b>Contactpersoon overheid</b>	Marc de Bode
<b>Korte omschrijving inhoud</b>	Wilde-vogels zijn het reservoir van vogelgriep in de natuur. In dit project willen we meer inzicht krijgen op de interactie tussen pluimvee en wilde vogels, om besmetting van pluimvee bedrijven in de toekomst te voorkomen.
<b>Omschrijving deelproject 1</b>	In project 1 is onderzocht of het mogelijk is om een proxy te bepalen voor de interactie met wilde vogels. De hypothese was dat darmbacteriën vanuit wilde vogels kunnen worden overgedragen op kippen. Indien deze specifieke bacteriën dan worden aangetroffen bij kippen, dan zou dit betekenen dat er contact is geweest met wilde vogels. Hiervoor zijn zowel veldstudies als dierexperimenten uitgevoerd.
<b>Looptijd</b>	1-10-2016/1-12-2019

## Betrokken personen voor project 1 en affiliaties

Faculteit Diergeneeskunde, Departement Landbouwhuisdieren, Universiteit Utrecht, Utrecht (UU)	Janneke Schreuder (PhD kandidaat); dr. Francisca Velkers en prof. dr. Arjan Stegeman
Wageningen Bioveterinary Research (WBVR)	dr. Nancy Beerens (projectleider), dr. Alex Bossers (sequencing), dr. Armin Elbers (co-auteur)
GD Deventer (GD)	dr. Ruth Bouwstra, dr. Anneke Feberwee, Wilko Vije en anderen (hulp bij uitvoering veldstudie en dierproef)
German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv), Halle-Jena-Leipzig, Germany	dr. Stephanie Jurburg (hulp bij analyses microbiota en co-auteur microbiota-papers)
Overige adviserende betrokkenen vanuit het consortium:	
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Wageningen Universiteit, Resource Ecology Group, Wageningen University &amp; Research, Wageningen: Fred de Boer, Pim van de Hooft</li> </ul>	

## Hypothese en aanpak

Wilde vogels zijn het reservoir van vogelgriep in de natuur. Uit eerder onderzoek is gebleken dat uitloopbedrijven een groter risico hebben op introductie met een LPAI virus dan bedrijven waar de legkippen binnen worden gehouden. Een verklaring hiervoor is dat pluimvee met vrije uitloop meer in contact komt met (uitwerpselen van) wilde vogels. Met vogelgriep besmette watervogels scheiden hoge concentraties van het virus uit in de uitwerpselen (feces). Vervolgens kunnen de leghennen besmet raken door het oppikken van feces of met feces besmet water in de uitlopen. Bij het opnemen van de feces van de watervogels worden mogelijk ook darmbacteriën overgedragen. De aanwezigheid van specifieke darmbacteriën afkomstig van watervogels zou dus een proxy kunnen zijn voor de mate van contact tussen de kippen en de watervogels. Een dergelijke proxy zou een erg nuttig hulpmiddel kunnen zijn bij het inschatten van mogelijke risico's voor bedrijven en zou gebruikt kunnen worden om te meten of bepaalde maatregelen, b.v. ter verbetering van de bioveiligheid, deze risico's zouden kunnen beperken.

Om dit nader te onderzoeken zijn zowel een cross-sectionele (eenmalig bezoek) als een longitudinale (meerdere bezoeken aan dezelfde bedrijven) veldstudie uitgevoerd bij leghennenbedrijven met en zonder uitloop om te onderzoeken of en welke verschillen te vinden waren in de samenstelling van darmbacteriën (verderop ook wel darmmicrobiota of microbiom genoemd) tussen leghennen met en zonder uitloop.

Tevens is bij GD in Deventer onder gecontroleerde omstandigheden getest of het oraal ingeven van eendenmest kan leiden tot veranderingen in de darmmicrobiota van leghennen in een pilotexperiment en volledig dierexperiment.

