

# Laag Pathogene Aviaire Influenza Virus Infecties op pluimveebedrijven in Nederland

JEANET VAN DER GOOT, JOSANNE VERHAGEN<sup>1</sup>, JOSE GONZALES, JANTJEN BACKER, JOHAN BONGERS, GERT JAN BOENDER, RON FOUCHIER<sup>1</sup>, GUUS KOCH

Dit artikel is een samenvatting van het rapport: 'Laag pathogene Aviaire Influenza Infecties op pluimveebedrijven in Nederland' (CVI 2012). Dit rapport is geschreven naar aanleiding van vragen van het toenmalige Ministerie van Economische zaken, Landbouw en Innovatie. De vragen die werden gesteld zijn: hebben pluimveebedrijven met vrije uitloop een grotere kans op introductie van LPAI virus infecties? Is de kans op introductie gerelateerd aan wilde vogels? Is er een periode in het jaar waarin het risico op infectie groter is? Kunnen er factoren geïdentificeerd worden die de kans op introductie verminderen?

Laag Pathogene Aviaire Influenza (LPAI) is een aandoening bij pluimvee die wordt veroorzaakt door LPAI-virussen. In het algemeen veroorzaken LPAI-virussen geen tot milde verschijnselen in de koppels, zoals eilegdaling. LPAI-virussen van het subtype H5 of H7 kunnen echter evolueren tot Hoog Pathogene Aviaire Influenza virussen (HPAI). Daarom wordt sinds de HPAI H7N7-uitbraak in Nederland in 2003 pluimvee

serologisch gemonitord en is er een 'early warning' regeling ingesteld. Op deze manier worden regelmatig – en steeds vaker – LPAI-virussen of antistoffen tegen LPAI-virussen gevonden. Wilde vogels worden beschouwd als het reservoir voor aviaire influenzavirussen.

## LPAI-virusinfecties op pluimveebedrijven in Nederland

In de periode 2006 tot 2011 is het aantal bedrijven waar LPAI-virussen en/of antilichamen daartegen zijn gedetecteerd toegenomen: in 2006 waren dit 4 bedrijven (waarvan 2 secundair), in 2007 13 bedrijven (5 secundair), in 2008 10 bedrijven (1 secundair), in 2009 11 bedrijven (1 secundair), in 2010 20 bedrijven (2 secundair) en in 2011 33 bedrijven waarvan 10 secundair. Het gaat hier om alle subtypen, dus niet alleen om H5- en H7-virussen. Een bedrijf wordt als secundair geïnfecteerd beschouwd (door spreiding vanuit een ander bedrijf) als hetzelfde virussubtype in dezelfde periode in de omgeving van een reeds gedetecteerd bedrijf is gevonden, of als er een epidemiologische link kon worden gelegd.

Het intensiever zoeken naar LPAI-infecties kan deze toename niet verklaren. De meeste bedrijven (57/70) zijn gedetecteerd via de serologische monitoring, maar deze vindt al plaats sinds 2004 en is tot 2012 niet veranderd. De 'early warning' is sinds 2008/2009 van kracht, maar het geringe aantal detecties via deze route

**Central Veterinary Institute, onderdeel van Wageningen UR** Houtribweg 39, 8221 RA Lelystad  
Postbus 65, 8200 AB Lelystad Tel 0320 238 800  
Internet: [www.wageningenur.nl/cvi](http://www.wageningenur.nl/cvi)  
**<sup>1</sup>Nationaal Influenza Centrum en Afdeling Viroscience** Erasmus Medisch Centrum Rotterdam  
Postbus 2040, 3000 CA Rotterdam Tel 010 4088066  
Internet: [www.virosciencelab.com](http://www.virosciencelab.com)

(13/70) kan niet voor de verhoging gezorgd hebben. De serologische monitoringstest waarmee de sera bij de GD getest worden, is in januari 2009 vervangen, maar de nieuwe test is even gevoelig als de oude test.

