

# *Campylobacter*-monitoring op een vleeskuikenbedrijf met HyCare- en reguliere stallen

Marleen van der Most<sup>1,2</sup>, Maarten van den Berg<sup>2</sup>, Stefan Verhoeven<sup>3</sup>, Conny van Solt<sup>1</sup>, Miriam Koene<sup>1</sup>

1 Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad

2 Poultry Vets, El/Diessen/Ruurlo

3 The Schippers Group, Hapert

Dit onderzoek is uitgevoerd binnen de PPS 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' in het kader van Topsector Agri & Food (AF18112). Het betreft een publiek-private samenwerking, mede gefinancierd door de overheid (Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, projectnummer BO-63-001-026) en het pluimveebedrijfsleven. Binnen de PPS werken de kennisinstellingen Wageningen Bioveterinary Research, 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

Wageningen Bioveterinary Research  
Lelystad, 9 april 2024

---

WUR rapport nr 2410782

Marleen van der Most, Maarten van den Berg, Stefan Verhoeven, Conny van Solt, Miriam Koene 2024;  
Lelystad, Wageningen Bioveterinary Research.

Dit rapport is gratis te downloaden op <https://doi.org/10.18174/654535> of op [www.wur.nl/bioveterinary-research](http://www.wur.nl/bioveterinary-research) (onder Wageningen Bioveterinary Research publicaties).

© 2024 Wageningen Bioveterinary Research

Postbus 65, 8200 AB Lelystad, T 0320 23 82 38, E [info.bvr@wur.nl](mailto:info.bvr@wur.nl), [www.wur.nl/bioveterinary-research](http://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.

Wageningen Bioveterinary Research Report

# Samenvatting

Campylobacteriose is de meest voorkomende bacteriële voedselinfectie in Nederland en pluimvee is daarbij een belangrijke bron van besmetting. Om het aantal voedselinfecties als gevolg van *Campylobacter* te verminderen is het voorkomen van besmettingen bij vleeskuikens de meest impactvolle manier. Internationaal is de consensus dat het zo goed mogelijk in stand houden van de biosecurity de belangrijkste (en vrijwel enige) manier is voor pluimveehouders om *Campylobacter* buiten de stal te houden.

In eerder uitgevoerd onderzoek leek het toepassen van de HyCare-methode een positieve uitwerking te hebben op het behouden van een *Campylobacter* negatieve status bij koppels vleeskuikens, echter de resultaten waren gebaseerd op een beperkt aantal bemonsteringen. In 2023 is daarom vervolgonderzoek uitgevoerd op het vleeskuikenbedrijf van MS Schippers in Hapert naar het effect van het toepassen van de HyCare-methode op de *Campylobacter* status van een koppel vleeskuikens. Gedurende de periode maart-november zijn de vleeskuikenkoppels in drie van de vier op het bedrijf aanwezige stallen, waaronder de HyCare-stal, wekelijks bemonsterd om de *Campylobacter* status vast te stellen. Om meer inzicht te krijgen in eventuele aanwezigheid van bedrijfs/stalgebonden *Campylobacter* stammen (herintroductie vanuit de stal en/of directe omgeving), zijn de geïsoleerde *Campylobacter* stammen verder genetisch onderzocht d.m.v. whole genome sequencing (WGS) en Multilocus sequence typing (MLST).

In totaal is de *Campylobacter* status van de koppels in stal 1 (HyCare-stal), 3 en 5 gedurende vier opeenvolgende rondes opgevolgd. De resultaten lieten geen verschil zien in het aantal *Campylobacter* besmettingen tussen de stal volgens het HyCare principe en de twee overige (reguliere) stallen. Daarmee kunnen resultaten uit een eerdere monitoring op dit bedrijf niet worden bevestigd, waarin het aantal besmettingen in de HyCare-stal lager was in vergelijking met de niet-HyCarestal (één van de vier rondes respectievelijk vier van de vier rondes).

Zowel uit de literatuur als uit eigen onderzoek (niet gepubliceerde resultaten) is bekend dat er in een koppel, regelmatig meerdere introducties met *Campylobacter* plaatsvinden en dat zelfs in individuele dieren meerdere stammen kunnen worden gevonden. De resultaten van de genotypering op dit bedrijf lieten zien dat geen sprake is geweest van meerdere introducties van verschillende *Campylobacter* stammen gedurende een ronde. Ook waren er geen aanwijzingen voor herintroductie van een specifieke *Campylobacter* stam in verschillende (opeenvolgende) rondes van een stal dan wel in een andere stal op het bedrijf. In de bemonsteringsronde waarbij alle drie de stallen *Campylobacter* positief waren kon worden vastgesteld dat in de twee naastgelegen stallen, waaronder de Hycare stal eenzelfde *C. jejuni* stam aanwezig was, terwijl in de derde stal een ander type werd gevonden. Het is mogelijk dat verspreiding naar de HyCare-stal via ventilatie is opgetreden.

De constatering van deze studie dat zelfs op een bedrijf waar veel aandacht is voor biosecurity en waar gewerkt wordt volgens het HyCare-principe toch verschillende *Campylobacter* stammen worden gevonden bevestigt hoe gemakkelijk *Campylobacter* een pluimveestal binnen kan komen.

Geconcludeerd kan worden dat het principe van de HyCare-methode niet geheel kan voorkomen dat *Campylobacter* een stal binnenkomt en dieren koloniseert. De resultaten van deze studie wijzen er wel op dat een bedrijf waar aandacht is voor biosecurity en waar gewerkt wordt volgens het HyCare-principe, het aantal *Campylobacter* introducties kan beperken.