## Veldstudies bij leghennen met en zonder uitloop

In 2016 en 2017 zijn cloacaswabs, mestmonsters en overschoentjes verzameld van leghennenbedrijven met en zonder uitloop (zie tabel). Door vogelgriepuitbraken in 2016 en de fipronilcrisis in 2017 vielen veel bezoeken uit en werden koppel vroegtijdig afgevoerd, wat tot enige vertraging heeft geleid in het project.

Jaar	Studie	Koppels	Uitloop	Scharrel-binnen	Bezoeken
2016	Cross-sectioneel	2	1	1	1
2017	Longitudinaal <sup>1</sup>	4 <sup>A</sup>	2	2	3
	Cross-sectioneel	8 <sup>B</sup>	4	4	1
Totaal		14	7	7	22

Binnen het Fight Flu budget is een deel van de cloacaswabs van 2 koppels uit de cross-sectionele studie in 2016 geanalyseerd bij WBVR. Hoewel verschillen werden aangetoond in darmmicrobiom tussen het bedrijf met en zonder uitloop, was het nog niet mogelijk om te concluderen of deze door de uitloop of andere factoren werden verklaard. Mede vanwege deze uitkomsten, en voorlopige uitkomsten van het dierexperiment, waarbij geen overtuigend bewijs werd gevonden voor overdracht van microbiota van eendenmest naar hennen, werd bij het bereiken van het go-no go moment voor het voortzetten van project 1 besloten de andere monsters niet verder te laten analyseren van het budget van Fight Flu.

### **Nadere analyses voor PhD project door UU**

Ondanks de no-go beslissing is met eigen budget (circa €10.5k) van UU de data van meer bedrijven geanalyseerd. Dit werd nodig geacht om met voldoende data vast te stellen a) of bepaalde specifieke verschillen in het microbiom gerelateerd waren aan (indirect) contact met mest van wilde vogels en aangrijpingspunten zouden kunnen bieden voor nader onderzoek naar een proxy; en b) om een wetenschappelijk gefundeerde uitspraak te doen of het überhaupt mogelijk was om een verschil in microbiom vast te stellen tussen binnen- en buitengehouden kippen. Voor de cross-sectionele studie zijn hiertoe cloacaswabs van 10 hennen per koppel ( $n = 80$ ) en van de longitudinale studie van 10 hennen per koppel van 3 tijdstipmomenten ( $n = 110$ ) ingestuurd voor sequencing waarna de data is geanalyseerd door Janneke Schreuder en Stephanie Jurburg.



## **Resultaten en conclusies veldstudies**

De variatie in samenstelling van de darmmicrobiota (bepaald aan de hand van sequencing van het V3-V4-gebied van het 16S rRNA-gen) van volwassen leghennen onder veldomstandigheden werd voornamelijk bepaald door de pluimveestal, het leghennenbedrijf en het opfokbedrijf, en slechts in zeer beperkte mate door toegang tot uitloop. Wel werd een specifieke bodembacterie, *Dietzia maris*, alleen gevonden in kippen met een uitloop. De data van de longitudinale studie wordt momenteel nog geanalyseerd en zal nader inzicht geven in de variatie in samenstelling over de tijd.

Op basis van de voorlopige uitkomsten lijkt het meten van verschillen in fecale microbiota van leghennen als proxy voor blootstelling aan (potentiële pathogenen) in mest van wilde vogels vooralsnog van weinig praktisch nut.

## **Dierexperimenten bij GD**

Na een verkennende pilot is een experiment uitgevoerd met 3 groepen hennen in de pluimveefaciliteiten van de GD Deventer: de leghennen werden oraal geïnoculeerd met mest van wilde eenden (eenden inoculum), met hun eigen mest (auto inoculum), of kregen geen behandeling (negatieve controlegroep). Er is gekozen voor wilde eendenmest, omdat er uit videocamera monitoring gebleken is dat deze de uitloop van een leghennenbedrijf in Nederland het meest bezoeken. Wilde eendenmest is verzameld tijdens de standaard surveillance van vogelgriep (door Erasmus MC) onder wilde eenden bij een eendenkooi.