Het aantal leghennenbedrijven in Nederland is niet toegenomen; dit geldt voor uitloop- en reguliere bedrijven (Productschap voor Pluimvee en Eieren 2011). Ook het aantal waargenomen wilde watervogels in Nederland was in de periode 2004 tot 2009 min of meer constant (SOVON; Van Roomen 2006, van Roomen 2007, Hustings 2008, Hustings 2009, Horman 2011). De aviaire influenzavirusprevalentie in wilde vogels varieert per seizoen, per jaar, per wilde vogelsoort en per locatie, maar uit het onderzoek van het Erasmus Medisch Centrum (EMC) blijkt dat op dit moment onvoldoende bewijs bestaat voor een toegenomen prevalentie van LPAI-virussen in wilde vogels.

Kortom, er is op dit moment geen duidelijke oorzaak bekend voor het verhoogde aantal detecties van LPAI-virusinfecties op pluimveebedrijven. Om de oorzaak van het verhoogd aantal LPAI-virusdetecties beter te begrijpen kan worden gekeken of sommige regio's of bedrijfstypes een verhoogde kans op LPAI-infectie hebben.

## Kans op LPAI-virus introducties op pluimveebedrijven per regio en bedrijfstype

Om te onderzoeken of er gebieden in Nederland zijn waar het risico op introductie van een LPAI-virus groter is dan gemiddeld werd een ruimtelijke clusteranalyse uitgevoerd. Hierbij wordt gekeken of het aantal uitbraken evenredig verdeeld is over het aantal aanwezige pluimveebedrijven. Zodra in een gebied meer of minder uitbraken dan gemiddeld plaatsvinden en dit niet meer door toeval te verklaren is, spreken we van een cluster. De analyse werd zowel uitgevoerd voor alle pluimveebedrijven (figuur 1), als voor leghenbedrijven met vrije uitloop. Uit beide clusteranalyses (over de periode 2006 tot en met oktober 2011) bleek dat in Nederland geen gebieden zijn aan te wijzen waar vaker dan gemiddeld AI-virus introducties plaatsvinden. Ongeveer 95 procent van de pluimveebedrijven in Nederland houdt kippen. Deze bedrijven kunnen worden onderverdeeld in bedrijven met ouderdieren ( $\approx 18\%$ ), vleeskuikens ( $\approx 31\%$ ), binnen gehouden leghennen ( $\approx 35\%$ ) en leghennen met uitloop ( $\approx 10\%$ ). Voor de periode 2007 tot juli 2010 is onderzocht wat de kans op LPAI-introductie is voor de verschillende bedrijfstypes (Gonzales 2013). Hierbij is er rekening mee gehouden dat sommige bedrijfstypes vaker serologisch bemon-

LPAI Infected Flocks in The Netherlands (2006 - 2011)



**Figuur 1.** Clusteranalyse van alle geïnfecteerde pluimvee bedrijven in de periode 2006 tot en met oktober 2011 tegen de achtergrond van alle pluimveebedrijven in Nederland (situatie 2007).

sterd worden dan andere (tabel 1). Omdat de studie gaat over *het risico op introductie* is alleen gekeken naar de bedrijven die als eerste met een bepaald virussubtype geïnfecteerd zijn geraakt (primaire infecties). Dit virus kan daarna spreiden naar andere bedrijven (secundaire infecties). Als uit de tracering bleek dat het ging om secundair geïnfecteerde bedrijven zijn deze bedrijven niet meegenomen in de analyse.

