

Vogelgriep ontrafeld

Resultaten FES-AI onderzoeksprogramma

Vogelgriep ontrafeld

Resultaten van het FES-AI Onderzoeksprogramma

Voorwoord

Met genoegen bieden het FES-AI consortium, als verantwoordelijke uitvoerder, en het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie (EL&I), als opdrachtgever, u dit boekje aan als eindpresentatie van het 'Impulse Program on Avian Influenza', beter bekend als het FES-AI onderzoeksprogramma. Het boekje geeft een beeld van de inspanningen die door een groot aantal onderzoekers zijn verricht om de kennis op het gebied van vogelgriep op een hoger niveau te brengen met het doel om een volgende uitbraak adequaat te kunnen bestrijden en liefst te kunnen voorkomen.

Het is al weer bijna tien jaar geleden dat Nederland werd geconfronteerd met een uitbraak met het hoog-pathogene vogelgriepvirus en de ernstige gevolgen die deze uitbraak had voor de samenleving. "Dit nooit weer" zullen velen gedacht hebben. De gezondheid en het welzijn van (landbouwhuis)dieren en het stimuleren van een duurzame veehouderij zijn binnen de samenleving belangrijk thema's en staan hoog op de beleidsagenda van het ministerie van EL&I. In het verlengde daarvan staan preventie en bestrijding van besmettelijke dierziekten, waaronder vogelgriep, en samenwerking tussen het veterinaire en humane domein voor de aanpak van zoönosen hoog in het vaandel.

Sinds jaren is inspanning geleverd om bestrijding van besmettelijke dierziekten door middel van (nood-) vaccinatie mogelijk te maken. Dit was in 2006 aanleiding voor de toenmalige ministeries van Economische Zaken en van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, verantwoordelijk voor de bestrijding van besmettelijke dierziekten, om het onderzoek ten behoeve van de bestrijding van hoogpathogene Aviaire Influenza te stimuleren door het inzetten van middelen uit het Fonds Economische Structuur Versterking (FES). Voor adequate preventie en bestrijding van een complexe ziekte als Aviaire Influenza is meer kennis nodig dan aanwezig is in één enkele organisatie. Daarom was samenwerking tussen verschillende onderzoekscentra op het gebied van veterinaire infectieziekten en zoönosen een van de doelstellingen van het programma. De samenwerking van deze diverse partners in dit FES-AI programma is een van de eerste successen van het samenwerkingsverband 'Kennisketen Infectieziekten Dier'. Deze samenwerking belooft duurzaam te zijn en nog vele vruchten af te werpen.

Dit boekje schetst een beeld van de resultaten van het FES-AI onderzoeksprogramma. Er zijn in dit programma veel successen geboekt. Zo zijn nieuwe diagnostische tests ontwikkeld, kandidaatvaccins ontwikkeld en zijn fundamentele inzichten in viruseigenschappen, de verspreiding en de interactie tussen virus en gastheer verkregen. Daaruit zijn veel wetenschappelijke artikelen voortgekomen en hebben zeven jonge onderzoekers de gelegenheid gekregen promotieonderzoek te doen.

Het FES-AI onderzoeksprogramma was een groot programma waaraan velen op uiteenlopende wijzen hebben bijgedragen, bijvoorbeeld als ontwerpers, toezichthouders, financiers, uitvoerende onderzoekers, begeleiders, AIOs, meedenkers of ondersteuners. Wij willen allen die op een of andere wijze hebben bijgedragen zeer hartelijk danken voor hun inspanningen. U als lezer van dit boekje, wensen wij een inspirerende en interessante leestocht.

Ministerie van EL&I, Directeur Dierlijke Agroketens en Dierenwelzijn, drs. H. Kool
Ministerie van EL&I, Directeur Agrokennis, ir. A.S.M. Tabak
CVI, Programmaleider FES-AI, dr. T.G. Kimman

Inhoudsopgave

1 Inleiding 8

Vogelgriep in het kort	10
Vogelgriep in Nederland	12
Eieren voor je geld	13

2 Van epidemie naar FES-AI 16

Opschalen van de bestrijding	18
Soelaas	20
Kennisketen	21
Belangrijke bijvangst	23

3 Spuiten en sprayen 24

DIVA	26
Backbone	28
Registratie	31

4 Van trekvogel naar kip 32

Uitloopbedrijven	34
Hygiëne	35
Eierophalers	36
Mutaties	36
Windrichting	37
Surveillance	37
Model	38

Interviews 40

<i>Guus Koch:</i> Feilloos detecteren	40
<i>Rob Moormann:</i> Klassieke vaccins	42
<i>Lonneke Vervelde:</i> Wakkere killer-cellen	44
<i>Peter Rottier:</i> Werkende eiwitvaccins	46
<i>Arjan Stegeman:</i> Wind verspreidt	48
<i>Marion Koopmans:</i> Transmissie-puzzle ontrafelen	50
<i>Thijs Kuijken:</i> Trekvogels volgen	52

Output in peer reviewed journals 54

Inleiding

Inleiding



In het voorjaar van 2003 wordt Nederland getroffen door vogelpest (aviaire influenza) H7N7, doorgaans aangeduid als vogelgriep, een ernstige dierziekte die potentieel ook gevaarlijk is voor de mens. Bijna 31 miljoen kippen, kalkoenen, ganzen en eenden worden geruimd. De beelden op televisie en de foto's in de kranten vallen rauw op het dak; twee jaar na de MKZ-crisis kampt de veehouderij opnieuw met een ziekte die dood en verderf zaait. Dit nooit meer, is de gedachte die veel Nederlanders door het hoofd gaat.