# Inhoud

## Inhoudsopgave

<b>Samenvatting</b>	<b>4</b>	
<b>Inhoud</b>	<b>5</b>	
<b>1</b>	<b>Inleiding</b>	<b>6</b>
	1.1 Het vleeskuikenbedrijf en de HyCare-methode	7
	1.2 Deelname monitoringsstudie 2020	8
	1.3 Aanleiding vervolgstudie	8
<b>2</b>	<b>Opzet van het onderzoek</b>	<b>10</b>
	2.1 Bemonsteringen	10
<b>3</b>	<b>Laboratoriumonderzoek</b>	<b>11</b>
	3.1 Kweek	11
	3.2 Whole Genome Sequencing (WGS)	11
<b>4</b>	<b>Resultaten</b>	<b>12</b>
	4.1 Kweek	12
	4.2 WGS	14
	4.2.1 Clustering	14
	4.2.2 MSLT types	14
<b>5</b>	<b>Discussie en conclusies</b>	<b>16</b>
<b>6</b>	<b>Literatuur</b>	<b>17</b>
<b>7</b>	<b>Bijlage bemonsteringsprotocol stallen</b>	<b>18</b>

# 1 Inleiding

*Campylobacter* is de meest voorkomende bacteriële veroorzaker van voedselinfecties in Nederland en kip is daarbij een belangrijke bron van besmetting. In de periode 2015-2023 is in de vorm van een Publieke Private Samenwerking (PPS) tussen de pluimveesector en onderzoeksinstituten van WUR<sup>1</sup> samengewerkt aan de beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector.

Wat betreft de beheersing van *Campylobacter* op vleeskuikenbedrijven is het algemene uitgangspunt dat het hanteren van een goede biosecurity (het opstellen, implementeren en naleven van (bedrijfs)specifieke bioveiligheidsmaatregelen) de belangrijkste manier is om *Campylobacter* buiten de stal te houden. Ondanks dat een dergelijke benadering aannemelijk is, blijkt het moeilijk dit standpunt wetenschappelijk te onderbouwen en belangrijker nog, om op basis van onderzoeksresultaten bioveiligheidsmaatregelen aan te wijzen die bijdragen aan het voorkomen van *Campylobacter* besmettingen op vleeskuikenbedrijven.

Het hanteren van een goede biosecurity kent natuurlijk een breder belang dan het buiten de deur houden van enkel *Campylobacter*. Algemene en met elkaar samenhangende doelstellingen van bioveiligheidsmaatregelen op veehouderijbedrijven zijn het verbeteren van de gezondheidsstatus van de dieren, het optimaliseren van de productieresultaten en het verlagen het antibioticagebruik. Een bedrijf dat met haar HyCare-programma's bedrijven probeert te faciliteren bij het behalen van de zojuist genoemde doelstellingen is MS Schippers. Dit bedrijf is niet alleen zeer actief in de pluimveesector, maar is ook eigenaar van een eigen vleeskuikenbedrijf waar de door MS Schippers ontwikkelde HyCare-methode in praktijk wordt gebracht.

Het gedachtegoed achter de HyCare methode in combinatie met de bedrijfsindeling en onderzoeksmogelijkheden van het vleeskuikenbedrijf in Hapert, waren aanleiding om binnen de PPS samen te werken met MS Schippers.

<sup>1</sup> In deze Publieke Private Samenwerking (PPS) werd de pluimveesector vertegenwoordigd door de Nederlandse Organisatie van Pluimveehouders van Land- en Tuinbouworganisatie Nederland (LTO-NOP), Nederlandse Vakbond Pluimveehouders (NVP), AVINED en de Vereniging van de Nederlandse Pluimveeverwerkende Industrie (NEPLUVI) en werd samengewerkt met onderzoeksinstituten Wageningen Bioveterinary Research (WBVR) en Wageningen Livestock Research (WLR). Daarnaast was de Faculteit Diergeneeskunde van Universiteit Utrecht en de overheid (ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport) inhoudelijk betrokken.

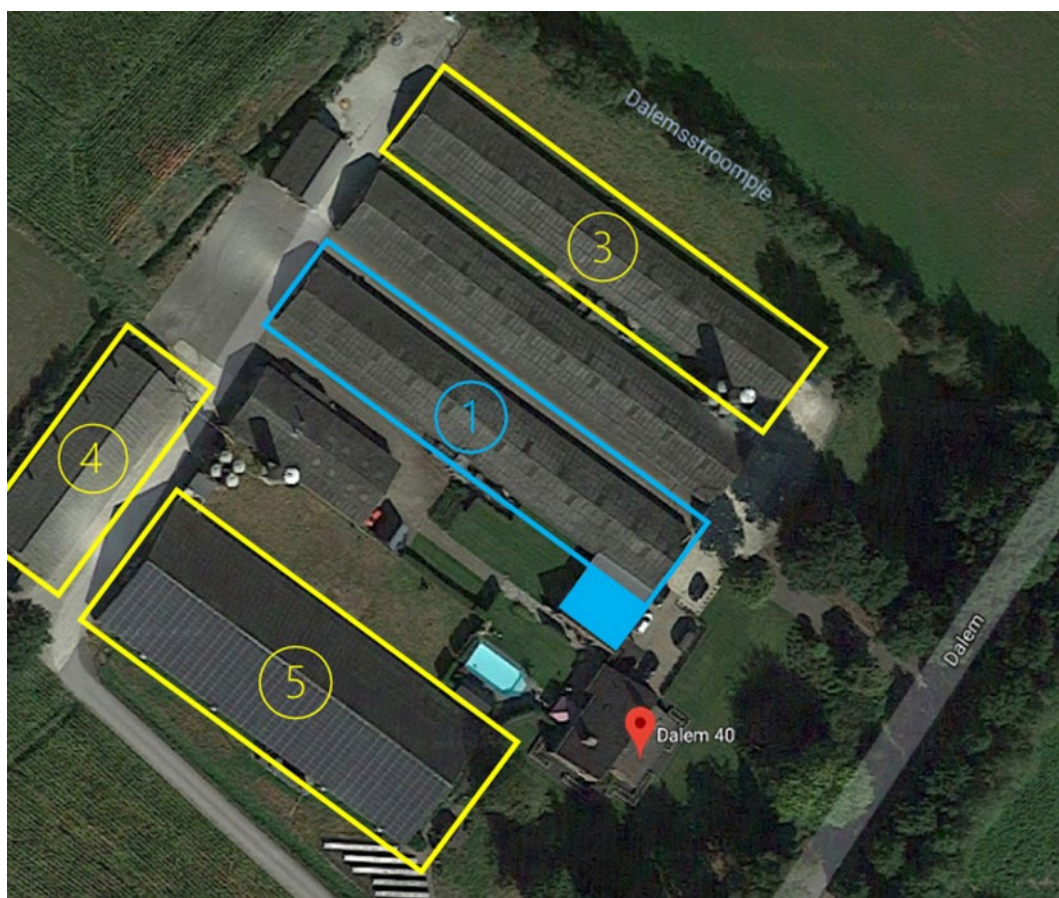
## 1.1 Het vleeskuikenbedrijf en de HyCare-methode

