

Maternale antilichamen tegen *Campylobacter* in eieren van verschillende merken kippen

Rapportnummer WUR 1845091

Projectteam

Miriam Koene (Wageningen Bioveterinary Research)
Jeanet van der Goot (Wageningen Bioveterinary Research)
Jan Cornelissen (Wageningen Bioveterinary Research)
Ingrid de Jong (Wageningen Livestock Research)
Johan Kollenstart (Probroed)
Mark den Hartog (NEPLUVI)

Dit project werd gefinancierd in de vorm van een Publiek Private Samenwerking (PPS) onder het Topsectorenbeleid van het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit. Het is onderdeel van het onderzoeksproject TKI- AF-14203 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' (BO-33.04 AF8).

Januari 2019

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/573977> of op www.wur.nl/bioveterinary-research (onder Wageningen Bioveterinary Research publicaties).

© 2022 Wageningen Bioveterinary Research
Postbus 65, 8200 AB Lelystad, T 0320 23 82 38, E info.bvr@wur.nl, www.wur.nl/bioveterinary-research.
Wageningen Bioveterinary Research.

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden vermenigvuldigd en/of openbaar gemaakt worden door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke wijze dan ook zonder voorafgaande toestemming van de uitgever of auteur.

Inhoudsopgave

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
1.1 Informatie over de sector	8
1.2 Informatie over maternale antilichamen	9
2 Opzet van het onderzoek	10
2.1 Verzamelen van eieren	10
2.2 ELISA	11
2.3 Statistische analyse	13
3 Resultaten	14
3.1 Leeftijd	14
3.2 Vleeskuikenmerken en koppels	17
3.3 Tragere groeiers versus reguliere vleeskuikens	18
4 Discussie en conclusies	19
5 Referenties	21
6 Bijlage 1. Overzicht bemonsteringen koppels vleeskuikenmoederdieren	22

Samenvatting

In een publiek-private samenwerking tussen de overheid (ministerie van Economische Zaken) en het pluimveebedrijfsleven is het onderzoeksproject 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' uitgevoerd. Binnen dit project werken de kennisinstellingen Wageningen Bioveterinary Research (bij start bekend als Centraal Veterinair Instituut), Wageningen Livestock Research en de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht samen met NEPLUVI, PLUIMNED, LTO-NOP en NVP aan de uitvoering van het onderzoek. Uit de resultaten van onderzoek uitgevoerd in 2015 en 2016 kwam naar voren dat, tegen de verwachting in, er géén verschil werd gevonden wat betreft het percentage *Campylobacter* positieve koppels bij slacht tussen trager groeiende en regulier gehouden vleeskuikens. Immers, leeftijd is bij vleeskuikens een belangrijke risicofactor voor kolonisatie met *Campylobacter* en het was de verwachting dat vanwege de hogere slachtleeftijd van koppels trager groeiende vleeskuikens, zij bij slacht vaker *Campylobacter* positief zouden zijn in vergelijking met reguliere vleeskuikens. Onduidelijk is waarom dit niet het geval bleek te zijn. Meer inzicht in factoren die daar een rol bij spelen kan aanknopingspunten bieden om het aantal *Campylobacter* positieve koppels te verlagen.

Eén van de mogelijke oorzaken die meespeelt is de vanuit het moederdier meegekregen bescherming tegen *Campylobacter* kolonisatie die wordt gevonden in de eerste levensweken van een kuiken; de maternale immuniteit. Onder praktijkomstandigheden treedt kolonisatie met *Campylobacter* bij vleeskuikens namelijk pas op vanaf de tweede levensweek. Een associatie is aangetoond met de aanwezigheid van zogenaamde maternale antilichamen (die door het moederdier via het ei worden doorgegeven aan het kuiken en die zorgen voor bescherming van het kuiken in de eerste dagen na uitkomst). Trager groeiende vleeskuikens zijn van een ander merk dan reguliere vleeskuikens. De hypothese was dat trager groeiende vleeskuikenmerken een hogere mate van maternale antilichamen hebben t.o.v. reguliere merken en daardoor langer zijn beschermd in de eerste levensweken. Dit zou bij trager groeiende vleeskuikens een verkorting van de risicoperiode voor mogelijke kolonisatie van *Campylobacter* betekenen.

Dit rapport beschrijft de resultaten van metingen van maternale antilichamen in eieren van de twee meest gebruikte reguliere en de drie meest gebruikte trager groeiende vleeskuikenmerken om te zien of er verschillen bestaan in de hoeveelheid maternale antilichamen (IgY) in eieren van hennen die vleeskuikens leveren. Op meerdere tijdstippen tijdens de legperiode zijn eieren verzameld en onderzocht op IgY gericht tegen *Campylobacter*.

Er konden geen verschillen worden aangetoond tussen de reguliere en langzamer groeiende vleeskuikens voor wat betreft de hoeveelheid IgY tegen *Campylobacter* in eieren. Wel viel op dat er veel variatie bestond in de hoeveelheid IgY in eierdooiers tussen de diverse koppels, en dat de hoeveelheid IgY sterk toe- en afnam op opeenvolgende maandelijks meetmomenten. Onduidelijk is waardoor dit werd veroorzaakt.

Het is mogelijk dat niet de absolute hoeveelheid antilichamen verschilt tussen reguliere en tragere groeiende vleeskuikenmerken, maar de mate van verbruik. Bij een hoger gebruik zal de hoeveelheid IgY sneller afnemen en daarmee de periode waarin het kuiken

beschermd is korter zijn. Om hier antwoord op te krijgen is aanvullend (dierexperimenteel) onderzoek nodig. Informatie over het verloop van IgY gericht tegen *Campylobacter* in serum van kuikens in de eerste twee levensweken en hoe dit kolonisatie van *Campylobacter* in de darmen beïnvloedt moet aantonen of er verschillen zijn tussen verschillende vleeskuikenlijnen.

1 Inleiding

In 2015 is een vierjarig onderzoeksproject (AF-14203) gestart in de vorm van een Publiek Private Samenwerking (PPS) onder het Topsectorenbeleid van het Ministerie van Economische Zaken. Binnen deze PPS 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' hebben de kennisinstellingen Wageningen Bioveterinary Research (voorheen Centraal Veterinair Instituut), Wageningen Livestock Research en de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht samengewerkt met NEPLUVI, PLUIMNED, LTO-NOP en NVP aan onderzoek naar reductie van *Campylobacter* dat zich richt op zowel de primaire bedrijven als op het slachtproces. Doel is om het aandeel *Campylobacter* besmette koppels, en hieruit voortkomend *Campylobacter* positief pluimveevlees, terug te dringen om zo het aantal ziektegevallen bij de mens te verlagen. Het project bestaat uit diverse onderzoekslijnen, gericht op zowel de primaire sector als op de pluimveeverwerkende sector (<https://www.wur.nl/nl/project/Campylobacter-de-baas.htm>).

Uit één van de onderzoekslijnen kwam naar voren dat er een verschil lijkt te bestaan tussen tragere groeiers en regulier gehouden vleeskuikens voor wat betreft kolonisatie met *Campylobacter*. Gedurende een half jaar (mei-november 2016) werd door een Nederlands slachthuis blindedarm monsters onderzocht van koppels reguliere en trager groeiende vleeskuikens op de aanwezigheid van *Campylobacter* (per koppel een verzamelmonster van 30 dieren); 150 koppels tragere groeiers en 228 koppels regulier gehouden vleeskuikens. De daarbij gevonden percentages *Campylobacter* positieve koppels waren 79% (betrouwbaarheidsinterval 73-84%) voor de reguliere vleeskuikenkoppels en 72% (betrouwbaarheidsinterval 64-79%) voor tragere groeiers. Hoewel niet statistisch significant verschillend, was dit wel een opvallende bevinding aangezien regulier gehouden vleeskuikens eerder werden geslacht, op een leeftijd van 37-43 dagen, terwijl tragere groeiers gemiddeld een week ouder waren bij slacht, op een leeftijd van 45-56 dagen. Leeftijd is een belangrijke risicofactor voor kolonisatie van vleeskuikens met *Campylobacter* (EFSA 2010); iedere extra dag brengt een aanvullend risico met zich mee op introductie van *Campylobacter* in een koppel.

