

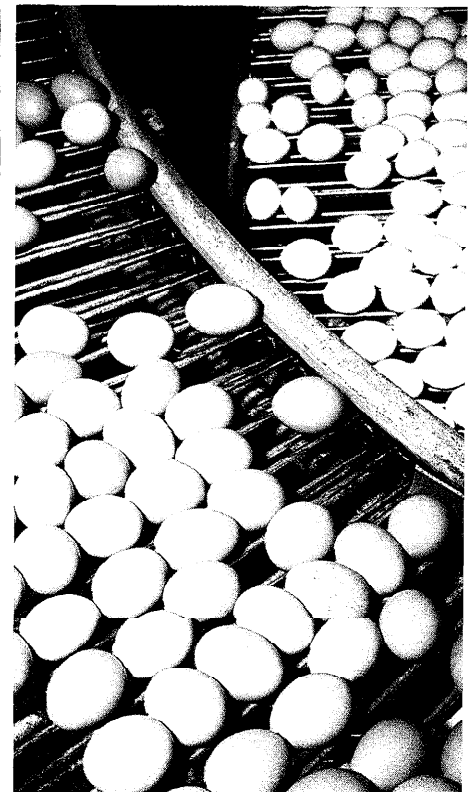
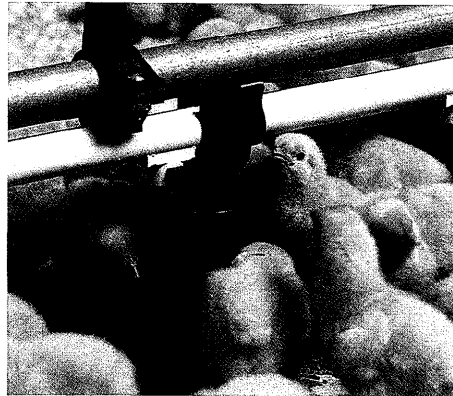


PP-uitgave no. 47

IN-OVO INJECTIE VAN BROILACT® IN BROEDEIEREN

Dr. Ing. R. Meijerhof

Oktober 1996



IN-OVO INJECTIE VAN BROILACT® IN BROEDEIEREN

**In-ovo administration of BROILACT®
in hatching eggs**

Dr. Ing. R. Meijerhof

Oktober 1996

Praktijkonderzoek Pluimveehouderij

PP-uitgave no. 47

PP-uitgave no. 47.

Oktober 1996.

Losse nummers van de PP-uitgaven zijn verkrijgbaar door f. 10,00 over te maken op girorekening 3839554 of bankrekeningnummer 30.83.04.837 t.n.v. Praktijkonderzoek Pluimveehouderij onder vermelding van PP-uitgave no....

PP-uitgave is een publicatie van Praktijkonderzoek Pluimveehouderij "Het Spelderholt".

Redactie en administratie:

Postbus 31
7360 AA Beekbergen
Tel.nr. 0555066500
Fax.nr. 055-5064858

Overname:

Geheel of gedeeltelijk overnemen van de inhoud uit deze uitgave is toegestaan, mits de bron wordt vermeld.

ISSN: 0928-2076

VOORWOORD

Een onderdeel van het onderzoek van PP is het positief beïnvloeden van de kwaliteit van het eindproduct. Om de kans op besmetting met Salmonella te verminderen kan gebruik worden gemaakt van Kolonisatie Resistentie.

In dit kader is een serie experimenten uitgevoerd waarbij gekeken is of het Salmonella-probleem te bestrijden is via het inbrengen van bacteriecultures in de luchtkamer. Hoewel de behandeling technisch geen probleem oplevert waren de resultaten van het onderzoek negatief. De behandeling geeft een sterke vermindering van broedresultaten, terwijl ook de kwaliteit van de ééndagskuikens slechter was.

In dit onderzoekverslag vindt u de achtergrondinformatie met betrekking tot deze aanpak. Gaarne houden wij ons aanbevolen voor uw op- en aanmerkingen. U kunt daartoe rechtstreeks met de onderzoeker contact opnemen.

Oktober 1996.
Ir. G.W.H. Heusinkveld,
directeur.