Op het vleeskuikenbedrijf van MS Schippers in Hapert staan vijf stallen waarvan in vier vleeskuikens gehouden worden: stal 1, 3, 4 en 5. Op het bedrijf worden tot op heden alleen reguliere vleeskuikens gehouden. Stal 1 en stal 3 zijn oorspronkelijk identiek gebouwd, maar in 2019 zijn in stal 1 de nodige aanpassingen gedaan om in deze stal kuikens te houden volgens de HyCare methode. Sindsdien fungeert stal 3 als referentiestal. Stal 2 is ingericht als experience center om bezoekers met behulp van tastbare voorbeelden te laten zien wat hygiënisch werken betekent. Foto 1 maakt de bedrijfsindeling met de locatie van de verschillende stallen zichtbaar.

De HyCare-methode is opgebouwd uit vijf pijlers: poriënvrije oppervlakten, kiemarme leefomgeving, ongedierte vrije stallen, optimale verzorging en schoon drinkwater. Ondanks dat alleen in stal 1 de volledige HyCare-methode wordt toegepast, wordt in alle stallen op het bedrijf een vergelijkbaar ('HyCare-proof') protocol gehanteerd voor reiniging en desinfectie tijdens de leegstand en ook de (preventieve) ongediertebestrijding is voor alle stallen identiek.

Op het gebied van HyCare onderscheidt stal 1 zich van stal 3 door de aanwezigheid van een coating over de vloer en de gehele wand en de structurele inzet van 'natural health promoters' (drinkwateradditieven). Tot deze wateradditieven behoren o.a. producten op basis van chloordioxide, vitamines en/of elektrolyten of organische zuren. Verder is toegang tot stal 1 alleen mogelijk via de hygiënesluis ingericht met douche en volledige kledingwissel (blauw vlak op Foto 1). De looproute op het bedrijf (voor dagelijkse ronde(s)) start in stal 1 en gaat via stal 4 en stal 5 naar stal 3. Buiten de stallen worden bedrijfseigen klompjes gedragen. Voor iedere stal, met uitzondering van stal 1, staat een schoeisel-ontsmettingsbak en in iedere stal worde een staleigen overall en staleigen laarzen gedragen.

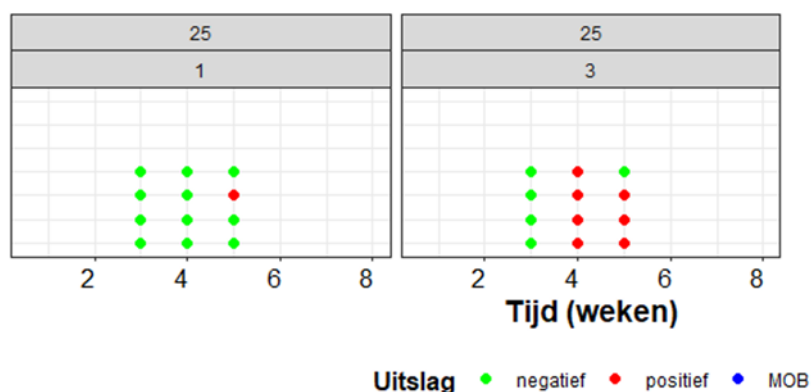
Stal 4 is ingericht om kuikens in kleine groepjes te kunnen houden (proefopstelling) en is wat betreft huisvesting (koppeldynamiek) dus niet vergelijkbaar met stal 1, 3 en 5.



## 1.2 Deelname monitoringsstudie 2020

In 2020 heeft het vleeskuikenbedrijf van MS Schippers in Hapert met twee stallen deelgenomen aan een monitoringsstudie naar de aanwezigheid van *Campylobacter* in vleeskuikenkoppels op Nederlandse vleeskuikenbedrijven (Dame-Korevaar et al., 2022). Deze studie, met een totale looptijd van bijna vier jaar, maakte onderdeel uit van de PPS 'Beheersing van *Campylobacter* in de pluimveesector' en was opgezet om de belangrijkste transmissieroutes van *Campylobacter* op Nederlandse vleeskuikenbedrijven in kaart te kunnen brengen. Dit met het doel om pluimveehouders beter te kunnen adviseren bij het nemen van maatregelen om de introductie van *Campylobacter* in vleeskuikenkoppels tegen te gaan.

In de monitoringsstudie werden op het vleeskuikenbedrijf van MS Schippers (deelnemend bedrijf nummer 25) gedurende vier opeenvolgende rondes wekelijks mestmonsters genomen (vanaf een leeftijd van  $\pm 3$  weken) in stal 1 en stal 3, in de periode van februari tot en met oktober 2020. Deze mestmonsters werden door middel van PCR onderzocht op de aanwezigheid van *Campylobacter*. De resultaten van deze PCR-analyses staan weergegeven in Figuur 1, waarbij op de horizontale as de leeftijd van de vleeskuikens staat vermeld en op de verticale as de resultaten van de vier verschillende rondes. Figuur 1 laat zien dat alle vier de koppels in stal 3 positief bevonden zijn op de aanwezigheid van *Campylobacter*, terwijl dit in stal 1 slechts één koppel betrof. Kijkend naar de leeftijd van de kuikens op het moment dat het eerste *Campylobacter* positieve mestmonster is genomen, valt op dat dit voor stal 3 voor alle vier de koppels week 4 was. Het positieve koppel in stal 1 is positief bevonden op het mestmonster genomen in week 5.