Men zou dus verwachten dat bij tragere groeiers een hogere incidentie van *Campylobacter* positieve koppels bij slacht zou worden gezien in vergelijking met reguliere vleeskuikens. Dat dit niet het geval is suggereert dus dat er een verschil bestaat tussen tragere groeiers en regulier gehouden vleeskuikens voor wat betreft kolonisatie met *Campylobacter*. Meerdere factoren kunnen hierbij een rol spelen, zoals bijvoorbeeld verschillen in management, voer, of in immuniteit, waardoor tragere groeiers in vergelijking met reguliere vleeskuikens minder gevoelig zijn voor kolonisatie, minder vaak in contact komen met *Campylobacter*, of op latere leeftijd worden gekoloniseerd. Meer inzicht in dergelijke factoren kan aanknopingspunten bieden om het aantal *Campylobacter* positieve koppels vleeskuikens te verlagen.

In de literatuur wordt bevestigd dat er verschillen bestaan tussen kippenlijnen in de gevoeligheid voor kolonisatie met *Campylobacter* (Stern, Meinersmann et al. 1990, Li, Swaggerty et al. 2008, Li, Swaggerty et al. 2010, Williams, Sait et al. 2013, Swaggerty, Pevzner et al. 2017). Eén van de mogelijke factoren die daarbij een rol kunnen spelen is

maternale immuniteit. Onder praktijkomstandigheden treedt kolonisatie met *Campylobacter* bij vleeskuikens pas op vanaf de tweede levensweek. Aangetoond is dat er een relatie bestaat met de duur van de aanwezigheid van maternale antilichamen (antilichamen die door het moederdier via het ei worden doorgegeven aan het kuiken en die zorgen voor bescherming van het kuiken in de eerste dagen na uitkomst) (Sahin, Zhang et al. 2001, Sahin, Luo et al. 2003, Cawthraw and Newell 2010).

Door Hamal et al (2006) is gekeken naar twee lijnen vleeskuikenvermeerderingsdieren (Line 1 en line 2, niet verder gespecificeerd) voor wat betreft de verschillende klassen van antilichamen (IgY, IgM en IgA) na vaccinatie tegen Gumboro (Infectieuze bursitis, IBV) en Newcastle Disease. De hoeveelheid antilichamen werd vastgesteld in het serum van hennen, in de eieren en in de kuikens in de eerste periode na uitkomst. Hoewel beide groepen dieren op vergelijkbare wijze werden gehouden en gevaccineerd, was de hoeveelheid IgY in zowel serum van de hennen, eidooier als eiwit in lijn 2 ongeveer het dubbele van lijn 1, terwijl de overdracht van IgY van het serum van de hen naar dat van het kuiken voor beide lijnen rond de 30% lag (Hamal, Burgess et al. 2006).

Ook voor *Campylobacter* is aangetoond dat kippenrassen kunnen verschillen in hun maternale immuniteit tegen *Campylobacter*. Leghennen (Witte Leghorn) verschillen hierin van vleeskuikens (Ross)(Sahin, Zhang et al. 2001, Hamal, Burgess et al. 2006, Cawthraw and Newell 2010), maar voor zover ons bekend ontbreken gegevens over maternale antilichamen tegen *Campylobacter* bij verschillende vleeskuikenlijnen. Dit werd bevestigd in persoonlijke communicatie met vleeskuiken fokbedrijven.

In deze studie is onderzocht is of er verschillen bestaan in de hoeveelheid maternale antilichamen in eieren tussen twee types vleeskuikens, namelijk tussen reguliere en trager groeiende merken). Gekozen is voor de vijf merken die op het moment van dit onderzoek het meest worden gebruikt in de Nederlandse vleeskuikenhouderij; RG1 en RG2 zijn de meest voorkomende snelgroeiende merken, en SG1, SG2 en SG3 de meest gebruikte trager groeiende merken.

Om een goede vergelijking te kunnen maken zijn maandelijks eieren onderzocht van vier tot zes koppels vermeerderingsdieren van genoemde vleeskuikenlijnen gedurende een periode van 16 weken.

1.1 Informatie over de sector

Bij de productie van kip is een keten van ondernemingen betrokken, waarbij iedere schakel zijn eigen gespecialiseerde rol heeft. Kort samengevat begint de keten bij de fokkerijorganisaties die nieuwe of verbeterde pluimveerassen ontwikkelen. Zij verkopen grootouder- of ouderdieren. Bij de fok- en vermeerderingsbedrijven worden de hennen en hanen gehouden die door de fokkerijorganisaties zijn geleverd. De jonge hennen en hanen verblijven vanaf hun geboorte totdat ze achttien tot twintig weken oud zijn op opfokbedrijven. Hennen gaan rond 23-24 weken leeftijd eieren leggen, enkele weken na overplaatsen. De eieren die door de hennen worden gelegd zijn bevrucht en worden broedeieren genoemd. Deze gaan naar broederijen voor het uitbroeden van deze eieren. Vervolgens worden de kuikens aan vleeskuikenbedrijven geleverd. Daar groeien ze gedurende 6 tot 10 weken op, totdat ze worden geslacht (<http://www.kipinederland.nl>).

1.2 Informatie over maternale antilichamen

Jonge kuikens worden in de eerste periode na uitkomst beschermd tegen pathogene micro-organismen via antilichamen die ze van het moederdier via het ei hebben meegekregen. Deze zogenoemde maternale antilichamen bestaan uit drie verschillende klassen; immunoglobuline G (IgG), bij pluimvee IgY genoemd, IgA en IgM. De hoeveelheden IgA en IgM zijn beduidend lager dan die van IgY en worden daarom van minder belang geacht (Rose, Orlans et al. 1974, Kowalczyk, Daiss et al. 1985). IgY wordt voornamelijk gevonden in de eidooier, terwijl IgA en IgM in het eiwit zitten (Rose, Orlans et al. 1974). Bij kippen vindt eerst overdracht plaats van IgY vanuit het bloed van de hen naar de eidooier en vervolgens vanuit de dooierzak naar de bloedcirculatie tijdens de ontwikkeling van het kuiken (Kowalczyk, Daiss et al. 1985). Aangetoond is dat de hoeveelheid IgY in de dooier evenredig is aan de hoeveelheid IgY in het serum van het moederdier (Hamal, Burgess et al. 2006). IgA en IgM komen in veel lagere hoeveelheden voor, en voornamelijk in het eiwit. In plaats van overdracht naar de bloedcirculatie van het embryo worden deze via het eiwit door het kuiken opgenomen in het maagdarmkanaal (Rose, Orlans et al. 1974, Kaspers, Bondl et al. 1996). De maternale antilichaamspiegels bij het kuiken zijn het hoogst op dag 3-4 na uitkomst. Daarna nemen ze geleidelijk af en na 2-3 weken leeftijd zijn ze niet meer terug te vinden in het bloed (Kramer and Cho 1970, Kowalczyk, Daiss et al. 1985). Omdat in de eerste periode na uitkomst uit het ei het immuunsysteem van kuikens nog niet volledig is ontwikkeld zijn de maternale antilichamen een belangrijk onderdeel van de specifieke afweer. In de eerste levensweek zijn IgY maternale antilichamen in staat om zich vanuit de circulatie naar de darmwand te verplaatsen en lokaal de darmmucosa bescherming te bieden tegen kolonisatie van infectieuze micro-organismen (Shawky, Saif et al. 1994, Smith, Wallach et al. 1994, Hassan and Curtiss 1996, Methner and Steinbach 1997, Hornok, Bitay et al. 1998).