INHOUDSOPGAVE

	SAMENVATTING	5
	SUMMARY	6
1	INLEIDING	7
2	MATERIAAL EN METHODE	9
	2.1 Aanmaken van de KR-cultuur	9
	2.2 IN-OVO injectie	9
	2.3 Broedproces	9
	2.4 Experiment 1	10
	2.5 Experiment 2	10
	2.6 Experiment 3	11
3	RESULTATEN EN DISCUSSIE	12
	3.1 Experiment 1	12
	3.2 Experiment 2	13
	3.3 Experiment 3	15
4	CONCLUSIES	17

SAMENVATTING

Het effect van toepassing van Kolonisatie Resistentie ter vermindering van Salmonellabesmetting hangt onder andere af van het tijdstip van toediening. Voor een optimaal resultaat is het belangrijk dat de bacteriecultuur zo snel mogelijk aan de kuikens wordt toegediend, voordat deze in aanraking komen met eventuele Salmonellabacteriën uit de omgeving. Uit praktisch oogpunt wordt de bacteriecultuur momenteel veel toegepast na het afrapen. Met behulp van IN-OVO injectie-techniek is het mogelijk om de bacteriecultuur al tijdens het broedproces in het ei te brengen. Dit zou voordelen kunnen bieden voor het in een vroeg stadium opbouwen van de bescherming.

In een serie van drie experimenten is de invloed van injectie van Kolonisatie Resistentiecultuur (Broilact®) in broedeieren op broedresultaten en bescherming tegen besmetting met Salmonella-bacteriën onderzocht. Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat injectie van Broilact® op dag 18 van het broedproces in de luchtkamer van broedeieren een verlaging van het broedresultaat tot gevolg had. Injectie van de cultuur direct in het embryo resulteerde in vrijwel volledige afsterving van de embryo's. Dit moet toegeschreven worden aan de invloed van de bacteriecultuur, omdat injectie met water geen of vrijwel geen negatieve effecten had.

Kuikens afkomstig van eieren die in de luchtkamer geïnjecteerd waren met de cultuur, vertoonden een verhoogde uitval tijdens de mestperiode, met name in de eerste week. De uitgevallen kuikens vertoonden een verminderde opname van de dooierrest, wat een indicatie is voor bacteriële verontreiniging van de embryo's.

De injectie van Broilact® in de luchtkamer leidde niet tot een aantoonbare bescherming van de kuikens tegen Salmonella-infectie, dit in tegenstelling tot het op dag 1 oraal toedienen van de cultuur.

SUMMARY

Competitive exclusion is known to be effective in prevention of *Salmonella* contamination in poultry. The effect of the treatment is dependent on the time of administration. For maximum results, the bacterial culture should be administered as soon as possible to the chick, to prevent *Salmonella* bacteria to colonize. Under commercial conditions, the treatment is often given after pulling of the hatch. By methods of IN-OVO injection, the culture can be applied to the egg during the incubation process. This might be beneficial in the process of protecting the birds against *Salmonella* contamination.

In 3 experiments, the influence of IN-OVO injection of competitive exclusion culture (Broilact®) in broiler hatching eggs on hatchability and protection against *Salmonella* Panama contamination was evaluated. From the results of the experiments it was concluded that injection of Broilact® in the air cell of hatching eggs at 18 days of incubation resulted in a reduced hatchability. Injection of Broilact® direct into the embryo resulted in an almost complete loss of hatchability.

Chicks that hatched from eggs which were injected in the air cell with Broilact® showed an increased mortality, especially in the first week, due to a reduced yolk sac uptake, indicating bacterial contamination of the embryo.

The level of *Salmonella* contamination at 4 weeks of age of birds which received Broilact® by injection in the air cell was not significantly different from the level of untreated birds and significantly higher than the level of contamination of birds that received an oral application of Broilact® at day 1.

1 INLEIDING

Besmetting van pluimveevlees en eieren met Salmonella, vooral *S. Enteritidis* en *S. Thyphimurium*, is een belangrijk probleem bij de huidige pluimveeproductie vanuit het oogpunt van volksgezondheid en productkwaliteit. Strikte hygiënische maatregelen en frequent onderzoek van dieren en koppels kan het vóórkomen van Salmonella in pluimvee onder controle brengen, maar aanvullende maatregelen zijn gewenst.