**Figuur 1** Overzicht uitslagen mestonderzoek van vleeskuikens op aanwezigheid *Campylobacter* d.m.v. PCR. Mestmonsters werden genomen op een leeftijd van 3, 4 en 5 weken gedurende vier opeenvolgende rondes.

## 1.3 Aanleiding vervolgstudie

Op basis van de resultaten van de monitoringsstudie in 2020 lijkt het toepassen van de HyCare-methode bij te dragen aan het behouden van een *Campylobacter* negatieve status bij koppels vleeskuikens. Het aantal rondes dat tijdens de monitoringsstudie is opgevolgd is echter te laag om een verschil tussen het wel of niet toepassen van de HyCare methode (stal 1 versus stal 3) statistisch aan te kunnen tonen. Verder geven de behaalde resultaten geen inzicht in de manier waarop de HyCare-methode helpt bij het behouden van een *Campylobacter* negatieve status. Een eerste optie is dat het toepassen van de HyCare-methode bijdraagt aan het voorkomen van introductie van *Campylobacter* in een koppel vleeskuikens. Hierbij kan gedacht worden aan introductie van buitenaf (maatregel: gebruik van hygiënesluis met douche en kledingwissel), maar ook aan herintroductie vanuit de stal (maatregel: de aanwezigheid van een gecoatete vloer). Een andere mogelijke verklaring is dat er wel degelijk sprake is van introductie van *Campylobacter* in de stal, maar dat de structurele inzet van drinkwateradditieven de kolonisatie van *Campylobacter* in de darmen van de vleeskuikens beïnvloedt/vertraagt. Natuurlijk kan het ook de combinatie van de verschillende pijlers van de HyCare-methode zijn, die uiteindelijk het verschil maakt.

Kijkend naar de resultaten van de monitoringsstudie in 2020 valt niet alleen op dat de koppels in de HyCare-stal duidelijk minder vaak *Campylobacter* positief testten in vergelijking met stal 3, maar ook dat in stal 3 alle vier de achtereenvolgende koppels *Campylobacter* positief waren. Dit roept de vraag op of hier sprake was van herintroductie van *Campylobacter* vanuit de stal en/of directe omgeving van de stal of dat het nieuwe introducties van buitenaf (buiten het bedrijf) betrof.

Om bovenstaande vraag te kunnen beantwoorden is het noodzakelijk de *Campylobacter* stammen aanwezig in de mestmonsters van de verschillende rondes met elkaar te vergelijken. Met andere woorden, te kijken naar de genetische diversiteit aan *Campylobacter* stammen tussen verschillende rondes. Aangezien de mestmonsters van de monitoringsstudie (2020) zijn onderzocht d.m.v. PCR, zijn er geen *Campylobacter* stammen beschikbaar (gekweekt) wat een vergelijking tussen stammen onmogelijk maakt.

Samenvattend waren het (statistisch) kunnen aantonen/bevestigen van een positief effect van het toepassen van de Hycare-methode op de *Campylobacter* status van een koppel vleeskuikens en het verkrijgen van meer inzicht in de eventuele aanwezigheid van bedrijfs/stalgebonden *Campylobacter* stammen (herintroductie vanuit de stal en/of directe omgeving), aanleiding voor een tweede monitoringsstudie op het vleeskuikenbedrijf van MS Schippers in Hapert.

#### **Voor aanvang van de studie zijn de volgende doelstellingen geformuleerd:**

1. Onderzoeken of voor het vleeskuikenbedrijf van MS Schippers het wekelijks opvolgen van de *Campylobacter* status van stal 1 en 3 gedurende minimaal 4 rondes in 2023, resultaten oplevert vergelijkbaar met de resultaten voor dit bedrijf tijdens de monitoringsstudie in 2020.  
*Met andere woorden, onderzoeken of de koppels in de HyCare-stal (stal 1) wederom vaker negatief op de aanwezigheid van Campylobacter in vergelijking met stal 3?*
2. Meer inzicht krijgen in de waarschijnlijkheid van herintroductie vanuit de stal en/of directe omgeving door het onderzoeken van de genetische diversiteit aan *Campylobacter* stammen aanwezig binnen een koppel, op het bedrijf en tussen verschillende rondes in een stal en op het bedrijf.  
*Door naast in stal 1 en 3, ook in stal 5 mestmonsters te verzamelen, de mestmonsters te onderzoeken met behulp van kweek, en Whole genome sequencing (WGS) toe te passen op de Campylobacter isolaten die worden gevonden, kan aan deze doelstelling worden voldaan.*



## 2 Opzet van het onderzoek

### Algemeen

De *Campylobacter* status van vier achtereenvolgende koppels (ronde 1 t/m 4) in stal 1, stal 3 en stal 5 werd bepaald door wekelijks mestmonsters te nemen vanaf een leeftijd van  $\pm 1$  week. Deze mestmonsters werden onderzocht op de aanwezigheid van *Campylobacter* met behulp van kweek. Hierdoor was het mogelijk om WGS toe te passen op de geïsoleerde stammen. Op deze manier kon meer inzicht worden verkregen in de genetische diversiteit aan *Campylobacter* stammen:

- Aanwezig in een koppel (stal) vleeskuikens gedurende een ronde:
  - o het verzamelen en vergelijken van meerdere *Campylobacter* stammen per positief bevonden mestmonster;
  - o het vergelijken van *Campylobacter* stammen verzameld uit verschillende (opeenvolgende) mestmonsters genomen in een stal binnen een ronde.
- Tegelijkertijd aanwezig op het bedrijf:
  - o het verzamelen en vergelijken van *Campylobacter* stammen uit meerdere stallen verzameld tijdens dezelfde ronde.
- Aanwezig in een stal gedurende vier opeenvolgende rondes.
- Aanwezig op het bedrijf gedurende vier opeenvolgende rondes.

Op basis van de bevindingen aangaande de genetische diversiteit kan het optreden van her- en multiplele introducties van specifieke *Campylobacter* stammen in verschillende koppels op het bedrijf als meer of minder waarschijnlijk worden beschouwd.