Elke groep bestond uit 18 Bovans Brown leghennen van 31 weken oud. De leghennen werden op dag 0 van proef geïnoculeerd, waarbij er twee cloacaswabs per dag verzameld zijn gedurende 13 dagen. Aan het einde van de proef zijn alle leghennen geëuthanaseerd. Voor de analyse van het darmmicrobioom (ecosysteem van darmbacteriën) is het DNA van de mest op de cloacaswabs van 7 leghennen per experimentele groep gebruikt. Dit is gedaan op swabs van dag 0 (voor het vaststellen van de beginsituatie), dag 2 en dag 7 na de start van het experiment. Vervolgens is er '16s amplicon sequencing' uitgevoerd door de WBVR, om de samenstelling van het darmmicrobioom te kunnen analyseren. Voor de evaluatie van de bacteriesamenstelling is gekeken naar verschillen in bacteriële diversiteit. Daarnaast is er specifiek gekeken naar veranderingen in de relatieve aanwezigheid van individuele typen bacteriën.

## **Resultaten dierexperiment**

Er was geen aantoonbaar verschil tussen de experimentele groepen in bacteriële diversiteit. Ook was er geen verschil tussen experimentele groepen in de samenstelling van het darmmicrobioom op dag 2 of 7. Op het niveau van individuele typen bacteriën (op het niveau van het bacteriegeslacht, 'genus') was het genus *Alistipes* significant meer aanwezig in de met eendenmest geïnoculeerde en de met kippenmest geïnoculeerde groepen op dag 2 in vergelijking met de negatieve controlegroep. Echter was op dag 7 de aanwezigheid van *Alistipes* ook in de negatieve controlegroep gestegen en was er geen significant verschil meer op dag 7.

## **Conclusies dierexperiment**

Dit experiment heeft laten zien dat het eenmalig inoculeren van volwassen leghennen met wilde eendenmest geen meetbaar effect had op de samenstelling van het darmmicrobioom. De tijdelijke stijging van *Alistipes* in de experimentele groepen kon niet exclusief worden toegeschreven aan het inoculeren met eendenmest. Mogelijk kwam dit effect door de inoculatieprocedure zelf of was deze fluctuatie onderdeel van normale schommelingen in het darmmicrobioom van de leghen. Deze uitkomsten suggereren dat het darmmicrobioom geen goede proxy is voor het vaststellen van een eenmalige orale blootstelling aan feces van wilde eenden.

## **Wat heeft het project opgeleverd?**

### ***Praktische kennis van toepassing voor de sector***

We hadden gehoopt dat we de aanwezigheid van specifieke darmbacteriën afkomstig van watervogels in mest van leghennen als hulpmiddel zouden kunnen gebruiken voor het inschatten van mogelijke risico's voor bedrijven en als maat om de effectiviteit van maatregelen, b.v. ter verbetering van de bioveiligheid, te toetsen.

Helaas hebben we vastgesteld dat deze methode daarvoor niet geschikt is. Echter, het publiceren en presenteren van de uitkomsten, zowel met de sector, als met onderzoekers wereldwijd is van groot belang. Het is immers goed om te laten weten dat we helaas niet een proxy voor contact met wilde vogels hebben gevonden:

- om te voorkomen dat anderen hetzelfde werk zouden gaan herhalen en hiervoor onnodig dieren en middelen gebruiken;
- zodat dit anderen kan stimuleren tot het nader ontwikkelen van beter bruikbare middelen en methodes die hetzelfde doel kunnen dienen.

De opgedane kennis is bijvoorbeeld reeds ingezet om een alternatief plan te bedenken en hieruit is een nieuw onderzoeksvoorstel voortgekomen, namelijk 'Risico Vogelgriep: relatieve rol van insleeproutes en bioveiligheid op pluimveebedrijf'. Dit voorstel is gehonoreerd voor een publiek-private samenwerking bij de topsectoren A&F en T&U (Projectnummer: LWV19081) en zal in 2020 starten onder leiding van Armin Elbers (WBVR) waarbij leden van het Fight Flu consortium van UU, GD en Sovon zullen samenwerken met Pluimned, Ovoned en Avined. In dit project wordt met verklikkerstoffen bekeken waar zwakke plekken in de biosecurity op bedrijven te vinden zijn, en wordt nader onderzoek gedaan naar windbreekgaas.