In deze studie bleken eendenbedrijven de grootste kans te hebben om geïnfecteerd te raken. Opgemerkt moet worden dat het vooral bij de eendenbedrijven om kleine aantallen bedrijven gaat waardoor de betrouwbaarheidsintervallen erg groot zijn. Een mogelijke reden is dat eenden gevoeliger zijn dan kippen voor LPAI-virussen die uit wilde eenden, ganzen en zwanen komen (Mundt 2009) en hoewel ze binnen worden gehouden, gemakkelijker geïnfecteerd raken. Een mogelijke reden voor het verschil tussen ouderdieren ( $RR=23$ ) en vleeseenden ( $RR=12.8$ ) is dat de ouderdieren langer leven dan vleeseenden en daardoor een grotere kans hebben om serologisch positief te worden.

In Nederland worden alle kalkoenen binnen gehouden. Het is van kalkoenen bekend dat ze gevoeliger zijn voor infecties met LPAI-virussen,

**Tabel 1.** Totaal aantal pluimveebedrijven en totaal aantal monsternames van 2007 tot juli 2010 in Nederland per bedrijfstype en relatief risico (RR) op introductie van een LPAI virus infectie per bedrijfstype. Leghenbedrijven zonder uitloop zijn gekozen als referentiecategorie (RR=1) (Gonzales 2013).

Jaar	Bedrijfstype	Bedrijfstype								Totaal
		Eend ouderdier	Eend slacht	Kalkoen	Leghen zonder uitloop	Leghen met uitloop	Opfok leg	Vlees kuiken ouderdier	Vlees kuikens	
2007	Bedrijven #	12	44	87	802	272	261	256	719	2453
	Bezoeken	19	46	300	1057	652	261	256	811	3402
	frequentie	1.6	1.0	3.4	1.3	2.4	1.0	1.0	1.1	1.5
	time_risk	9.8	1.2	3.7	10.4	6.3	3.7	8.9	1.2	
	positieven	2	0	6 (1)	0	3	1	0	0	12
2008	Bedrijven	12	42	70	714	295	250	249	775	2407
	Bezoeken samplings	22	45	248	952	830	250	249	908	3504
	frequentie	1.8	1.1	3.5	1.3	2.8	1.0	1.0	1.2	1.5
	time_risk	8.8	1.2	3.7	10.3	5.2	3.7	8.9	1.2	
	positieven	1	1	0	1	4	0	1	0	8
2009	Bedrijven	13	56	68	678	286	239	240	808	2388
	Bezoeken samplings	13	62	210	841	796	239	240	899	3300
	frequentie	1.0	1.1	3.1	1.2	2.8	1.0	1.0	1.1	1.4
	time_risk	10.3	1.2	3.7	10.9	5.6	3.7	8.9	1.2	
	positieven	0	0	1	2	7	0	0	0	10
2010	Bedrijven	9	27	60	351	227	231	236	547	1688
	Bezoeken samplings	11	27	115	408	444	231	236	570	2042
	frequentie	1.2	1.0	1.9	1.2	2.0	1.0	1.0	1.0	1.2
	time_risk	5.6	1.2	3.7	5.6	3.6	3.7	8.9	1.2	
	positieven	0	0	1	6 (5)	9 (8)	0	0	0	16
RR	gemiddeld	23.0	12.8	7.6	1.0	11.0	0.7	0.3	0.0	
	LCI*	6.2	1.6	2.0		4.9	0.1	0.0		
	UCI*	85.7	102.7	29.0		24.8	5.7	2.4		

Bedrijven zijn ingedeeld naar type pluimvee, ook zijn gegeven de gemiddelde frequentie van bemonstering per jaar (frequentie), het gemiddelde aantal maanden dat een koppel dieren blootstaat aan infectie tussen twee opeenvolgende monsternames in (time\_risk) en het totaal aantal seropositieve detecties in dat jaar (positieven, met tussen haakjes het aantal primaire introducties).

# Aantal bedrijven per jaar tijdens de surveillance. Alle bedrijven in Nederland zijn in ieder geval een keer per jaar bemonsterd.