### Uitvoering

- De mestmonsters werden wekelijks op een vaste dag genomen door de pluimveehouder (bedrijfsleider) en binnen 24 uur afgegeven bij het Brabants Veterinair Laboratorium (BVL). Alle kweken werden binnen 48 uur na monsternamen ingezet. Het protocol dat werd gebruikt voor de bemonsteringen is als bijlage opgenomen.
- Bij BVL werden de mestmonsters onderzocht op de aanwezigheid van *Campylobacter* d.m.v. kweek, zowel directe kweek op mCCDA platen als kweek na ophoping in Preston bouillon.
- Na het inzetten van de kweek werden de mestmonsters door BVL bewaard in de vriezer.
- Op het moment dat in een mestmonster *Campylobacter* werd aangetoond met de kweek, werd door BVL een reinstrijk gemaakt van 5 afzonderlijke kolonies. Deze 5 stammen werden vervolgens opgeslagen bij min 80°C. Wanneer de directe kweek negatief was, maar de ophoping positief is uit de ophoping één *Campylobacter* stam opgeslagen.
- Nadat alle mestmonsters waren onderzocht zijn in november 2023 alle ingevroren mestmonsters en opgeslagen stammen door BVL opgestuurd naar WBVR.
- Bij WBVR werden alle geïsoleerde stammen bevestigd als *Campylobacter* d.m.v. MALDI-analyse alvorens zij werden gesequencet (WGS).

### 2.1 Bemonsteringen

In de periode maart tot en met oktober 2023 werden wekelijks mestmonsters van 3 stallen onderzocht (stal 1, 3 en 5). Monsters werden standaard op dinsdagmorgen door koeriersdienst van BVL bij Bedrijf Schippers opgehaald en naar het lab gebracht voor onderzoek op aanwezigheid van *Campylobacter*. In totaal zijn vier rondes onderzocht.

# 3 Laboratoriumonderzoek

## 3.1 Kweek

Mestmonsters werden op het lab onderzocht m.b.v. directe kweek en ophoping. De ophoping werd enkel uitgevoerd op mestmonsters afkomstig uit stallen die in de betreffende ronde nog niet eerder *Campylobacter* positief bevonden waren.

Mestmonsters werden voor aanvang van de kweek m.b.v. swab gehomogeniseerd. De directe kweek werd uitgevoerd door mestmonsters af te enten op mCCDA (WBVR, BM322). Ophoping gebeurde door 1 gram mest in 9 ml Preston medium te brengen. Aangezien Preston medium een korte houdbaarheidstermijn heeft, werd dit bereid kort voordat de monsters werden ingezet door het toevoegen in 47.5 ml Nutrient Broth No2 (Oxoid) van 0.2 ml Preston *Campylobacter* Selective Supplement (Oxoid SR0204), 0.2 ml *Campylobacter* Growth Supplement (Oxoid SR0232) en 2.5 ml gelyseerd paardenbloed (Oxoid SR0048) en vervolgens uit te vullen in steriele buizen in volumes van 9 ml/buis.

De kweekmedia werden in Anoxomat® potten in een microaeroob milieu bebroed bij  $41.5^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$  gedurende 48-72 uur (mCCDA platen) of 22-26 uur voor de Preston, waarna de laatste werd afgeënt op mCCDA en deze platen gedurende 48-72 uur werden bebroed. De mCCDA platen werden dagelijks beoordeeld op de aanwezigheid van voor *Campylobacter* verdachte groei. Bevestiging van verdachte kolonies gebeurde bij BVL m.b.v. Vitek® 2 (een methode om op basis van biochemische reacties een identificatie uit te voeren).

Bij een *Campylobacter* positief bevonden monster werden er vanaf de directe kweek 5 kolonies reingestroken op bloedagarplaten en ingevroren bij  $-80^{\circ}\text{C}$ . Bij een *Campylobacter* positief bevonden monster via ophoping werd uit de afent van de ophoping 1 kolonie reingestroken en opgeslagen bij  $-80^{\circ}\text{C}$ . Dit laatste was enkel van toepassing indien de directe kweek van het betreffende monster niet positief bevonden werd.

## 3.2 Whole Genome Sequencing (WGS)

Alle kolonies die na afloop van de bemonsteringen naar WBVR zijn gestuurd werden daar bevestigd met behulp van de MALDI-TOF, voordat DNA werd geïsoleerd voor WGS.

DNA van de *Campylobacter*-stammen werd geïsoleerd volgens de Puregene methode van QIAGEN. Kort samengevat werd een 10  $\mu\text{l}$  entoog van *Campylobacter* koloniemateriaal gesuspenseerd in 600  $\mu\text{l}$  lysisbuffer en 5 minuten bij  $80^{\circ}\text{C}$  verhit. Na een RNase behandeling met een incubatiestap van 1 uur bij  $37^{\circ}\text{C}$  werd 200  $\mu\text{l}$  proteïn precipitation solution toegevoegd, en het volume 20 seconden gevortext en daarna 3 minuten gecentrifugeerd bij 16000xg. De pellet werd achtereenvolgens gewassen met 600  $\mu\text{l}$  2-propanol en 600  $\mu\text{l}$  70% ethanol. Na droging werd het pellet geresuspenseerd in 10  $\mu\text{l}$  10 mM Tris en een uur gerehydrateerd in een schudincubator bij  $56^{\circ}\text{C}$  en 1200 rpm.

Het DNA van de verschillende bacteriële isolaten werd na het meten van de concentratie gebruikt als input voor het maken van een deep sequencing library met behulp van Illumina DNA Prep, volgens de aanbevelingen van de fabrikant. Na het voltooiën van de run werden de data gecontroleerd op artefacten. De opgeschoonde data werden gebruikt om voor ieder isolaat een draft genoom te construeren m.b.v. SPAdes Genome Assembler (v3.15.3). Vervolgens werden verdere analyses uitgevoerd, zoals genoom clustering en multilocus sequentietypering (MLST). MLST is een manier om bacterie-isolaten te typeren aan de hand van de sequenties van (meestal) zeven genen. De MLST-types zijn bepaald m.b.v. mlst versie 2.23.0 welke gebruik maakt van de meest recente PubMLST databases.