Daarnaast is er weinig kennis van het darmmicrobioom voor leghennen beschikbaar en is met dit project veel nieuwe kennis toegevoegd aan dit veld. We hebben vastgesteld dat het darmmicrobioom van leghennen vooral wordt bepaald door de stal waar de kippen in gehuisvest zijn en het bedrijf waar de stallen onder vallen, en dat het microbioom van een gezonde volwassen leghen behoorlijk stabiel is. Dat betekent dat zolang de kippen gezond zijn het microbioom van de volwassen leghennen niet snel beïnvloed kan worden door externe factoren. Dit is belangrijke kennis, omdat we ook weten dat een gezond microbioom invloed kan hebben op de productiecapaciteit van de kippen. Hoewel we in deze studies geen functionele parameters hebben meegenomen, kunnen we op basis hiervan wel vaststellen dat als men het microbioom ten gunste van productie wil moduleren, hier in de jonge kippen (tijdens de opfok) al mee gestart moet worden en dat dit over een langere periode gegeven moet worden.

Toekomstig onderzoek zou zich kunnen richten op het achterhalen of bepaalde managementpraktijken of bepaalde voedingsbestanddelen in positieve of negatieve zin invloed hebben op het darmmicrobioom en daarmee ook de productie van de dieren beïnvloeden. Met name nader onderzoek doen rondom gebeurtenissen die mogelijk het darmmicrobioom uit balans kunnen brengen (bv na een antibioticabehandeling, enting, of bij oververplaatsing van koppels van opfok naar legbedrijf etc) en het vergelijken tussen zieke en gezonde hennen, kan meer inzicht geven in welke factoren de grootste impact hebben en hoe daarop ingegrepen kan worden om de darmgezondheid positief te kunnen beïnvloeden.

### ***Overzicht wetenschappelijke publicaties en bijeenkomsten***

Wetenschappelijke publicaties zijn verschenen of momenteel in de maak en de uitkomsten zijn diverse malen gepresenteerd door Janneke Schreuder in Masterclasses, voor de WVPA en bij wetenschappelijke congressen. Enkele voorbeelden:

#### Dierexperiment

##### *Artikelen*

Janneke Schreuder, Francisca C Velkers, Ruth J Bouwstra, Nancy Beerens, J Arjan Stegeman, Willem F de Boer, Armin R W Elbers, Pim van Hooft, Anneke Feberwee, Alex Bossers, Stephanie D Jurburg, Limited changes in the fecal microbiome composition of laying hens after oral inoculation with

wild duck feces, Poultry Science, Volume 98, Issue 12, December 2019, Pages 6542–6551, <https://doi.org/10.3382/ps/pez526>

#### *Congressen*

- Congres Society for Veterinary Epidemiology and Preventive Medicine, 27-29 Maart 2019: poster “Limited effects of fecal microbiota transfer on the fecal microbiome composition of laying hens”
- World's Poultry Science Association Nederland 9-4-2019: presentatie “Minimale effecten van inoculatie met wilde eenden- of kippenmest op het darmmicrobioom van leghennen”
- World Veterinary Poultry Association: poster “Limited effects of fecal microbiota transfer on the fecal microbiome composition of laying hens”

#### Veldstudie

##### *Artikelen*

Janneke Schreuder, Francisca C Velkers, Ruth J Bouwstra, Nancy Beerens, J Arjan Stegeman, Alex Bossers, Stephanie D Jurburg, The fecal microbiome composition in laying hens with and without access to an outdoor range, in preparation.

Dit artikel wordt gevolgd door een tweede paper met de data van de longitudinale studie.