Een opvallende bevinding van *Campylobacter* kolonisatie bij kippen is dat kuikens in de eerste twee-drie weken na opzet vrijwel nooit gekoloniseerd worden met *Campylobacter*. Onderzoeken naar maternale immuniteit en *Campylobacter* hebben aangetoond dat er een positief verband is tussen de hoeveelheid maternale antilichamen en de natuurlijke weerstand van jonge kuikens tegen kolonisatie met *Campylobacter* (Sahin, Zhang et al. 2001, Sahin, Luo et al. 2003, Cawthraw and Newell 2010).

2 Opzet van het onderzoek

2.1 Verzamelen van eieren

Eieren van vleeskuikenmoederdieren zijn verzameld door Probroed. Iedere 5 tot 6 weken werden eieren ingestuurd van een vijftal koppels van vijf verschillende merken kippen voor het bepalen van de concentratie maternale antilichamen in de eierdooier. De studieperiode liep van september 2017 tot en met januari 2018, waarin viermaal bemonsteringen hebben plaatsgevonden van hennen op diverse leeftijden. Gekozen is voor de vijf merken die ten tijde van de studie het meest werden gebruikt in de Nederlandse vleeskuikenhouderij. Deze bestonden uit twee merken reguliere vleeskuikens (RG1 en RG2), en drie trager groeiende vleeskuikens (SG1, SG2 en SG3). Het streven was om per merk vijf koppels te onderzoeken. Dit is niet voor alle merken en alle meetmomenten gelukt, omdat er ten tijde van de monsternamedagen niet altijd voldoende koppels beschikbaar waren. Bijlage 1 geeft een overzicht van de bemonsterde koppels per monsternamemoment en per merk.

Van ieder koppel werden per monstername 8 eieren onderzocht. De legperiode van de moederdieren loopt tot een leeftijd van 60-65 weken, afhankelijk van het merk. Besloten is om niet voor ieder koppel te wachten tot de start van een nieuwe legronde, maar vanaf september 2017 op vaste tijdstippen eieren te verzamelen van moederdierkoppels die op dat moment beschikbaar waren. Dit betekent dat bij de start van de studie een aantal koppels zich al een aantal weken in de legperiode bevonden. Dezelfde koppels werden zoveel mogelijk bij volgende tijdstippen bemonsterd om ze in de tijd te kunnen volgen. Wanneer het volgende meetmoment na het einde van de legperiode van een koppel plaatsvond, werd een nieuw koppel bemonsterd en verder vervolgd in de tijd. Helaas was het om praktische en logistieke redenen niet mogelijk om de *Campylobacter* status van de koppels te monitoren tijdens de onderzoeksperiode. Bekend is dat vrijwel alle koppels leghennen bij slacht *Campylobacter* positief zijn (gegevens NEPLUVI). Gezien de lange duur van de legperiode en de hoge prevalentie van *Campylobacter* bij pluimvee, werd daarom aangenomen dat alle bemonsterde koppels vleeskuikenmoederdieren tijdens hun legperiode minimaal eenmaal in contact waren gekomen met *Campylobacter* en daarbij antilichamen zouden produceren, hoewel we niet weten wanneer dit contact met *Campylobacter* heeft plaatsgevonden.

In Tabel 1 is een overzicht gegeven van het aantal bemonsterde koppels per vleeskuikenmerk. Tabel 2 geeft de identificatienummers van de koppels weer en het aantal bemonsteringen tijdens de onderzoeksperiode.

Tabel 1. Aantal bemonsterde koppels vleeskuikenmoederdieren verdeeld over de genetische lijnen met informatie over de leeftijd ten tijde van de bemonstering.

Merk	Totaal aantal bemonsterde koppels	Aantal onderzochte Koppels	Aantal koppels met meer dan 1 meetpunt	Minimale leeftijd (weken)	Maximale leeftijd (weken)
RG-1	8	6	1	28	59
RG-2	13	5	4	31	60
SG-1	12	7	2	28	66
SG-2	14	5	3	29	55
SG-3	11	4	3	29	57

Tabel 2. Identificatienummers van de bemonsterde koppels van de vijf onderzochte vleeskuikenlijnen.

Merk	RG-1	RG-2	SG-1	SG-2	SG-3
Koppelnr (aantal malen bemonsterd)	RG-1.1 (1x)	RG-2.1 (4x)	SG-1.1 (1x)	SG-2.1 (4x)	SG-3.1 (1x)
	RG-1.2 (1x)	RG-2.2 (4x)	SG-1.2 (1x)	SG-2.2 (4x)	SG-3.2 (4x)
	RG-1.3 (1x)	RG-2.3 (2x)	SG-1.3 (1x)	SG-2.3 (4x)	SG-3.3 (4x)
	RG-1.4 (1x)	RG-2.4 (1x)	SG-1.4 (3x)	SG-2.4 (1x)	SG-3.4 (2x)
	RG-1.5 (3x)	RG-2.5 (2x)	SG-1.5 (4x)	SG-2.5 (1x)	
	RG-1.6 (1x)		SG-1.6 (1x)		
			SG-1.9 (1x)		

2.2 ELISA

Vorbereiding

Eidooier en eiwit werden manueel gescheiden, de dooier werd gewassen met water totdat alle eiwit was verwijderd en vervolgens in 40 ml PBS gemengd gedurende 1 uur bij kamertemperatuur. Na een overnacht incubatie bij 4°C werden de suspensies afgedraaid bij 1500g gedurende 30 minuten. Supernatant werd gebruikt voor de ELISA-testen. Alle eieren werden individueel getest.

Antigeenproductie

Voor het maken van antigeen is gebruik gemaakt van vier *Campylobacter* stammen. Deze stammen zijn geselecteerd uit een internationale referentie-set (CNET). Daarbij is gekozen voor de meest voorkomende MLST types bij pluimvee (<http://pubmlst.org/Campylobacter>). De volgende referentiestammen zijn gebruikt; CNET 083 (MLST type 53), CNET 091 (MLST type 45), CNET 093 (MLST type 21) en CNET 096 (MLST type 50).

Buitenmembraaneiwwitten werden bereid uit *C. jejuni* met behulp van het ionische detergens N-lauroyl sarcosine zoals eerder beschreven (Filip, Fletcher et al. 1973). In het kort, cellen werden geogst, tweemaal gewassen en vervolgens gesuspenderd in 0,05M Tris-HCl pH 7,5 om een optische dichtheid bij 540 nm van 1,0 te geven. De cellen werden vervolgens gesoniceerd bij 4°C gedurende 4 x 30 seconden bij 10, AA (Vibracell-sonicator; Sonics and Materials, Danbury, Connecticut). Resterend celmateriaal werd verwijderd door centrifugeren bij 5000g gedurende 20 minuten. Vervolgens werd de totale membranenfractie teruggewonnen door centrifugatie bij 100.000-g gedurende 2 uur bij 4°C. De pellet met membraanmateriaal werd opnieuw gesuspenderd in 1% (w/v) N-lauroyl sarcosine in 7 mM EDTA met pH 7,6 bij 37°C gedurende 20 minuten, in een eiwit: wasmiddelverhouding van 1:4. De membranen werden gewonnen door centrifugeren zoals hierboven en het extractieproces werd nog eenmaal herhaald. Het onoplosbare buitenmembraan werd gewonnen, driemaal gewassen in 0,05M Tris-HCl, pH 7,5, en opnieuw gesuspenderd in gedestilleerd water.