Om infectie van kuikens met Salmonella tegen te gaan kan de darmflora van de dieren in een vroeg stadium kunstmatig worden aangebracht via het toedienen van een bacteriecultuur. Deze cultuur bestaat uit een combinatie van verschillende bacteriën die ook in de natuurlijke darmflora van kuikens voorkomen. Dit proces, bekend als Kolonisatie Resistentie of KR (in het Engels meestal competitive exclusion genoemd) is gebaseerd op het feit dat Salmonellabacteriën zich hechten aan de darmwand. Wanneer de darmwand al bezet is met kunstmatig aangebrachte bacteriën is de kans dat *Salmonellabacteriën* zich kunnen hechten kleiner, waardoor de besmettingsdruk daalt. In Nederland zijn de bekendste commerciële KR cultures Broilact® en Aviguard®, afkomstig uit respectievelijk Finland en Engeland.

De effectiviteit van deze in Finland ontwikkelde techniek, is op veel plaatsen in de wereld aangetoond. Hierbij gaven laboratoriumexperimenten over het algemeen betere resultaten dan praktijktesten. Een mogelijke verklaring hiervoor kan het moment van toedienen van de bacteriecultuur zijn. Voor een optimaal effect dient de cultuur zo snel mogelijk na het uitkomen te worden toegepast, om de kans op een besmetting zo klein mogelijk te maken. De producenten van KR cultures adviseren om de cultuur toe te dienen als ongeveer 50% van de eieren uitgekomen is. In de praktijk is dit moeilijk uitvoerbaar, omdat de vloeistof over de kuikens verneveld moet worden. Dit is in gestapelde uitkomstbakken niet goed mogelijk. Daarnaast moet de uitkomstkast vrij lang opengehouden worden en kan een formaline-ontsmetting tijdens het uitkomen niet uitgevoerd worden. Ook kan niet gegarandeerd worden dat elk kuiken een afdoende hoeveelheid bacteriën binnenkrijgt, omdat de dieren meer of minder op zullen nemen; onder andere afhankelijk van het tijdstip van uitkomen. Daarnaast dient formaline-ontsmetting tijdens de uitkomst achterwege gelaten te worden, omdat dit de bacteriecultuur zal doden.

Vanwege de praktische bezwaren wordt in de praktijk de KR-cultuur vaak toegediend na het afrapen. Dit betekent echter dat een eventuele besmetting in de broedmachine zich al verspreid kan hebben. Als de besmetting al heeft plaats gevonden voordat de cultuur wordt toegediend, is de kans op succes gering. Omdat een deel van de kuikens al besmet raakt in de broedmachine, door het uitkomen of exploderen van met Salmonella besmette eieren, zal in deze gevallen de toediening vaak te laat hebben plaatsgevonden.

Het is momenteel technisch mogelijk om onder praktijkomstandigheden broedeieren te injecteren. Deze zogenaamde IN-OVO injectietechniek, ontwikkeld door Embrex, USA, wordt in Amerika vooral gebruikt voor het enten van vleeskuikens tegen Marek, op de 18de dag van het broedproces. Met deze techniek is het mogelijk om een bacteriecultuur in de luchtkamer van het ei te injecteren. Op deze wijze kan het kuiken de bacteriecultuur toegediend krijgen op het moment dat het in het ei de luchtkamer aanpikt. Hierdoor zou een

zekere bescherming kunnen worden opgebouwd voordat de dieren in contact komen met *Salmonellabacteriën* buiten het ei. Een bijkomend voordeel is dat eik kuiken de juiste hoeveelheid van de bacteriecultuur krijgt toegediend.

Broedeieren en kuikens zijn erg gevoelig voor microbiële verontreiniging. Bij de ontwikkelde injectietechniek is grote zorg besteed aan het tegengaan van bacteriële besmetting via de injectie. De vraag is echter welke invloed het injecteren van bacteriën tijdens het overleggen heeft op de broedresultaten en kuikenkwaliteit. Een bijkomende vraag is wat de invloed is van het injecteren van een bacteriecultuur in het embryo in plaats van in de luchtkamer. In de praktijk wordt een deel van de eieren met de punt naar boven op de broedladen geplaatst, omdat het verschil tussen punt en bolle zijde niet altijd goed te onderscheiden is. Tevens staat niet elk ei precies rechtop op de broedlade, waardoor in een aantal gevallen in het embryo geïnjecteerd zal worden in plaats van in de luchtkamer.

Om de invloed van het injecteren van een KR-cultuur in broedeieren op broedresultaten, technische resultaten en bescherming tegen besmetting met *Salmonellabacteriën* te testen is een serie experimenten uitgevoerd.