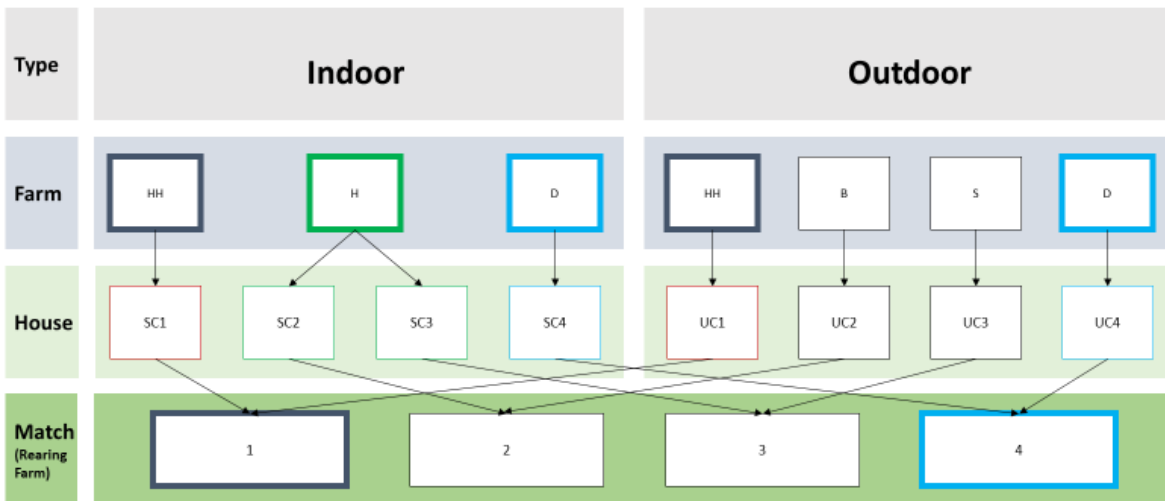
#### *Congressen*

- Microbiome masterclass 19-9-2019: presentatie “Results of field and experimental studies on the fecal microbiota composition of adult laying hens”
- Veterinary Science Day 19-11-2019: poster “The fecal microbiome composition in laying hens with and without access to an outdoor range”

### BijlageFiguur 1. Opzet van cross-sectionele studie

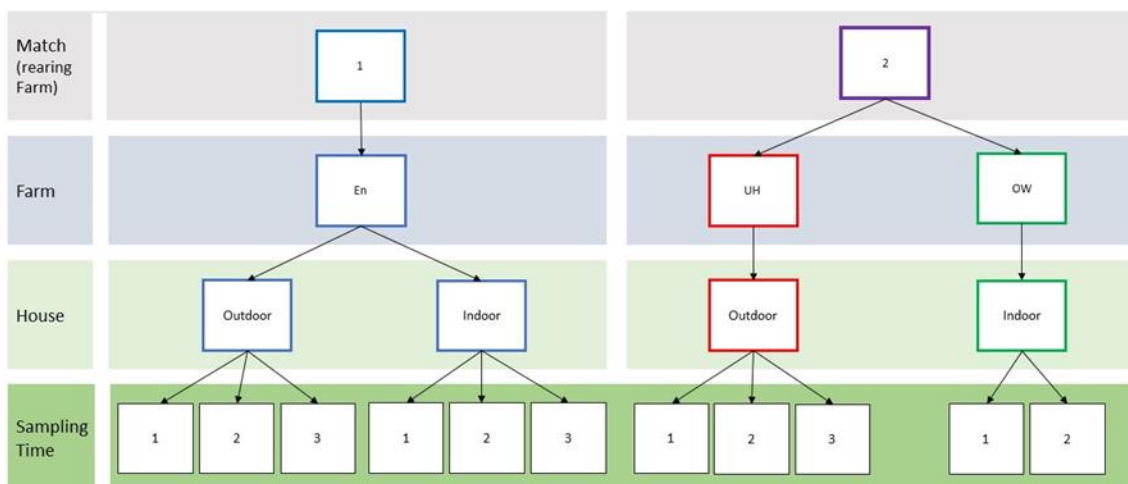
Voor de cross-sectionele studie zijn in 2016 en 2017 in totaal 10 koppels van 5 leghennenbedrijven bemonsterd. Om variatie in microbiom door opfok en omgevingsfactoren te beperken werden bedrijven gematched op basis van opfokbedrijf en waren alle 8 koppels Dekalb White hennen tussen 27-40 weken oud.