Isotype specifieke *Campylobacter* ELISA

IgY concentraties antistoffen in eieren werden gemeten met een in-house ELISA, gebaseerd op een procedure beschreven door Cawthraw (Cawthraw, Ayling et al. 1994, Cawthraw and Newell 2010).

Platen (High Binding, Greiner 655092) werden gecoat met outer membrane proteins (OMPs) (2µg/ml), uit een pool van de vier genoemde *Campylobacter* stammen in 0,05M carbonaat pH 9,6 buffer overnacht bij 4°C. Na 3 keer wassen werden de platen geblokt met 1% (m/v) BSA Sigma A7906 in ELISA buffer + 0,05% Tween-80 gedurende 1 uur. Na wassen werden de te onderzoeken eigeel monsters in de ELISA getest. Het eigeel is op twee manieren ingezet in de ELISA; in een verdunning van het eigeel van 1:150 (OD150) en van 1:300 (OD300) in ELISA buffer + 0,05% Tween 80 gedurende 1 uur bij 37°C. Voor de resultaten bleek dit nauwelijks iets uit te maken, daarom worden in dit verslag alleen de resultaten van OD:150 besproken.

Interne controles bestonden uit een negatief monster eigeel afkomstig van een *Campylobacter* negatief SPF koppel (SPF-WL31 (2017-01) no 10 van de GD, Deventer) en positieve monsters bestaande uit serum (met goedkeuring van de IvD afkomstig uit een experimentele infectieproef met *Campylobacter*, dierproefnummer 2017.D-0053.001, aanmeldcode AVD4010020172784) en eigeel van een *Campylobacter* positief koppel leghennen (*Campylobacter* status vastgesteld d.m.v. kweek). Deze interne controles zijn meegenomen in iedere ELISA test.

Monoclonale antilichamen (Mab) gericht tegen IgY (CVI-ChIgG-47,3) werden gebruikt in ELISA-buffer + Tween-80 0,05% + 5% (v/v) FCS (BDC-5402 07-12-09 MT). Na wassen werden de isotype monoclonale antistoffen (1mg/ml) in een verdunning 1:1000 gedurende 1 uur bij 37°C geïncubeerd. Na wassen werden de gebonden Mab anti chicken isotypes gedetecteerd met Rabbit anti muis HRPO (P260) in ELISA-buffer + tween-80 0,05% + 5% (v/v) FCS gedurende 1 uur bij 37°C. Na wassen werden de reacties zichtbaar gemaakt met TMB One component HRP Microwell substraat No TMBW-1000-01 gedurende 10 minuten, gestopt met 0.5 MH₂SO₄ en gemeten bij 550 nm.

2.3 Statistische analyse

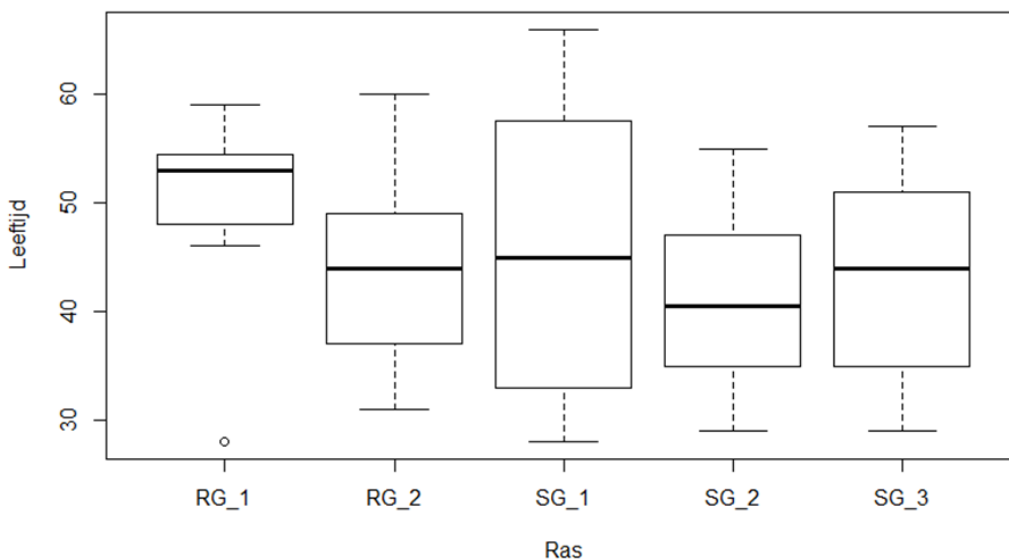
Van niet alle koppels waren gegevens van meerdere meetmomenten beschikbaar: van 14 koppels waren slechts gegevens van één meetmoment beschikbaar, van 13 koppels waren gegevens van twee of meer meetmomenten (Tabel 2). Voor de koppels met een éénmalige meting is het onmogelijk om iets te zeggen over het verloop van de OD waarde in de tijd voor die specifieke koppels. Alleen door alle meetmomenten samen te voegen, bv in een regressie analyse, ontstaat er een beeld. Eerst is er een univariate regressie analyse gedaan van alle variabelen afzonderlijk: Merk, Koppel, Leeftijd, Testdag en Concept (Trager groeiend of Regulier). Vervolgens zijn deze variabelen gecombineerd in een multivariaat model, en is op basis van statistische testen bepaald welke variabelen wel of niet een significante invloed hebben op de OD waarde. Hierbij zijn twee methodes gebruikt: lineaire regressie en mixed models. Lineaire regressie houdt geen rekening met clustering in de data, bij mixed models wordt hier wel rekening mee gehouden. Met clustering wordt bedoeld dat waarnemingen bij elkaar horen, zoals meerdere metingen van één koppel. Echter, bij deze data zijn er 13 koppels met meerdere waarnemingen, maar ook 14 koppels met één waarneming. Besloten is om daarom beide methoden toe te passen en de resultaten te vergelijken. Er is in de analyse rekening gehouden met een eventueel effect van testdag.