\* LCI: ondergrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval, UCI: bovengrens van het 95% betrouwbaarheidsinterval.

dat wil zeggen dat bij kalkoenen minder LPAI-virusdeeltjes nodig zijn om geïnfecteerd te worden dan bij kippen (Tumpey 2004). Het meest interessant is echter dat blijkt dat leghenbedrijven met uitloop een elf keer zo grote kans hebben om geïnfecteerd te worden als leghenbedrijven zonder uitloop (de referentiecategorie). Door het hoge relatieve risico en het grote aantal bedrijven worden in deze categorie de meeste LPAI-virussen en/of antilichamen aangetoond. Een mogelijke reden voor het verschil tussen bedrijven met en zonder uitloop is dat uitloophennen meer contact kunnen maken met wilde vogels. Voor een overdracht van LPAI-virussen van wilde vogels naar pluimvee is direct contact tussen pluimvee en wilde vogels of indirect contact via feces van wilde vogels nodig. Uit beperkt onderzoek blijkt dat er watervogels worden gezien op pluimveebedrijven, zij het in kleine aantallen (Voslamber 2005, 2006; Welby 2010).

Uit de reacties van de Nationale Referentie Laboratoria uit de ons omringende landen blijkt dat men wel een verband vermoedt tussen AI-virusinfecties en uitloop, maar dit niet heeft onderzocht en dus ook niet heeft aangetoond. Om de rol die wilde vogels spelen in de introductie van LPAI-virussen naar pluimvee, te onderzoeken, worden zij in Nederland op grote schaal bemonsterd. Vervolgens kan worden gekeken of er overeenkomsten zijn tussen LPAI-infecties in pluimvee en in wilde vogels.

### Onderzoek naar AI virussen bij wilde vogels

Uit onderzoek van het Erasmus Medisch Centrum blijkt dat LPAI-virussen worden aangetoond in eenden, ganzen, zwanen en meeuwen. De hoogste prevalenties worden gevonden bij wilde eenden en overige eendensoorten (tabel 2).

**Tabel 2.** Overzicht bemonsterde wilde vogels voor aviaire influenza virus surveillance in Nederland in periode 1998 tot 2011. Overige Anseriformes zijn ganzen en zwanen. Charadriiformes zijn meeuwen, sternens, alken en steltlopers.

	Aantal vogelsoorten	Aantal monsters getest	Aantal monsters virus positief (n)	Influenza virus prevalentie (%)	Aantal virussen geïsoleerd (n)	Aantal virussen geïsoleerd (%)
Wilde eend	1	45449	3016	6.6	554	1.2
Overige eenden	18	14618	701	4.8	39	0.3
Overige Anseriformes	12	23393	767	3.3	51	0.2
Charadriiformes	42	19914	451	2.3	254	1.3
Overige soorten	114	6945	4	0.1	0	0.0
Totaal	187	110319	4939	4.5	898	0.8

**Tabel 3.** Aviaire influenzavirussubtypes geïsoleerd tijdens AIV surveillance in wilde vogels in Nederland 1998 tot 2011 (aangegeven in rood, n=570), en gedetecteerd met betrekking tot virologische en serologische technieken op pluimveebedrijven in Nederland in de periode 2006 tot 2011 (aangegeven tussen haakjes in blauw, n=74). H?=HA typering niet succesvol, N?=NA typering niet succesvol.

HA	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N?*	Totaal
H1	36(2)	2	1	1	1(1)			1		(3)	42(6)
H2		3	7(2)						5	(1)	15 (3)
H3	1	17	1		1	17		69	1	(2)	107 (2)
H4		6			7	55		5			73
H5		17(1)	8			1				(10)	26 (11)
H6	15(1)	21			3(1)			35		(3)	74 (5)
H7	9(1)	1	5(1)	1(2)			7(4)	1		(4)	24 (12)
H8	1			5(3)						(9)	6 (12)
H9		8(3)								(1)	8 (4)
H10	3			6		4	22(2)			(1)	35 (3)
H11	2	1	1					2	13		19
H12					3			1		(1)	4 (1)
H13		21	3			5		57			86
H14										(1)	(1)
H16			50					1			51
H?*		(1)								(13)	(14)
Totaal	67(4)	97(5)	76(3)	13(5)	15(2)	82	29(6)	172	19	(49)	570 (74)