Twee van de gematchte koppels van hennen met en zonder uitloop waren gevestigd op hetzelfde bedrijf. Twee van de koppels zonder uitloop waren gevestigd op hetzelfde bedrijf en twee uitlooppokkels kwamen van verschillende bedrijven. Om weersinvloeden en andere seizoenseffecten te minimaliseren werden de koppels kort na elkaar bemonsterd.



### BijlageFiguur 2. Opzet van longitudinale studie

Voor de longitudinale studie zijn 4 bedrijven, 2 met en 2 zonder uitloop over 4 maanden driemaal bezocht: direct na het intrekken van het ophokverbod in mei 2017 en 8 en 16 weken na toegang tot de uitloop. Ook hierbij werd gematched op basis van opfokbedrijf.



## **Bijlage 2**

### **Project 5: Toetsen van waarschijnlijkheid van verschillende HPAI insleeproutes onder experimentele omstandigheden**

#### **Woord vooraf**

Binnen de PPS Fight Flu was het plan in project 5 interventie maatregelen te toetsen die het contact tussen pluimvee en wilde vogels zouden kunnen beperken. Op verzoek van de opdrachtgevers (Avined en LNV) is gewacht met concrete invulling van dit project totdat de roadmap strategische aanpak vogelgriep definitief werd vastgesteld én bekend was welke actiepunten uit de roadmap via andere routes gefinancierd zouden worden. Nadat er duidelijkheid was gekomen en de sector had aangegeven verder te willen gaan met aanbeveling 10b uit de roadmap, te weten: 'inventarisatie en onderzoek naar effectiviteit van maatregelen om wilde watervogels te weren van de uitloop en de omgeving rond het pluimveebedrijf', heeft de projectgroep van Fight Flu een eerste voorstel geschreven voor project 5. Dit voorstel is besproken tijdens een bijeenkomst met bestuurders op 13 januari jl. In de discussie werd duidelijk dat de focus op uitloopbedrijven en de omgeving - zoals dit is benoemd in aanbeveling 10b - geen prioriteit heeft. Er is aangegeven dat de focus voor dit project 5 bij voorkeur ligt op mogelijke insleeproutes van HPAI op pluimveebedrijven en welke interventie maatregelen effectief zijn om insleep zo veel mogelijk te voorkomen. De recente uitbraken van HPAI in Oost-Europa tonen aan dat kennis van maatregelen voor het voorkomen van HPAI insleep momenteel en in de toekomst nog net zo belangrijk zijn als een paar jaar geleden. In dit document is daarom een nieuw voorstel uitgewerkt met als focus de insleep van HPAI op pluimveebedrijven te verkleinen.

#### **Inleiding**

Tussen november 2014 en begin 2018 zijn er bij pluimveebedrijven in Nederland 17 uitbraken geweest van hoogpathogene AI (HPAI) op 12 verschillende pluimveebedrijven. Er hebben verschillende onderzoeken plaatsgevonden om te achterhalen wat de mogelijke insleeproutes zijn geweest. Zo is er voor alle bedrijven een uitgebreide epidemiologische analyse uitgevoerd en naar aanleiding van deze uitbraken is een vogelgriepscan ontwikkeld en afgenomen. Op basis van al deze onderzoeken zijn er verschillende mogelijke insleeproutes vastgesteld. Ondanks dat het nog steeds mogelijk is dat insleep van HPAI besmet materiaal door personen, knaagdieren en/of materialen heeft plaatsgevonden, kan zeker niet worden uitgesloten dat insleep van HPAI besmet stof en/of aerosolen via openingen in de stal de infectie heeft binnengebracht. Activiteiten op het land in de nabijheid van pluimveebedrijven (bv. verwerken van bagger of omploegen en maaien etc.) kunnen stofdeeltjes of druppels met besmette vogelmest in de lucht brengen. Daarnaast zou mogelijk lekwater of druppels vanaf dak of regengoot met mest van overvliegende vogels of opwervende mestdeeltjes vanuit de weilanden rondom het bedrijf naar binnen kunnen komen.