De clustering van de draft-genomen is mbv mashtree (v1.2.0) uitgevoerd en het resulterende bestand werd gevisualiseerd met Treeviewer (v2.1.0) software.

# 4 Resultaten

## 4.1 Kweek

In totaal zijn drie stallen op het bedrijf (stal 1, 3 en 5) gedurende vier rondes bemonsterd. Wanneer de vleeskuikens van iedere afzonderlijke stal worden beschouwd als aparte koppels, zijn in deze studie in totaal 12 koppels wekelijks bemonsterd. Van deze twaalf koppels werden er vijf positief bevonden op *Campylobacter*. In de mestmonsters van zeven koppels werd géén *Campylobacter* aangetoond, ook niet na ophoping.

De eerste ronde (bemonstering maart/april) bleven alle koppels negatief, in de tweede ronde (mei/juni) werden alle drie de stallen besmet, waarbij stal 3 op een leeftijd van  $\pm 3$  weken positief werd bevonden, en in de beide andere stallen een week later voor het eerst *Campylobacter* werd aangetoond. In ronde 3 (juli/aug) werd in stal 5 alleen via ophoping *Campylobacter* aangetoond in het laatst genomen monster voor slacht. Tijdens ronde 4 werden alleen in stal 1 in de directe kweek *Campylobacter* verdachte kolonies gevonden, eveneens in het laatst genomen monster voor slacht. Echter het rein kweken leverde problemen op, waardoor determinatie bij BVL niet mogelijk was. Het materiaal is naar WBVR gestuurd waar kon worden bevestigd dat het om *Campylobacter* ging.

Een overzicht van de resultaten is vermeld in Tabel 1.

Alle stammen die waren opgeslagen door BVL zijn bij WBVR nog een keer gecontroleerd in de MALDI-TOF voordat DNA werd geïsoleerd voor WGS. Alle stammen werden geïdentificeerd als *C. jejuni*, met uitzondering van de monsternamen van 19 juni van stal 5, waarbij het om *Helicobacter pullorum* bleek te gaan. Deze stammen zijn verder niet meegenomen in de WGS.

**Tabel 1.** Resultaten kweek (directe kweek op mCCDA en ophoping in Preston bouillon) per monsternamedatum voor drie stallen (1, 3 en 5). Neg: geen *Campylobacter* aangetoond; pos: *Campylobacter* aangetoond; - niet uitgevoerd

datum monstername	Stal 1		Stal 3		Stal 5		ID nummer isolaten
	Direct	Ophoping	Direct	Ophoping	Direct	Ophoping	
<b>ronde 1 (opzet 10 maart)</b>							
21/3/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
28/3/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
4/4/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
11/4/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
18/4/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
<b>ronde 2 (opzet 15 mei)</b>							
23/5/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
29/5/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
6/6/2023	neg	neg	pos	pos	neg	neg	28-32
13/6/2023	pos	-	pos	-	pos	-	33-47
19/6/2023	pos	-	pos	-	*	-	48-57
<b>ronde 3 (opzet 10 juli)</b>							
18/7/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
25/7/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
1/8/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
8/8/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
15/8/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
21/8/2023	neg	neg	neg	neg	neg	pos	63 - 67
<b>ronde 4 (opzet 11 september)</b>							
19/9/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
26/9/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
3/10/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
10/10/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
17/10/2023	neg	neg	neg	neg	neg	neg	
24/10/2023	pos	pos#	neg	-	neg	-	68-72
<b>totaal aantal stammen</b>							<b>40</b>

\*Ingevroren stammen bleken *Helicobacter* te zijn

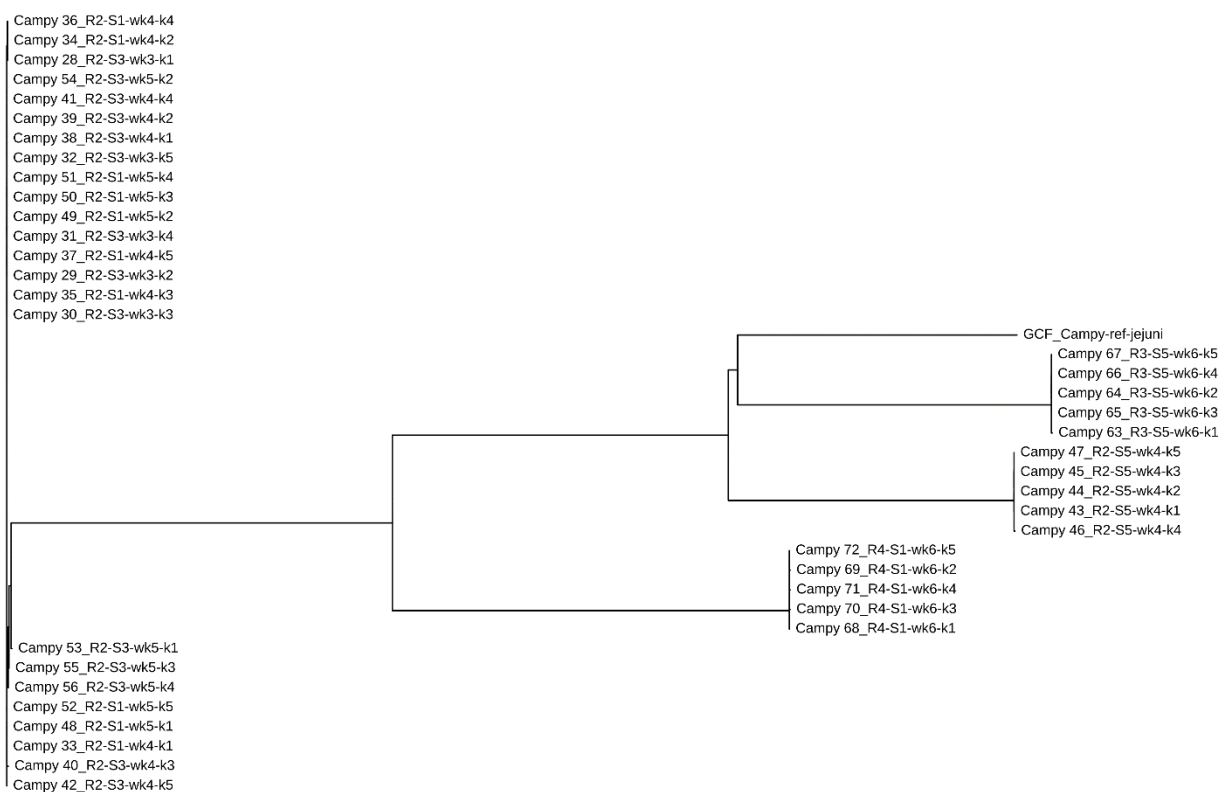
#*Campylobacter* aangetoond. Reinkweek en determinatie bleken niet mogelijk bij BVL. Materiaal is vervolgens door WBVR succesvol opgekweekt.