2 MATERIAAL EN METHODEN

In het onderzoek is als KR-cultuur het product Broilact® gebruikt, geproduceerd door de firma Orion te Turku, Finland. Voor alle beschreven experimenten is Broilact® van dezelfde partij gebruikt, in gevriesdroogde vorm.

2.1 Aanmaken van de KR-cultuur

De KR-cultuur is steeds door het op te lossen in gesteriliseerd leidingwater aangemaakt. Als standaard werd per ei of per kuiken een oplossing van 1 mg gevriesdroogde cultuur in 0,2 ml water toegepast, overeenkomstig het advies van de fabrikant. De oplossing werd ongeveer 30 minuten voor de eerste toediening aangemaakt.

2.2 IN-OVO injectie

In alle experimenten werden de eieren geïnjecteerd op dag 18 van het broedproces, tegelijk met het overleggen. Gedurende het injecteren bleven de eieren op de voorbroedladen. Voor het injecteren werden de eieren geschouwd, eieren met onbevuchte en afgestowen embryo's verwijderd en het midden van de luchtkamer met een viltstift gemerkt (voor de eieren die in de luchtkamer werden geïnjecteerd). Direct voor het injecteren werd de injectieplaats van elk ei gereinigd met een oplossing van 0,5% natrium-hypochloriet (bleekwater).

Op de gemerkte plek of in de punt van het ei werd een gat gemaakt met een 16 g naald, voorzien van een rubber stop om te voorkomen dat de naald verder dan 2,5 mm in het ei ging. Daarna werd een hoeveelheid van 0,2 ml vocht via het gat in het ei geïnjecteerd met een 20 g naald, eveneens voorzien van een rubber stop. Dit om te voorkomen dat de naald verder dan 5 mm in het ei ging.

In experiment 1 werden de naalden na elke voorbroedlade ontsmet (80 eieren).

In het tweede en derde experiment werden de naalden na elk ei ontsmet door ze te dopen in een 0,5% natrium-hypochloriet oplossing en ze tussen de verschillende broedladen te vervangen.

2.3 Broedproces

In alle experimenten zijn de eieren in single-stage machines gebroed bij een temperatuur van 37,5°C en 55% relatieve luchtvochtigheid in de voorbroeder en bij 37°C en 55-65% relatieve luchtvochtigheid in de uitkomstkast. In de tweede en derde proef werden de eieren bij het inleggen en bij het overleggen (na het injecteren) met formaldehydegas ontsmet. In de eerste proef werden de eieren niet ontsmet. Op de achttiende dag van het broedproces werden de eieren geschouwd, de onbevuchte eieren en de eieren met dode embryo's verwijderd en de eieren geïnjecteerd. Na het injecteren werden de eieren in uitkomstbakken gelegd en in de uitkomstmachine geplaatst.

De invloed van het injecteren van KR-cultuur op de broedresultaten is onderzocht in twee experimenten.

2.4 Experiment 1

In deze proef werden in totaal 2000 eieren gebruikt, afkomstig van een koppel Barred Rock vleeskuikenouderdieren. Na 18 dagen broeden zijn 1680 eieren met levende embryo's verdeeld in 21 groepen van 80 eieren elk. In dit experiment zijn in totaal zeven behandelingen getest met drie herhalingen per behandeling. Hierbij is zowel de normale dosis Broilact® als een gehalveerde dosis Broilact® toegepast, om te zien of de concentratie van Broilact® invloed had op de broedresultaten. De uitgevoerde behandelingen zijn vermeld in tabel 2.1. De gegevens zijn geanalyseerd door middel van variantie-analyse, volgens een volledig gerandomiseerd model.

Tabel 2.1: behandelingen uitgevoerd in experiment 1.

Eieren geïnjecteerd in:	Eieren geïnjecteerd met:
Niet geïnjecteerd	Niet geïnjecteerd
Stompe kant (luchtkamer)	0,2 ml water
Stompe kant (luchtkamer)	0,2 ml water, 1 mg Broilact®
Stompe kant (luchtkamer)	0,2 ml water, 0,5 mg Broilact®
Punt	0,2 ml water
Punt	0,2 ml water, 1 mg Broilact®
Punt	0,2 ml water, 0,5 mg Broilact®

2.5 Experiment 2

In deze proef zijn eveneens in totaal 2000 eieren gebruikt, afkomstig van een koppel Barred Rock vleeskuikenouderdieren. Na 18 dagen broeden zijn 1785 eieren met levende embryo's verdeeld in 21 groepen van 85 eieren elk. Ook in dit experiment zijn in totaal zeven behandelingen getest met drie herhalingen per behandeling, en is een verlaagde concentratie Broilact getest. Hierbij is echter in plaats van een 2-voudige verdunning, zoals toegepast in experiment 1, een 10-voudige verdunning toegepast. De uitgevoerde behandelingen zijn vermeld in tabel 2.2. De gegevens zijn weer geanalyseerd door middel van variantie-analyse, volgens een volledig gerandomiseerd model.