Naar aanleiding van bovenstaande analyses en een klein onderzoek naar het effect van windbreekgaas op transmissie van vogelgriep, is er dit jaar een onderzoek gestart naar de relatieve rol van insleeproutes en bioveiligheid op en rond het pluimveebedrijf waar in de eerste plaats m.b.v. een verklikkerstof en aanvullende risicomodellen wordt gekeken of er insleep optreedt vanuit de omgeving naar de stal en in de tweede plaats of windbreekgaas deze insleep tegenhoudt of vermindert.

In de afgeronde en lopende onderzoeken wordt met name gekeken naar de situatie in het veld. Zo zijn in de epidemiologische analyses uitgebreide gesprekken met veehouders gevoerd en zijn de specifieke bedrijfsomstandigheden onderzocht en zal in het lopende onderzoek m.b.v. een verklikkerstof gekeken worden of er daadwerkelijk insleep vanuit de omgeving naar de stal plaatsvindt en zo ja, dan wordt modelmatig getoetst of deze kans op insleep is te verkleinen of tegen te houden met windbreekgaas.

Aanvullend op de hierboven genoemde onderzoeken is het van belang om te toetsen of insleep daadwerkelijk tot infectie kan leiden bij kippen. Dit kan alleen getoetst worden onder experimentele omstandigheden omdat daar met infectieus virus en levende kippen gewerkt kan worden. De

onderzoeksvraag luidt dan: hoeveel virus en in welke matrix (bv. stof/aerosolen/natte mest) kan, na insleep vanuit de omgeving, daadwerkelijk tot een infectie leiden bij kippen?

Uit eerdere onderzoeken en het lopende project 'relatieve rol insleeproutes', kunnen de verschillende insleeproutes gerangschikt worden op waarschijnlijkheid van voorkomen. Op basis van deze rangschikking kunnen de meest waarschijnlijke insleeproutes gebruikt worden in dit onderzoek onder experimentele omstandigheden. Om te onderzoeken of het waarschijnlijk is dat een insleeproute kan plaatsvinden, worden experimenten voorgesteld met levende kippen en infectieus virus.

### **Doel van het project 5**

Het doel van dit onderzoek is om, onder experimentele omstandigheden, te toetsen of virus wat via eerder vastgestelde mogelijke insleeproutes is overgedragen, het vermogen heeft kippen te infecteren.

### **Materiaal en Methode**

Van alle mogelijke HPAI insleeproutes die in het verleden zijn benoemd en die uit het huidige onderzoek m.b.v. een verklikkerstof naar voren komen, wordt een selectie gemaakt op basis van 1) waarschijnlijkheid van voorkomen en 2) mogelijkheid om na te bootsen in een experimentele setting. In de experimenten die uitgevoerd gaan worden, zullen in ieder geval besmettingsbronnen met infectieus virus aanwezig zijn en levende kippen. De concentratie virus in de besmettingsbron kan gevarieerd worden en ook bijvoorbeeld de 'weersomstandigheden' zoals luchtverplaatsingssnelheid, temperatuur, relatieve luchtvochtigheid. De vraag die beantwoord gaat worden, is of er daadwerkelijk een infectie kan plaatsvinden bij kippen als het virus via de geselecteerde insleeproutes wordt overgedragen van de bron naar de kip. Als eventuele vervolgstap zouden er in deze experimentele opstellingen ook interventie maatregelen getoetst kunnen worden waarmee blootstelling aan het virus kan worden verminderd.

### **Beoogd resultaat**

Dit onderzoek zal het inzicht vergroten in welke insleeproutes waarschijnlijk zijn en onder welke omstandigheden er een grotere kans bestaat op verspreiding van levend virus vanuit een besmettingsbron naar kippen. Op basis van deze resultaten kunnen beter preventieve maatregelen genomen worden om insleep in het veld te voorkomen en kunnen er betere voorspellingen gedaan worden onder welke omstandigheden er mogelijk een hoger risico is op insleep.