3 Resultaten

3.1 Leeftijd

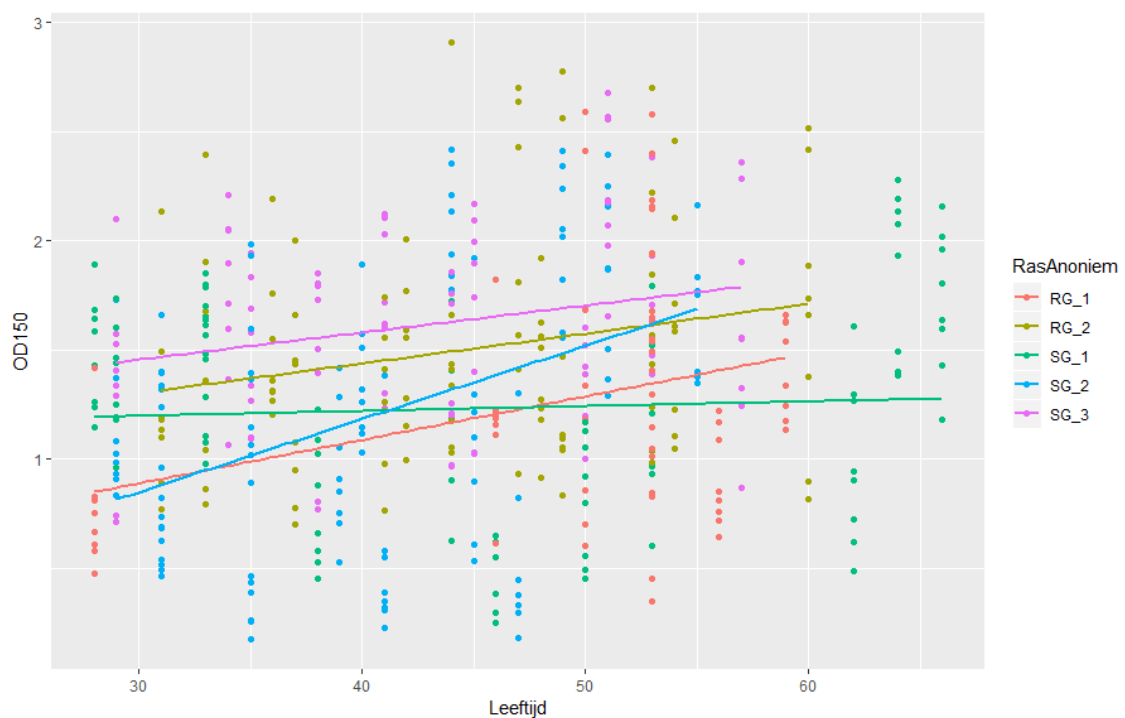
In totaal zijn 27 individuele koppels onderzocht, waarvan een aantal koppels meerdere malen in de tijd zijn bemonsterd. Per koppel zijn in eigeel (verdunding 1:150) van acht afzonderlijke eieren IgY antilichamen tegen *Campylobacter* OMP bepaald in een ELISA. Dit betekent dat in totaal 464 eieren zijn onderzocht.

Figuur 1 geeft in een grafische weergave een overzicht van de leeftijden waarop eieren van de diverse merken kippen zijn verzameld. Daaruit blijkt dat de leeftijden van de dieren ten tijde van bemonstering, variërend van 27 tot 69 weken, niet gelijk zijn verdeeld over de vijf vleeskuikenmerken. De dieren in groep RG1 waren gemiddeld het oudste, terwijl SG1 de grootste variatie in leeftijd had.

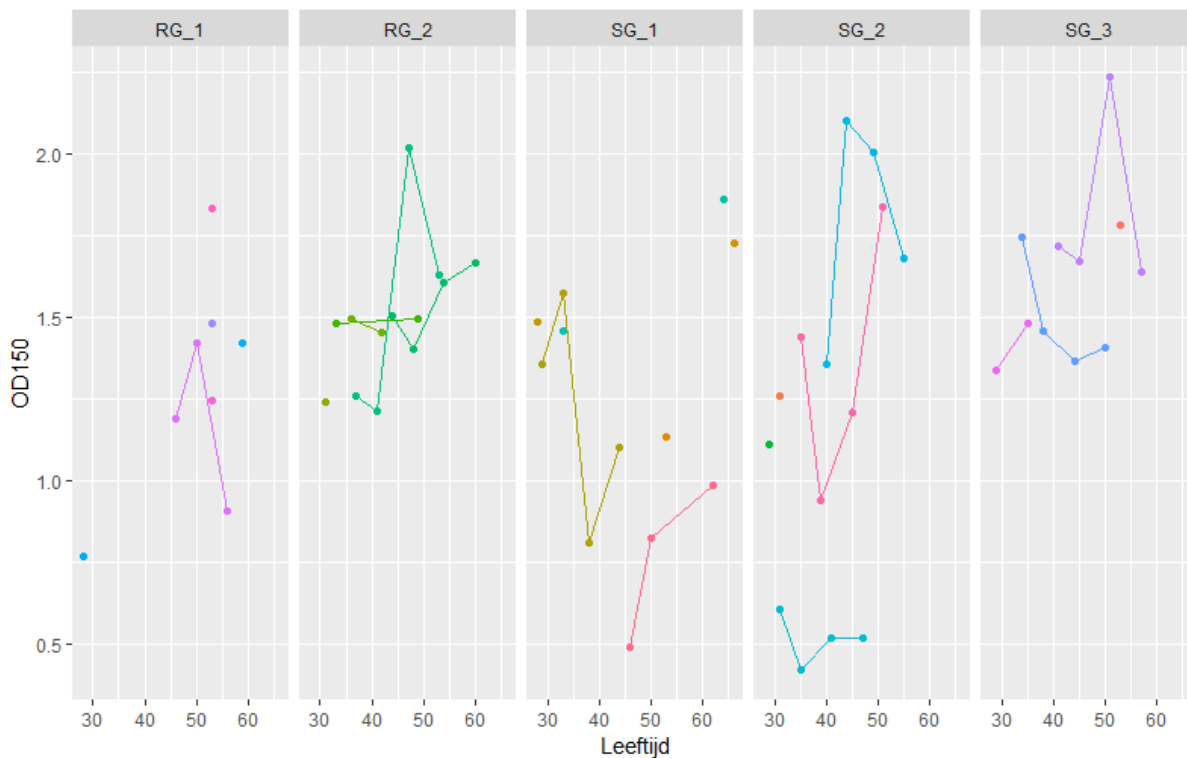


Figuur 1. De verdeling in de vorm van boxplots van de leeftijd waarop eieren zijn bemonsterd afkomstig van vijf verschillende vleeskuikenmerken. RG = regulier vleeskuikenmerk, SG = trager groeiend vleeskuikenmerk. In de boxplot geeft de dikke zwarte lijn de mediaan (middelste waarneming) aan, in de box zitten 50% van de waarnemingen, de whiskers zijn maximaal 1.5 keer de lengte van de box, tenzij het maximale of minimale punt dichtbij ligt dan 1.5 de boxlengte: dan stopt de whisker daar. Waarden buiten de whiskers worden als losse cirkels weergegeven

Wat interessant is, is om te kijken naar het verloop van OD-waardes (als maat voor de antilichaamspiegel tegen *Campylobacter*) tijdens de legperiode van de vleeskuikenmoederdieren. Immers hoe ouder de dieren, hoe vaker ze waarschijnlijk in contact zijn gekomen met *Campylobacter*. Als gevolg van meerdere blootstellingen zou te verwachten zijn dat de hoeveelheid antilichamen in de tijd toeneemt. In Figuur 2 zijn de OD waarden uitgezet tegen de leeftijd en is per merk een trendlijn aangegeven. Hierin is te zien dat de OD-waarden over het geheel genomen weliswaar toenemen met de leeftijd van de koppels, echter het effect van toename door leeftijd is niet statistisch significant. Wanneer we naar de individuele koppels kijken (Figuur 3) is te zien dat er een enorme variatie bestaat tussen de koppels. In Figuur 3 zijn voor de overzichtelijkheid alleen de gemiddelden van de 8 eieren weergegeven.



Figuur 2. Hoeveelheid IgY antilichamen tegen Campylobacter in eieren van diverse vleeskuikenmerken op verschillende leeftijden (in weken), weergegeven als OD waarde in een ELISA uitgevoerd op een 1:150 verdunning van het eigeel. Eieren zijn verzameld van 4-6 koppels per vleeskuikenmerk (8 eieren per koppel), per monsternamemoment kunnen de koppels verschillen. Iedere stip geeft een unieke OD-waarde weer (in de meeste gevallen betreft dit ook individuele eieren, maar wanneer meerdere eieren eenzelfde OD waarde hebben wordt dit als één stip weergegeven). Tevens zijn per vleeskuikenmerk de trendlijnen weergegeven. RG = regulier vleeskuikenmerk, SG = langzamer groeiend vleeskuikenmerk.