Tabel 2.2: behandelingen uitgevoerd in experiment 2.

Eieren geïnjecteerd in:	Eieren geïnjecteerd met:
Niet geïnjecteerd	Niet geïnjecteerd
Stompe kant (luchtkamer)	0,2 ml water
Stompe kant (luchtkamer)	0,2 ml water, 1 mg Broilact®
Stompe kant (luchtkamer)	0,2 ml water, 0,1 mg Broilact®
Punt	0,2 ml water
Punt	0,2 ml water, 1 mg Broilact®
Punt	0,2 ml water, 0,1 mg Broilact®

2.6 Experiment 3

Het derde en laatste experiment is uitgevoerd op "Het Spelderholt" in Beekbergen. In dit onderzoek werden in totaal 600 Ross eieren ingelegd. Na 18 dagen broeden werden 150 eieren met levende embryo's geïnjecteerd in de luchtkamer met 1 mg Broilact® opgelost in 0,2 ml water. De overige eieren werden op de normale wijze uitgebroed, zonder injectie. Na uitkomst werd het broedresultaat bepaald. Van de geïnjecteerde groep werden 80 gezonde ééndagskuikens at random verdeeld over vier grondkooien van 1 m² elk (20 kuikens/kooi). Van de niet-geïnjecteerde groep werden 160 gezonde kuikens at random verdeeld in acht groepen van twintig kuikens. Vier groepen werden niet behandeld maar opgezet in grondkooien. De overige 4 groepen kregen 1 mg Broilact® opgelost in 0,2 ml water via de bek ingegeven, waarna deze dieren eveneens werden opgezet in grondkooien. In de grondkooien was voer en water permanent beschikbaar en werd een normaal temperatuursregime gehanteerd.

De dag na plaatsing kregen alle kuikens een oplossing met daarin ongeveer 10.000 bacteriën van het soort Salmonella Panama via de bek ingegeven. Op 14, 21 en 28 dagen leeftijd zijn per grondkooi vijf dieren gedood met behulp van CO₂-gas, waarna hun ingewanden werden verwijderd. De ingewanden werden uitwendig ontsmet waarna de blinde darm werd geopend en bemonsterd. Dit monster werd op kweek gezet, waarna een Salmonella-bepaling werd uitgevoerd. Daarnaast werd de oorzaak van uitval onderzocht.

3 RESULTATEN EN DISCUSSIE

In dit hoofdstuk wordende resultaten van een serie experimenten gepresenteerd

3.1 Experiment 1

In tabel 3.1 zijn de broedresultaten weergegeven, zoals die in het eerste experiment behaald zijn.

Tabel 3.1: broedresultaten van experiment 1, weergegeven als percentage van het aantal overgelegde eieren na 18 dagen broedproces.

Eieren geïnjecteerd in:	Eieren geïnjecteerd met:	Niet aangepikt %	Aangepikt %	Kuikens %
<i>Niet geïnjecteerd</i>	Niet geïnjecteerd	4,7 ^{a*}	1,6 ^a	93,7 ^a
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water	6,9 ^a	1,2 ^a	91,8 ^a
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water, 1 mg Broilact®	4,9 ^a	4,9 ^a	86,3 ^a
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water, 0,5 mg Broilact®	6,9 ^a	4,9 ^a	84,9 ^a
<i>Punt</i>	0,2 ml water	26,1 ^b	21,2 ^b	51,4 ^b
<i>Punt</i>	0,2 ml water, 1 mg Broilact®	59,9 ^c	31,8 ^c	5,3 ^c
<i>Punt</i>	0,2 ml water, 0,5 mg Broilact®	52,7 ^c	41,2 ^c	3,3 ^c

* Resultaten in dezelfde kolom met verschillende letters zijn significant verschillend ($p < 0,05$).