### Vergelijking LPAI infecties op pluimveebedrijven en in wilde vogels

Hieronder is het verband tussen LPAI-virussen uit wilde vogels en uit pluimvee op drie manieren bekeken. Eerst wordt vergeleken hoe de LPAI prevalentie in wilde vogels en pluimvee gedurende het jaar varieert. Daarna is gekeken of de virussubtypes die het meest gevonden worden in wilde vogels overeenkomen met de subtypes in pluimvee, en wat de genetische verwantschap is tussen LPAI-virussen uit wilde vogels en uit pluimvee.

#### Seizoensvariatie in aviaire influenzavirusprevalentie in wilde vogels en detecties op pluimveebedrijven

De aantallen monsters in de verschillende soorten wilde vogels variëren gedurende het jaar. In de zomermaanden worden meeuwen (Charadriiformes) in grote aantallen bemonsterd op de broed-

kolonies. Vanaf juli neemt het aantal eenden in Nederland toe, net als de bemonstering van de wilde eenden. In dezelfde periodes worden ook de hoogste virusprevalenties gevonden. De meeste virussen worden aangetoond in het najaar in eenden, en in juni en juli in meeuwen.

Het merendeel van de virologisch positieve pluimveebedrijven wordt gedetecteerd in de maanden maart tot en met juni. Bij de serologisch gedetecteerde bedrijven is er ook een piek in mei en juni, maar wat minder duidelijk (figuur 2).

De piek in detecties op pluimveebedrijven komt niet overeen met de pieken in virusprevalentie in de wilde vogelpopulatie. Hierbij moet men wel bedenken dat de virologische steekproef in de wilde vogels niet rechtstreeks te vergelijken is met de serologische monitoring van pluimveebedrijven. Bovendien kan bij een bedrijf dat virologisch positief is, de introductie grofweg drie tot zeventig dagen voorafgaand aan de

detectie hebben plaatsgevonden. Dit kan worden afgeleid uit schattingen van transmissieparameters uit experimenten met en uitbraken van LPAI-virussen (Gonzales 2011, 2012). Voor serologisch positieve bedrijven is het introductietijdstip niet aan te geven, omdat leghennen (levens)lang serologisch positief blijven. Hoewel de seizoensvariatie in detectie op pluimveebedrijven en virusprevalentie in wilde vogels niet overeenkomen, is dat nog geen aanwijzing dat ze geen verband met elkaar houden.

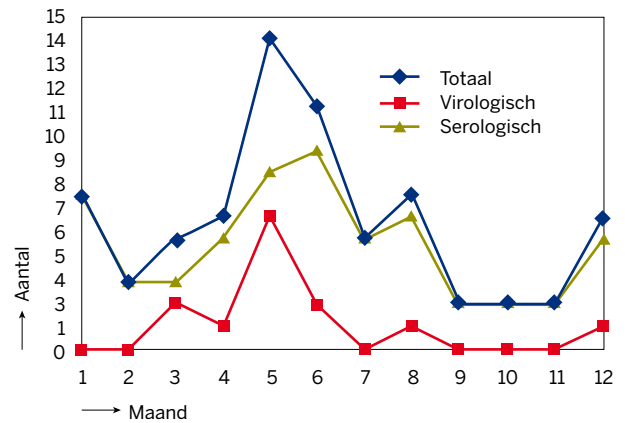
#### **Subtypes die gevonden worden bij wilde vogels en pluimvee**