## 4.2 WGS

In totaal zijn 40 *Campylobacter* stammen gesequencet (zie nummers in de laatste kolom van Tabel 1). Eén stam (Campy57) bleek niet zuiver te zijn, waardoor van dit isolaat geen WGS data beschikbaar zijn. Van de 39 overige stammen is gekeken hoe zij onderling aan elkaar waren gerelateerd en tot welk MLST type ze behoren.

### 4.2.1 Clustering

Voor het bekijken van de onderlinge relatie is een clusteranalyse uitgevoerd, wat te zien is in Figuur 2.



**Figuur 2.** Genetische clustering van de *Campylobacter*-stammen geïsoleerd uit drie stallen van een bedrijf (stal 1, 3 en 5) welke gedurende vier rondes zijn bemonsterd in de periode maart tot en met november 2023. De isolaten zijn als volgt geïdentificeerd; R ronde-nummer (ronde 2, 3 of 4), S stalnummer (1,3 of 5), wk leeftijd van de vleeskuikens in weken (2-6) waarop er is bemonsterd en k is het nummer van de kolonie (1-5) van de mCCDA plaat.

### 4.2.2 MLST types

In totaal werden er vier verschillende MLST-types gevonden, die niet aan elkaar zijn gerelateerd en waarvan kan worden aangenomen dat het vier verschillende introducties betreft; Sequence type (**ST**) **2274** bevatte het grootste aantal stammen (ID28 t/m ID42 en ID48 t/m ID56). Al deze stammen werden geïsoleerd uit stal 1 en 3 gedurende ronde 2. Hoewel in Figuur 2 de stammen zijn verdeeld over twee clusters, zijn de stammen genetisch nauwelijks van elkaar te onderscheiden. Ook is er geen onderscheid te maken tussen de stallen (stal 1 of 3).

Het tweede ST, **ST46**, bestaat uit stammen die ook zijn geïsoleerd tijdens de tweede ronde (op 30 dagen leeftijd), maar alle vijf de stammen waren afkomstig uit stal 5 (uit hetzelfde monster).

Het derde ST (**ST11328**) is eveneens afkomstig uit stal 5, maar zijn geïsoleerd tijdens de laatste week van de derde ronde. Dit was de enige stal waar in de derde ronde *Campylobacter* werd gevonden.

De stammen die behoren tot het laatste ST (**ST464**) zijn afkomstig uit stal 1, in de laatste week van de vierde ronde. Dit was de enige stal waar in de vierde ronde *Campylobacter* werd gevonden.

## 5 Discussie en conclusies

Om het aantal voedselinfecties als gevolg van *Campylobacter* te verminderen is het voorkomen van besmettingen bij vleeskuikens de meest impactvolle manier. Internationaal is de consensus dat het zo goed mogelijk in stand houden van de biosecurity de belangrijkste (en vrijwel enige) manier is voor pluimveehouders om *Campylobacter* buiten de stal te houden (Wagenaar et al., 2013). De huidige studie werd uitgevoerd om te zien of de resultaten uit een eerdere monitoring konden worden bevestigd, namelijk dat het toepassen van de HyCare-methode een positieve uitwerking heeft op het behouden van een *Campylobacter* negatieve status bij koppels vleeskuikens.

In de huidige studie werd *Campylobacter* aangetoond in drie van de vier rondes die zijn onderzocht. In de HyCarestal waren twee koppels positief, net als in één van de twee andere stallen. In de derde stal werd *Campylobacter* in één van de vier onderzochte koppels aangetroffen. Daarmee kunnen resultaten uit een eerdere monitoring op dit bedrijf niet worden bevestigd, waarin het aantal besmettingen in de HyCare-stal lager was in vergelijking met de naastgelegen niet-HyCarestal (één van de vier rondes respectievelijk vier van de vier rondes).

Daarbij moet worden gezegd dat de vergelijking heeft plaatsgevonden op eenzelfde bedrijf, waar in alle stallen veel aandacht is voor biosecurity. Aanwijzingen voor een gunstig effect daarvan zijn dat in twee van de vier rondes alleen het monster genomen in de laatste week voor slacht *Campylobacter* positief was. Ook laten de resultaten van de genotypering zien dat op het bedrijf weliswaar verschillende *Campylobacter* stammen werden gevonden, maar géén verschillende stammen werden gevonden binnen een koppel; niet binnen één mestmonster en niet in opeenvolgende mestmonsters van een stal. Dit suggereert dat gedurende een ronde in een stal steeds sprake was van een eenmalige introductie van *Campylobacter* in het koppel. Dit wijst op een goed niveau van biosecurity, omdat uit eigen onderzoek (niet gepubliceerde resultaten) en de literatuur naar voren komt dat er in een koppel gemakkelijk meerdere introducties met *Campylobacter* kunnen plaatsvinden (Bull et al., 2006; O'Mahony et al., 2011).