De injectie van Broilact® in de punt van het ei had een grote invloed op de broedresultaten en resulteerde in een vrijwel volledige afsterving van de embryo's, zowel bij de hoge als bij de lage concentratie. De injectie van Broilact® in de luchtkamer had geen significant effect op het broedresultaat, maar de analyse werd enigszins verstoord door de grote mate van afsterving in de eerder genoemde groepen. Wanneer deze gegevens uit de analyse werden gelaten was een trend ($p < 0,1$) naar een lager broedresultaat als gevolg van injectie van Broilact® in de luchtkamer aantoonbaar, in vergelijking met de injectie van water in de luchtkamer of geen injectie.

De injectie van water in de punt van het ei resulteerde in een sterk significante verlaging van het broedresultaat. Nadere analyse van de gegevens liet zien dat dit vooral het gevolg was van de groepen die later op de dag waren geïnjecteerd. De eerste groep eieren die op deze wijze was geïnjecteerd, had nagenoeg dezelfde broedresultaten als de controlegroep, terwijl bij de laatste groep de uitkomst tot minder dan 10% was gedaald. Dit wijst erop dat vervuiling van de naald de oorzaak zou kunnen zijn. Injectie in de punt van het ei veroorzaakt een beschadiging van de weefsels van het embryo (vaak waren bloedsporen zichtbaar na de injectie) waardoor bacteriële verontreiniging een probleem kan zijn. Dit zou ook een oorzaak kunnen zijn voor de verlaagde broedresultaten van de groep waarbij Broilact® in de punt van het ei werd geïnjecteerd. Daarom werd in het tweede en derde experiment de naald tussen elk ei gedesinfecteerd en tussen groepen eieren vervangen.

3.2 Experiment 2

In tabel 3.2 zijn de broedresultaten van het tweede experiment weergegeven.

Tabel 3.2: broedresultaten van experiment 2, weergegeven als percentage van de overgelegde eieren op 18 dagen.

Eieren geïnjecteerd in:	Eieren geïnjecteerd met:	Niet aangepikt %	Aangepikt %	Kuikens %
<i>Niet geïnjecteerd</i>	Niet geïnjecteerd	4,9 ^a	3,7 ^a	91,0 ^{ab}
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water	2,8 ^a	4,3 ^a	92,9 ^a
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water, 1 mg Broilact®	8,6 ^a	7,5 ^a	83,1 ^b
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water, 0,1 mg Broilact®	4,7 ^a	6,7 ^a	87,9 ^{ab}
<i>Punt</i>	0,2 ml water	9,4 ^a	5,5 ^a	85,1 ^{ab}
<i>Punt</i>	0,2 ml water, 1 mg Broilact®	72,2 ^b	27,5 ^b	0,4 ^c
<i>Punt</i>	0,2 ml water, 0,1 mg Broilact®	66,3 ^b	32,6 ^b	0,8 ^c

* Resultaten in dezelfde kolom met verschillende letters zijn significant verschillend ($p < 0,05$).

Ook in dit experiment werd een sterk negatief effect van de injectie van Broilact® in de punt van het ei op de broedresultaten geconstateerd. De injectie van water in de punt had geen significant effect op de broedresultaten, hoewel een tendens naar een lager broedresultaat waarneembaar was.

Het verschil in resultaten voor deze groep tussen het eerste en het tweede experiment moet waarschijnlijk toegerekend worden aan de verbeterde hygiënische omstandigheden in het tweede experiment, waardoor overdracht van bacteriën via de injectienaalden verminderd werd.

Het injecteren van Broilact® in de luchtkamer gaf ook in dit experiment een tendens naar verminderd broedresultaat in vergelijking met de controlegroep. Om de invloed van de injectie van Broilact® in de luchtkamer apart te analyseren zijn de resultaten van de controlegroepen, de groepen met injectie van water in de luchtkamer, de groepen met injectie van 1 mg Broilact® per ei en de gecombineerde resultaten van injectie van een verlaagde dosis Broilact® per ei van beide experimenten gezamenlijk geanalyseerd met variantie-analyse en experiment als blok. De resultaten van deze analyse zijn weergegeven in tabel 3.3.

Tabel 3.3: gecombineerde broedresultaten van experimenten 1 en 2 voor de controlegroepen, water geïnjecteerd in de luchtkamer, Broilact® geïnjecteerd in de luchtkamer en verlaagde dosis van Broilact® geïnjecteerd in de luchtkamer.