Er zijn verschillende subtypes (H1 tot en met H16) van het LPAI-virus; elk H-type is gecombineerd met een - type (N1 tot en met N9). In wilde vogels worden alle bekende AI-virus-subtypes gevonden. De grootste diversiteit in subtypes wordt in wilde eenden en overige eendensoorten gevonden (tabel 3). De subtypes die in de meeuwen worden geïsoleerd tijdens de zomermaanden beperken zich tot H13- en H16-virussen. In tabel 3 is te zien dat alle bij pluimvee gedetecteerde subtypen ook bij wilde vogels zijn geïsoleerd. Er lijkt geen overeenkomst te zijn tussen de prevalenties in subtypes tussen de wilde vogels en pluimvee: bij wilde vogels werden de subtypes H3(N8), H4(N6) en H13(N8) het meest geïsoleerd, deze subtypes werden niet of nauwelijks gedetecteerd bij pluimvee.

#### **De genetische overeenkomst tussen LPAI-virussen die gevonden worden op pluimveebedrijven en bij wilde vogels**

Hoewel de meest prevalentie subtypes in pluimvee en wilde vogels niet overeenkomen, zijn pluimveevirussen wel genetisch nauw verwant aan wilde vogel LPAI-virussen als op het niveau van individuele virusisolaten wordt gekeken. Een overzicht van de pluimveevirussen en de nauw verwante virussen met locatie en jaar van isolatie is gegeven in tabel 4. Van de 12 pluimveevirussen geïsoleerd op pluimveebedrijven in Nederland in de periode 2006 tot 2011, zijn van 9 virussen zowel het HA als NA genetisch nauw verwant aan LPAI-virussen geïsoleerd bij wilde vogels. Het blijkt echter dat er een lang tijdsinterval kan zitten tussen detectie van genetisch verwante LPAI-virussen. De tijd tussen isolatie van nauw verwante virussen is groot (111 dagen tot langer dan 1880 dagen). Ook kunnen verwante virussen op grote afstand van elkaar gevonden worden. Van pluimveevirussen met hetzelfde HA- en NA-subtype kan worden nagegaan door middel van een genetische analyse of het gaat om ver-

**Figuur 2.** Aantal gedetecteerde bedrijven per maand in de periode 2006 tot en met oktober 2011.



wante virussen. Sommige virussen bevinden zich in dezelfde vertakking in de fylogenetische boom waardoor het niet mogelijk is onderscheid te maken tussen een enkele introductie met secundaire spreiding of meerdere primaire introducties. Andere virussen van dezelfde subtypes bevinden zich in afzonderlijke vertakkingen in de fylogenetische boom en zijn om die reden waarschijnlijk het gevolg van meerdere afzonderlijke introducties in pluimvee.

#### **Vervolgonderzoek**

Er is nog weinig bekend over de factoren die op bedrijfsniveau een rol spelen bij de kans op introductie van LPAI-virussen. Bij het Erasmus Medisch Centrum wordt op dit moment onderzoek gedaan naar de relatie tussen de aanwezigheid van water in de buurt van pluimveebedrijven en het risico op introductie. Uit een Belgisch onderzoek blijkt dat het buiten voeren van pluimvee een risicofactor voor het aantal bezoeken van wilde vogels aan pluimvee is en ook in Nederland waren wilde vogels aanwezig tussen de watervogelcollecties bij pluimveebedrijven en aten mee van het voer.

Om alle factoren in kaart te brengen wordt op dit moment een 'case control'-studie opgezet, waarbij een groep geïnfecteerde leghenbedrijven met uitloop vergeleken wordt met een groep niet geïnfecteerde leghenbedrijven met uitloop. Bij dit onderzoek wordt zowel naar omgevingsfactoren gekeken (zoals de nabijheid van water, nabijheid van wilde vogelpopulaties et cetera) als naar bedrijfsfactoren (zoals de inrichting van de uitloopruimte, directe toegang tot open water, aantal uren uitloop et cetera). ●

#### **Referenties**

Tabel 4 en de referenties behorende bij dit artikel zijn te vinden op de website van de KNMvD, [www.knmvd.nl](http://www.knmvd.nl).