Figuur 3. Verloop van de gemiddelde OD-waardes van een ELISA uitgevoerd op een 1:150 verdunning van het eigeel, als maat voor de IgY-spiegels tegen Campylobacter, in eieren van vijf verschillende vleeskuikenmerken op verschillende leeftijden (in weken). Eieren zijn verzameld van 4-7 koppels per vleeskuikenlijn, in verband met de overzichtelijkheid is per koppel is het gemiddelde van 8 eieren weergegeven. Ieder koppel is aangeduid met een unieke kleur. Wanneer eenzelfde koppel meermalen is bemonsterd, is het verloop van de OD-waardes met een lijn aangegeven.

3.2 Vleeskuikenmerken en koppels

Wanneer in de individuele koppels wordt gekeken naar het verloop van de gemeten OD-waardes, dan blijkt het verloop van de waarden onvoorspelbaar te zijn (Figuur 3). Binnen één en hetzelfde koppel zijn grote schommelingen te zien tussen de maandelijkse meetmomenten, waarbij zowel sterke toenames als afnames worden gezien op twee opeenvolgende maandelijkse metingen. Dit geldt voor alle merken.

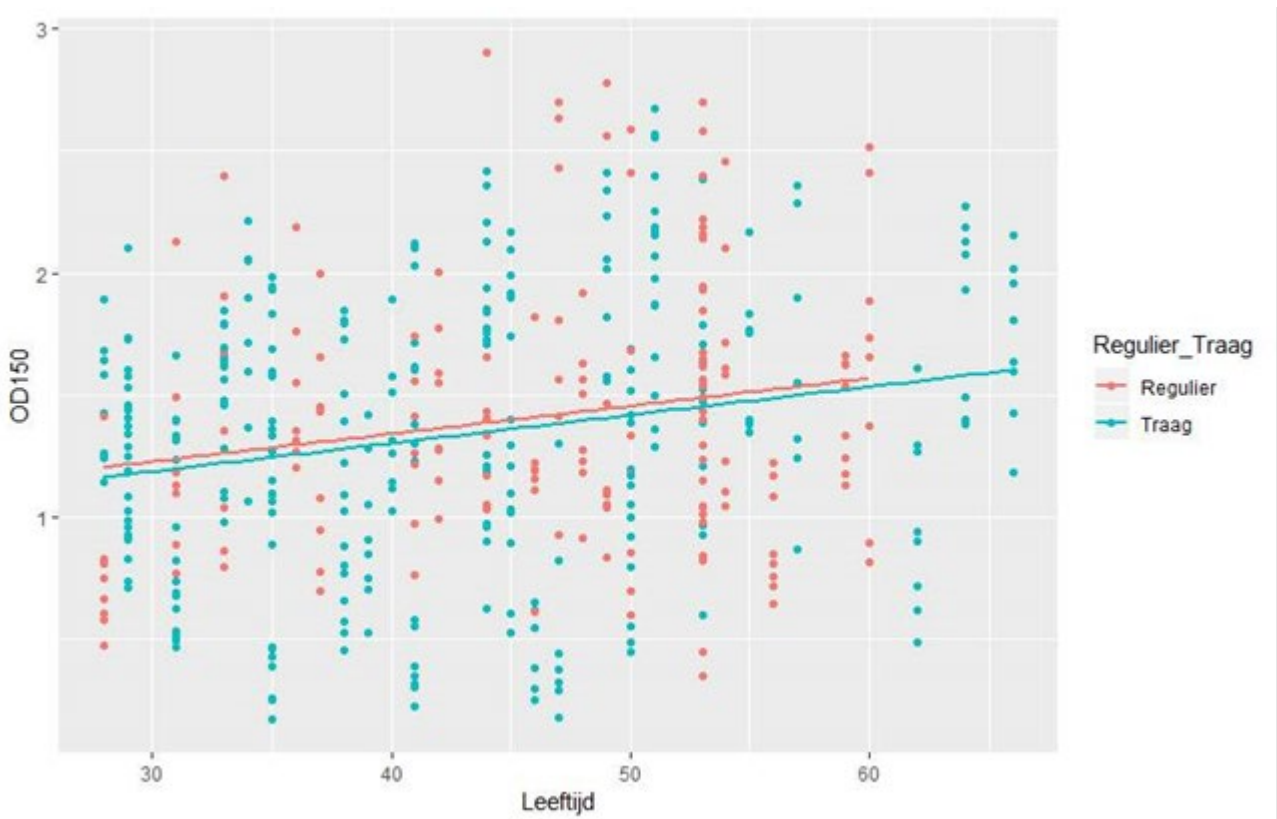
Wat verder opvalt is dat van koppel SG-2.3 alle vier meetmomenten een lage OD-waarde hebben, met als gevolg een zeer laag gemiddelde OD-waarde (0.51). Dit suggereert dat dit koppel geen *Campylobacter*-infectie heeft doorgemaakt.

Om te zien welke factoren van invloed waren op de OD-waarde, is een aantal statistische analyses uitgevoerd. In een univariate regressie analyse zijn de volgende variabelen getest: Leeftijd, Merk, Koppel en Testdag. Individueel hadden alle variabelen een significante invloed op de OD-waarde van de ELISA-test (als maat voor de hoogte van de maternale antilichamen), ze hadden allemaal een p waarde <0.001 . Echter, de variabelen beïnvloeden elkaar onderling en daarom dient er een model worden gebruikt waarin het effect van deze variabelen op de OD-waarde gelijktijdig wordt beoordeeld. Er is gestart met een lineair regressiemodel waarin alle variabelen aanwezig waren (zgn full model), in dit model bleken Merk, Koppel en Testdag significant en Leeftijd niet. Er zijn verschillende modellen vergeleken door steeds verschillende combinaties van de variabelen te gebruiken, in het beste model bleven de variabelen: Koppel, Leeftijd, Testdag en de interactie tussen Koppel en Leeftijd over. Het effect van Leeftijd op zichzelf is in dit model niet significant, maar de interactie tussen Leeftijd en Koppel is dit wel ($p < 0.001$). Dit betekent dat het effect van Leeftijd op de OD verschillend per koppel is. Dat is terug te zien in Figuur 3 waar de OD bij het ene koppel stijgt en bij het andere koppel daalt met het toenemen van de leeftijd. Het beeld was waarschijnlijk minder variabel geweest indien van meer koppels meerdere waarnemingen beschikbaar zouden zijn.

Uit zowel het lineair regressiemodel als uit mixed models (waarbij voor Koppels gebruik werd gemaakt van een random slope) blijkt het effect van Merk blijkt niet significant. Dit komt doordat er binnen de merken veel variatie aanwezig is tussen de verschillende koppels.

3.3 Tragere groeiers versus reguliere vleeskuikens

Als de merken worden ingedeeld in twee groepen: "Regulier" en "Trager groeiend" dan wordt er zowel in de univariate als in de multivariate lineaire regressie analyse geen verschil gevonden tussen deze beide groepen. Dit is ook duidelijk zichtbaar in Figuur 4.



Figuur 4. Hoeveelheid IgY antilichamen tegen Campylobacter in eieren van reguliere vleeskuikens (gemeten in twee merken) en tragere groeiers (drie merken) op verschillende weken leeftijd, weergegeven als OD waarde in een ELISA uitgevoerd op een 1:150 verdunning van het eigeel. Eieren (8 eieren per koppel) zijn verzameld van 11 koppels regulier (5 RG1 en 6 RG2) en 16 koppels trager groeiende vleeskuikens (7 SG1, 5 SG2 en 4 SG3). Iedere stip geeft een unieke OD-waarde weer (in de meeste gevallen betreft dit ook individuele eieren, maar wanneer meerdere eieren eenzelfde OD waarde hebben wordt dit als één stip weergegeven). Tevens zijn per groep de trendlijnen weergegeven.