Eieren geïnjecteerd in:	Eieren geïnjecteerd met:	Niet aangepikt %	Aangepikt %	Kuikens %
<i>Niet geïnjecteerd</i>	Niet geïnjecteerd	4,8 ^a	2,8 ^a	92,4 ^a
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water	4,9 ^a	2,8 ^a	92,4 ^a
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water, 1 mg Broilact®	6,8 ^a	6,2 ^b	84,7 ^b
<i>Luchtkamer</i>	0,2 ml water, 0,5 mg of 0,1 Broilact®	5,8 ^a	5,8 ^{ab}	86,5 ^b

* Resultaten in dezelfde kolom met verschillende letters zijn significant verschillend ($p < 0,05$).

De resultaten geven aan dat de broedresultaten van de eieren in de luchtkamer geïnjecteerd met Broilact® significant lager waren dan die van de controlegroep of van de groep met water in de luchtkamer geïnjecteerd. Dit geeft aan dat de oorzaak voor de verlaagde broedresultaten gerelateerd was met de injectie van Broilact® en niet met de injectieprocedure op zich. Dit is in overeenstemming met de resultaten die in de praktijk behaald zijn met deze injectiemethodiek. Opening van de niet uitgekomen eieren en kuikens ondersteunt deze verklaring, want de reuk van deze kuikens was typisch voor bacteriële verontreiniging. Een mogelijke verklaring voor de verlaging van de broedresultaten kan zijn dat bij een aantal eieren gedurende het injectieproces de binnenste membraan (tussen luchtkamer en eiwit) beschadigd wordt door de naald, waardoor de bacteriën de kans krijgen om het eiwit te bereiken en zich door het ei te verspreiden. Een andere verklaring kan zijn dat door de warme en vochtige condities in de luchtkamer de groei van de geïnjecteerde bacteriecultuur zodanig hoog is dat deze voor het uitkomen al door de membraan is gedrongen. Uit de resultaten kan niet worden afgeleid welke verklaring correct is.

In de beschreven experimenten is Broilact® geïnjecteerd tijdens het overleggen op 18 dagen. Dit is niet noodzakelijk voor het bereiken van het voorgestelde mechanisme van Kolonisatie Resistentie. Aanwezigheid van de bacterie cultuur tijdens het inwendig aanpikken van de luchtkamer of tussen het inwendig aanpikken en het aanpikken van de schaal zou waarschijnlijk voldoende zijn. Dit is echter praktisch gesproken niet haalbaar, gezien de variatie in tijd tussen de eieren en de praktijk van het overleggen op 18 dagen. Injectie met een lagere dosis blijkt de groei van de bacteriën niet dusdanig te vertragen dat daarmee het negatieve effect wordt opgeheven. Een veel lagere dosis van de bacteriecultuur of het toedienen van de cultuur in een vorm die de groei van de bacterie in het ei sterk vertraagd, kan wellicht een oplossing bieden.

In een praktijksituatie wordt een aantal eieren met de luchtkamer aan de onderkant op de broedladen geplaatst, afhankelijk van merk dieren, leeftijd van de dieren en deskundigheid van de medewerkers. De resultaten van het onderzoek geven aan dat deze eieren als verloren moeten worden beschouwd wanneer ze geïnjecteerd zijn met een bacteriecultuur.

Ditzelfde zal geïden voor eieren die niet voldoende rechtop staan of de luchtkamer voldoende in het centrum van het ei hebben, waardoor in het embryo in plaats van in de luchtkamer wordt geïnjecteerd.

3.3 Experiment 3

De broedresultaten van het derde experiment zijn weergegeven in tabel 3.4.

Tabel 3.4: broedresultaten van experiment 3, weergegeven als percentage van eieren overgelegd na 18 dagen broedproces.

	Controle (niet behandeld)	Broilact® (IN-OVO)
<i>Niet aangepikt %</i>	1,5	3,3
<i>Aangepikt %</i>	3,1	13,3
<i>Dood/afgemaakt %</i>	0,5	1,3
<i>Gezonde kuikens %</i>	94,9	82,0
<i>Aantal eieren overgelegd</i>	390	150

De resultaten van tabel 3.4 geven opnieuw een verlaagd broedresultaat te zien voor de met Broilact® geïnjecteerde groep. Hoewel een statistische analyse niet mogelijk is door de gekozen proefopzet zijn de resultaten in overeenstemming met die van de eerdere experimenten.

In tabel 3.5 is de uitval in de eerste week en de uitval gedurende het gehele experiment weergegeven. In deze tabel staan ook de resultaten van de *Salmonella* bepalingen weergegeven.