In de tweede ronde bleken alle drie de stallen besmet met *Campylobacter*, waarbij stal 3 op ruim 3 weken leeftijd positief bevonden werd, en in de beide andere stallen een week later voor het eerst *Campylobacter* werd gevonden. Dit patroon, besmetting eerst in één stal, gevolgd door besmetting van naastgelegen stallen is een bekend verschijnsel, wat kan worden verklaard omdat *Campylobacter* zich snel verspreidt binnen een koppel waarbij binnen enkele dagen vrijwel alle aanwezige dieren *Campylobacter* in grote hoeveelheden uitscheiden. Na introductie in een koppel kan *Campylobacter* worden gevonden in voer- en drinkwatersystemen en in stallucht. Ook kan de onmiddellijke omgeving van een stal besmet raken, en op die manier kan verspreiding plaatsvinden naar andere stallen, via de pluimveehouder of via andere routes, zoals via materialen of ongedierte, maar ook via ventilatiesystemen.

Wat echter in dit onderzoek uit de genotyperings-resultaten bleek is dat de *Campylobacter* stammen gevonden in stal 1 en 3 weliswaar van hetzelfde genotype waren, maar dat in stal 5 een niet-verwante stam aanwezig was. Dus in tegenstelling tot stal 1, die waarschijnlijk vanuit stal 3 besmet is geraakt, was in stal 5 sprake van een afzonderlijke besmetting. Hier blijkt de waarde van genotyperen, omdat op basis van alleen de resultaten van de kweek op *Campylobacter* gemakkelijk zou kunnen worden aangenomen dat stal 5 besmet was geraakt vanuit de besmetting van stal 3. Ook kan op basis van de typering worden uitgesloten dat de gevonden *Campylobacter* stammen van koppel op koppel zijn overgebracht tussen opeenvolgende rondes op het bedrijf.

Geconcludeerd kan worden dat ondanks de HyCare-methode *Campylobacter* een stal binnen kan komen. Toch zijn er in deze studie geen aanwijzingen gevonden voor meerdere introducties van verschillende *Campylobacter* stammen in een stal gedurende één ronde, en ook niet voor herintroductie van een specifieke *Campylobacter* stam in verschillende (opeenvolgende) rondes in één stal dan wel op het bedrijf. Dit wijst er op dat een bedrijf waar aandacht is voor biosecurity en waar gewerkt wordt volgens het HyCare-principe, het aantal *Campylobacter* introducties kan beperken.

## 6 Literatuur

- Bull, S. A., Allen, V. M., Domingue, G., Jørgensen, F., Frost, J. A., Ure, R., Whyte, R., Tinker, D., Corry, J. E. L., Gillard-King, J., & Humphrey, T. J. (2006). Sources of *Campylobacter* spp. colonizing housed broiler flocks during rearing. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(1).  
<https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.645-652.2006>
- Dame-Korevaar, A., Pacholewicz, E., van der Most, M., Schreuder, J., Koene, M., Ellen, H., Bokma, M., Hoorweg, F., van Hattum, T., Gunnink, H., Rommers, J., Wagenaar, J., & Hoff, A. (2022). *Beheersing van Campylobacter in de pluimveesector ;: onderzoek naar Campylobacter op Nederlandse vleeskuikenbedrijven en de bijbehorende risicofactoren*. <https://doi.org/10.18174/573974>
- O'Mahony, E., Buckley, J. F., Bolton, D., Whyte, P., & Fanning, S. (2011). Molecular epidemiology of *campylobacter* isolates from poultry production units in Southern Ireland. *PLoS ONE*, 6(12).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028490>
- Wagenaar, J. A., French, N. P., & Havelaar, A. H. (2013). Preventing *campylobacter* at the source: Why is it so difficult? *Clinical Infectious Diseases*, 57(11). <https://doi.org/10.1093/cid/cit555>



# 7 Bijlage bemonsteringsprotocol stallen

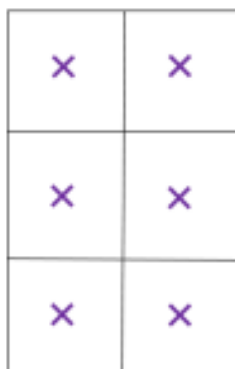


## Campylobacter-monitoring vleeskuikenbedrijf Schippers Hapert

Maart 2023

### Protocol nemen en bewaren mestmonsters

1. Per te onderzoeken stal worden **12 hoopjes mest** genomen. Streef ernaar dat de helft van het mestmonster bestaat uit blindedarmmest. Belangrijk is dat de mest vers is.
2. Om de pakkans te vergroten, worden de mestmonsters **op verschillende plaatsten in de stal** genomen. Als richtlijn kan worden aangehouden om zowel aan de linker- als rechterkant van de stal voor, midden en achter twee mestmonsters te nemen, zie schematische weergave onderaan protocol.
3. De hoopjes mest van één stal kunnen samen in één monsterpotje worden gedaan.
4. De monsterpotjes moeten niet helemaal tot bovenaan toe worden gevuld in verband met het risico op gasvorming.
5. Op de zijkant van het monsterpotje dient **de monsternamedatum en het stalnummer** te worden genoteerd.
6. Tot het moment waarop de monsterpotjes worden opgehaald door een koerier, worden **de potjes bewaard in de koelkast** bij een temperatuur van 4-6 °C.
7. De mestmonsters worden door een koeriersdienst naar het laboratorium (BVL) getransporteerd. **Dit transport vindt plaats op de dag van of uiterlijk één dag na monstername.**



---

Wageningen Bioveterinary Research  
Postbus 65  
8200 AB Lelystad  
T 0320 23 82 38  
info.bvr@wur.nl  
[wur.nl/bioveterinary-research](http://wur.nl/bioveterinary-research)

Wageningen Bioveterinary Research  
Report 2410782

De missie van Wageningen University & Research is 'To explore the potential of nature to improve the quality of life'. Binnen Wageningen University & Research bundelen Wageningen University en gespecialiseerde onderzoeksinstituten van Stichting Wageningen Research hun krachten om bij te dragen aan de oplossing van belangrijke vragen in het domein van gezonde voeding en leefomgeving. Met ongeveer 30 vestigingen, 7.200 medewerkers (6.400 fte) en 13.200 studenten en ruim 150.000 Leven Lang Leren-deelnemers behoort Wageningen University & Research wereldwijd tot de aansprekende kennisinstellingen binnen haar domein. De integrale benadering van de vraagstukken en de samenwerking tussen verschillende disciplines vormen het hart van de unieke Wageningen aanpak.