4 Discussie en conclusies

In deze studie zijn eieren van vijf verschillende vleeskuikenmerken onderzocht op aanwezigheid van maternale antilichamen gericht tegen *Campylobacter*; twee merken reguliere vleeskuikens (RG1 en RG2) en drie merken trager groeiende vleeskuikens (SG1-SG3). Per vleeskuikenmerk zijn eieren verzameld van 4-7 afzonderlijke koppels vermeerderingsdieren (zie Tabel 1 voor details). Per koppel zijn steeds acht eieren getest in een *Campylobacter* IgY ELISA. Zoals duidelijk zichtbaar is in Figuur 4 werd daarbij geen significant verschil aangetoond in gemiddelde OD waardes tussen de groep reguliere vleeskuikenmerken en de groep trager groeiende vleeskuikenmerken.

Wat echter opviel was de grote variatie in de gemeten OD-waardes, zowel binnen als tussen de koppels. Hoewel 'overall' de gemiddelde OD-waardes toenamen met de leeftijd van de dieren, waren binnen individuele koppels forse schommelingen aanwezig, zoals te zien in Figuur 3. Hierdoor is het effect van toename door leeftijd niet statistisch significant. Een (sterke) toename in OD-waarde kan een weerspiegeling zijn van (her)infectie van het moederdier met *Campylobacter*. De resultaten in onze studie lieten, behalve toenames, ook forse dalingen zien in de gemiddelden van de opeenvolgende (maandelijke) meetmomenten. Deze toenames en afnames in de gemiddelden per koppel waren significant ($p < 0.001$), ondanks dat er behoorlijke verschillen waren tussen de 8 eieren van hetzelfde meetmoment. Dit betekent dat er wel degelijk echte stijgingen en dalingen zijn gemeten ondanks de 'ruis' van de verschillen tussen de 8 eieren. Een mogelijke verklaring voor deze stijgingen en dalingen is dat de overdracht van antilichamen van moederdier naar ei geen gelijkmatig proces is, maar kan variëren in de tijd. Ook zou een afname van antilichamen tegen *Campylobacter* in eieren het gevolg kunnen zijn van intensief 'verbruik' van *Campylobacter* antilichamen door de hen, wat wordt weerspiegeld in de overdracht van IgY naar het ei. Tenslotte kan niet worden uitgesloten dat, hoewel in een *Campylobacter* positieve koppel vrijwel alle dieren worden gekoloniseerd met consequent hoge aantallen *Campylobacter* in de caeca, er individuele verschillen bestaan tussen dieren in hun serologische respons op *Campylobacter* en daarmee in de overdracht van antilichamen naar het ei.

Een vergelijkbaar beeld van het verloop van IgY tegen *Campylobacter* is terug te vinden in een onderzoek van Thibodeau et al. (2017), zie naaststaande figuur. Zij onderzochten de hoeveelheid IgY in eieren, nadat leghennen werden blootgesteld aan *Campylobacter* of diens antigenen, met als doel IgY uit eieren te gebruiken als voederadditief om kolonisatie met *Campylobacter* te voorkomen (Thibodeau, Fravallo et al. 2017). Er wordt door de auteur(s) in hun artikel geen aandacht besteed aan de gevonden variatie van de hoeveelheid

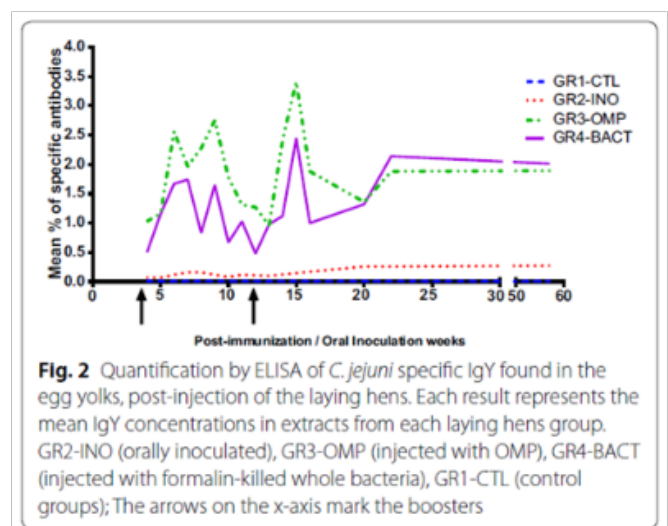


Fig. 2 Quantification by ELISA of *C. jejuni* specific IgY found in the egg yolks, post-injection of the laying hens. Each result represents the mean IgY concentrations in extracts from each laying hens group. GR2-INO (orally inoculated), GR3-OMP (injected with OMP), GR4-BACT (injected with formalin-killed whole bacteria), GR1-CTL (control groups); The arrows on the x-axis mark the boosters

Uit: Thibodeau et al., Acta Vet Scand (2017)

IgY in eieren in de tijd, anders dan dat toenames worden toegeschreven aan een boostereffect.

De in onze studie gevonden schommelingen in de tijd van antilichaamspiegels binnen een koppel zouden dus het gevolg kunnen zijn van de *Campylobacter* status van de koppel en mogelijke herinfecties. Als we hier meer inzicht in willen krijgen zou in een vervolgstudie een of meer koppels frequenter kunnen worden onderzocht, waarbij het ook nodig is om de *Campylobacter*-status in de tijd te registreren. In de oorspronkelijk opzet van deze studie was voorzien om gedurende één jaar maandelijks eieren te verzamelen. Echter op grond van de gevonden resultaten over een periode van vijf maanden (sep 2017-jan 2018) was duidelijk dat verdere studie zonder het registreren van de *Campylobacter* status niet zinvol was en is besloten om geen verdere bemonsteringen meer te doen.

De onderzoekshypothese was dat de verschillen in *Campylobacter* besmettingen tussen langzamer groeiende en reguliere vleeskuikens wordt veroorzaakt doordat langzamere groeiers via het ei een hogere concentratie aan maternale antilichamen meekrijgen en daardoor in de eerste levensweken gedurende een langere periode beschermd zijn tegen kolonisatie met *Campylobacter*. De conclusie is dat de gevonden resultaten deze onderzoekshypothese niet ondersteunen, maar dit werpt wel nieuwe vragen op.

Zo kan er niet worden uitgesloten dat er verschillen bestaan tussen reguliere en trager groeiende vleeskuikens in het 'verbruik' van de antilichamen in de eerste periode na uitkomst uit het ei. Aangetoond is dat de afname van de hoeveelheid maternale antilichamen tegen IBDV afhankelijk is van de groeisnelheid en lichaamsgewicht (Vaziry, Venne et al. 2007). Wanneer dit ook geldt voor *Campylobacter*, kan dit leiden tot verschillen tussen snel- en langzamer groeiende kuikens. Om hier meer over te weten te komen is onderzoek nodig naar het verloop van antilichaamspiegels van jonge kuikens. Aanvullende informatie over *Campylobacter*-antilichaamniveaus in bloedmonsters in de eerste twee levensweken van kuikens en inzicht in hoe het gehalte aan antilichamen tegen *Campylobacter* in de eerste weken na het uitkomen afneemt moet aantonen of er verschillen zijn tussen verschillende vleeskuikenlijnen en hoe dit kolonisatie van *Campylobacter* beïnvloedt.