Tabel 3.5: percentage uitval en percentage *Salmonella*-positieve dieren op 2, 3 en 4 weken leeftijd.

	Controle	Broilact® geïnjecteerd	Broilact® oraal
<i>Uitval (week 1) %</i>	0 ^a	12,5 ^b	0 ^a
<i>Uitval (totaal) %</i>	0 ^a	15,0 ^b	2,5 ^a
<i>Salmonella pos. dieren (2 wkn) %</i>	90 ^a	75 ^{ab}	45 ^b
<i>Salmonella pos. dieren (3 wkn) %</i>	95 ^a	60 ^a	55 ^a
<i>Salmonella pos. dieren (4 wkn) %</i>	60 ^{ab}	75 ^a	30 ^b

* Resultaten met verschillende letters in dezelfde rij zijn significant verschillend (p<0,05).

Uit de gegevens van tabel 3.5 blijkt dat injectie van Broilact® heeft geleid tot een significant hogere uitval bij de vleeskuikens. Dit werd vooral veroorzaakt door een hogere uitval in de eerste week. Analyse van de uitgevallen dieren liet zien dat deze dieren waarbij Broilact® geïnjecteerd was een relatief grote dooierrest hadden, Dit duidt op bacteriële verontreiniging van het embryo. Klaarblijkelijk waren ook de uitgekomen kuikens besmet met bacteriën van de cultuur die door de membraan heen het embryo binnen waren gedrongen. De uitval van de groep waarbij Broilact® oraal was ingegeven trad op na de eerste week en liet geen verminderde dooierrestopname zien.

In tabel 3.5 is ook het percentage Salmonella-positieve dieren weergegeven op 2, 3 en 4 weken leeftijd. Bij alle groepen werd een hoog percentage besmette dieren waargenomen. Hoewel statistische analyse niet voor alle leeftijden eenzelfde beeld gaf, kan geconcludeerd worden dat orale toediening van Broilact® geresulteerd heeft in een verlaging van het percentage Salmonella positieve dieren. Een volledige bescherming is door toediening van de KR-cultuur niet bereikt, maar het niveau van besmetting is wel gedaald. Dit is in overeenstemming met ander onderzoek. Uit de resultaten blijkt eveneens dat door middel van injecteren van Broilact® niet hetzelfde niveau van bescherming werd bereikt als wanneer Broilact® oraal werd ingegeven. Op 4 weken leeftijd hadden de dieren waarbij Broilact® in het ei was geïnjecteerd een significant hogere besmetting met Salmonella in vergelijking met de oraal behandelde groep. Significante verschillen met de niet behandelde groep zijn niet geconstateerd.

4 CONCLUSIES

Uit het onderzoek kunnen de volgende conclusies worden getrokken.

IN-OVO injectie van Broilact® bij het overleggen leidt tot een vermindering van de broedresultaten, waarschijnlijk als gevolg van het doordringen van de bacteriën door de membraan in het ei. Verlaging van de concentratie van Broilact® met een factor 2 of een factor 10 gaf geen verbetering in dit opzicht. Eieren die verkeerd om op de broedladen staan en daardoor in het embryo worden geïnjecteerd met Broilact® moeten als verloren worden beschouwd. Injectie van de bacteriecultuur in het embryo leidt tot een vrijwel volledige afsterving van de embryo's. Dit betekent dat onder praktijkomstandigheden de broedresultaten nog slechter zullen zijn dan uit de resultaten van dit onderzoek blijkt, omdat een zeker percentage van de eieren verkeerd om op de broedladen geplaatst wordt.

Injectie van water in de luchtkamer of in het embryo had geen invloed op de broedresultaten. Hieruit kan geconcludeerd worden dat het negatieve effect gerelateerd is met de injectie van de bacteriecultuur. Dit wordt bevestigd door de inspectie van de niet uitgekomen eieren, die een typisch verontreinigde geur verspreidden.

Uit de resultaten kan ook geconcludeerd worden dat kuikens, die uitkwamen uit de eieren die met Broilact® geïnjecteerd waren, een verhoogd niveau van bacteriële verontreiniging hadden, resulterend in een verminderde dooierzakopname. De bescherming tegen besmetting met Salmonella was lager voor de kuikens die afkomstig van eieren die met Broilact® waren geïnjecteerd, dan voor kuikens die Broilact® oraal kregen toegediend.