5 Referenties

- Cawthraw, S., R. Ayling, P. Nuijten, T. Wassenaar and D. G. Newell (1994). "Isotype, specificity, and kinetics of systemic and mucosal antibodies to *Campylobacter jejuni* antigens, including flagellin, during experimental oral infections of chickens." *Avian Dis* **38**(2): 341-349.
- Cawthraw, S. A. and D. G. Newell (2010). "Investigation of the presence and protective effects of maternal antibodies against *Campylobacter jejuni* in chickens." *Avian Dis* **54**(1): 86-93.
- EFSA (2010). "Analysis of the baseline survey on the prevalence of *Campylobacter* in broiler batches and of *Campylobacter* and *Salmonella* on broiler carcasses, in the EU, 2008; part B: Analysis of factors associated with *Campylobacter* colonisation of broiler batches and with *Campylobacter* contamination of broiler carcasses; and investigation of the culture method diagnostic characteristics used to analyse broiler carcass samples. ." *The EFSA Journal* **8**(8): 1522.
- Filip, C., G. Fletcher, J. L. Wulff and C. F. Earhart (1973). "Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent sodium-lauryl sarcosinate." *J Bacteriol* **115**(3): 717-722.
- Hamal, K. R., S. C. Burgess, I. Y. Pevzner and G. F. Erf (2006). "Maternal antibody transfer from dams to their egg yolks, egg whites, and chicks in meat lines of chickens." *Poult Sci* **85**(8): 1364-1372.
- Hassan, J. O. and R. Curtiss, 3rd (1996). "Effect of vaccination of hens with an avirulent strain of *Salmonella typhimurium* on immunity of progeny challenged with wild-Type *Salmonella* strains." *Infect Immun* **64**(3): 938-944.
- Hornok, S., Z. Bitay, Z. Szell and I. Varga (1998). "Assessment of maternal immunity to *Cryptosporidium baileyi* in chickens." *Vet Parasitol* **79**(3): 203-212.
- Kaspers, B., H. Bondl and T. W. Gobel (1996). "Transfer of IgA from albumen into the yolk sac during embryonic development in the chicken." *Zentralbl Veterinarmed A* **43**(4): 225-231.
- Kowalczyk, K., J. Daiss, J. Halpern and T. F. Roth (1985). "Quantitation of maternal-fetal IgG transport in the chicken." *Immunology* **54**(4): 755-762.
- Kramer, T. T. and H. C. Cho (1970). "Transfer of immunoglobulins and antibodies in the hen's egg." *Immunology* **19**(1): 157-167.
- Li, X., C. L. Swaggerty, M. H. Kogut, H. Chiang, Y. Wang, K. J. Genovese, H. He, N. J. Stern, I. Y. Pevzner and H. Zhou (2008). "The paternal effect of *Campylobacter jejuni* colonization in ceca in broilers." *Poult Sci* **87**(9): 1742-1747.
- Li, X., C. L. Swaggerty, M. H. Kogut, H. I. Chiang, Y. Wang, K. J. Genovese, H. He and H. Zhou (2010). "Gene expression profiling of the local cecal response of genetic chicken lines that differ in their susceptibility to *Campylobacter jejuni* colonization." *PLoS One* **5**(7): e11827.
- Methner, U. and G. Steinbach (1997). "[Efficacy of maternal *Salmonella* antibodies and experimental oral infection of chicks with *Salmonella enteritidis*]." *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **110**(10): 373-377.
- Rose, M. E., E. Orlans and N. Buttress (1974). "Immunoglobulin classes in the hen's egg: their segregation in yolk and white." *Eur J Immunol* **4**(7): 521-523.
- Sahin, O., N. Luo, S. Huang and Q. Zhang (2003). "Effect of *Campylobacter*-specific maternal antibodies on *Campylobacter jejuni* colonization in young chickens." *Appl Environ Microbiol* **69**(9): 5372-5379.
- Sahin, O., Q. Zhang, J. C. Meitzler, B. S. Harr, T. Y. Morishita and R. Mohan (2001). "Prevalence, antigenic specificity, and bactericidal activity of poultry anti-*Campylobacter* maternal antibodies." *Appl Environ Microbiol* **67**(9): 3951-3957.
- Shawky, S. A., Y. M. Saif and J. McCormick (1994). "Transfer of maternal anti-rotavirus IgG to the mucosal surfaces and bile of turkey poults." *Avian Dis* **38**(3): 409-417.
- Smith, N. C., M. Wallach, C. M. Miller, R. Morgenstern, R. Braun and J. Eckert (1994). "Maternal transmission of immunity to *Eimeria maxima*: enzyme-linked immunosorbent assay analysis of protective antibodies induced by infection." *Infect Immun* **62**(4): 1348-1357.
- Stern, N. J., R. J. Meinersmann, N. A. Cox, J. S. Bailey and L. C. Blankenship (1990). "Influence of host lineage on cecal colonization by *Campylobacter jejuni* in chickens." *Avian Dis* **34**(3): 602-606.
- Swaggerty, C. L., I. Y. Pevzner, H. He, K. J. Genovese and M. H. Kogut (2017). "Selection for pro-inflammatory mediators produces chickens more resistant to *Campylobacter jejuni*." *Poult Sci* **96**(6): 1623-1627.
- Thibodeau, A., P. Fravalo, A. Perron, S. L. Lewandowski and A. Letellier (2017). "Production and characterization of anti-*Campylobacter jejuni* IgY derived from egg yolks." *Acta Vet Scand* **59**(1): 80.
- Vaziry, A., D. Venne, D. Frenette, S. Gingras and A. Silim (2007). "Prediction of optimal vaccination timing for infectious bursal disease based on chick weight." *Avian Dis* **51**(4): 918-923.
- Williams, L. K., L. C. Sait, E. K. Trantham, T. A. Cogan and T. J. Humphrey (2013). "*Campylobacter* infection has different outcomes in fast- and slow-growing broiler chickens." *Avian Dis* **57**(2): 238-241.

6 Bijlage 1. Overzicht bemonsteringen koppels vleeskuikenmoederdieren

bemonsterde koppels	koppel nr	geb. datum	leeftijd (weken)			
			bemonstering 1	bemonstering 2	bemonstering 3	bemonstering 4
Regular (RG)-1	RG-1.1	15/8/2016	59	-	-	-
	RG-1.2	18/10/2016	49	53	-	-
	RG-1.3	18/10/2016	49	53	-	-
	RG-1.4	18/10/2016	49	53	59	-
	RG-1.5	9/11/2016	46	50	56	62
	RG-1.6	3/7/2017	-	-	-	28
Regular (RG)-2	RG-2.1	23/11/2016	44	48	54	60
	RG-2.2	12/1/2017	37	41	47	53
	RG-2.3	7/2/2017	33	-	43	49
	RG-2.4	20/3/2017	28	31	37	-
	RG-2.5	27/3/2017	27	30	36	42
Slower Growing (SG)-1	SG-1.1	27/6/2016	66	-	-	-
	SG-1.2	8/7/2016	64	68	-	-
	SG-1.3	26/9/2016	53	-	62	-
	SG-1.4	8/11/2016	46	50	56	62
	SG-1.5	10/3/2017	29	33	38	44
	SG-1.6	20/4/2017	-	27	33	39
	SG-1.7	7/2/2017	-	-	43	-
	SG-1.8	6/7/2017	-	-	-	28
	SG-1.9	6/7/2017	-	-	-	28
Slower Growing (SG)-2	SG-2.1	23/12/2016	40	44	49	55
	SG-2.2	24/1/2017	35	39	45	51
	SG-2.3	22/2/2017	31	35	41	47
	SG-2.4	24/3/2017	27	31	36	42
	SG-2.5	3/4/2017	26	29	35	41
Slower Growing (SG)-3	SG-3.1	21/9/2016	53	-	-	-
	SG-3.2	14/12/2016	41	45	51	57
	SG-3.3	1/2/2017	34	38	44	50
	SG-3.4	17/5/2017	-	-	29	35

Vetgedrukt zijn de koppels waarvan de eieren in de IgY-ELISA zijn getest.