Bovendien vergt de nieuwe dierziekte een menselijke slachtoffer. Een dierenarts uit Brabant overlijdt in april van dat jaar aan een longontsteking, hoogstwaarschijnlijk veroorzaakt door het vogelgriepvirus. Waakzaamheid is dus geboden. Vogelgriep bestaat in verschillende varianten, zeker niet allemaal even gevaarlijk, maar allemaal wel erg veranderlijk en daardoor ook bedreigend voor de mens. In Azië vallen regelmatig menselijke slachtoffers. Dierziekten komen zo wel akelig 'dichtbij'. Zeker als in 2005, 2006 en 2007 de potentieel gevaarlijke vogelgriepvariant H5N1 een paar maal de kop opsteekt in Europa. Dit boekje heeft de vogelgriepuitbraak van 2003 in Nederland als startpunt. Welke dilemma's deden zich toen voor en welke bestrijdingsmogelijkheden waren er voorhanden? Vanwege de twijfels, vragen en onzekerheden werd het FES-AI onderzoeksprogramma in het leven geroepen. Dit door de rijksoverheid gefinancierde onderzoeksprogramma beoogde kennis te verkrijgen over deze ziekte en betere bestrijdingsmaatregelen tot haar beschikking te krijgen. Daarvoor werd een onder-

zoeksconsortium gevormd dat kennis uit het medische en veterinaire domein bundelde. Deelnemers waren het CVI en universitaire groepen van Wageningen UR, de afdelingen Infectieziekten & Immunologie en Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren van de Faculteit Diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht, de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) Deventer, het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en de afdeling Virologie van het Erasmus Medisch Centrum.

Het FES-AI programma is opgedeeld in zeven verschillende kennisvelden. Voor de samenstelling van dit boekje is gesproken met de onderzoekers die het onderzoek vorm hebben gegeven. Naast een samenvattend verhaal zijn die zeven thema's in de vorm van interviews beschreven.

Vogelgriep in het kort

Vogelgriep en mensengriep zijn nauwe verwanten; beide worden meestal veroorzaakt door zogeheten Influenza-A-virussen. Zo'n griepvirus is een



mini-knikkertje van hooguit honderd nanometer (0,0001 millimeter) doorsnede met eiwituitstulpingen aan de buitenkant. Daarmee klampt het virusbolletje zich vast aan de cellen van zijn gastheer. Die hechting heeft het nodig om de cel te infecteren en zichzelf daarna te kunnen vermenigvuldigen. Daarvoor gebruiken virussen een soort koekoek-techniek: hun erfelijk materiaal, het RNA, brengen ze in de gastheercel, waardoor die virus-kopieën gaat produceren. Over het algemeen infecteren griepvirussen de luchtwegen van hun gastheer.

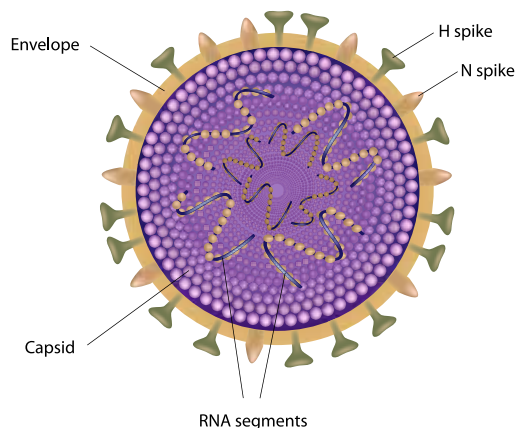


De vogelgriepuitbraak met H7N7 in 2003 in kaart gebracht met besmette bedrijven, verdachte bedrijven, beschermingsgebieden, toezichtsgebieden en bufferzones. Boven in de Gelderse Vallei, links in Limburg (bron NVWA).

De indeling van griepvirussen gebeurt aan de hand van twee eiwitten aan de buitenkant van de virusmantel. Die gebruiken ze om de gastheercel binnen te dringen en na afloop van het reproductieproces weer te verlaten. Er zijn momenteel zeventien verschillende varianten bekend van het eiwit hemagglutinine (H) en negen varianten van het eiwit neuraminidase (N). Aan de hand van de combinatie van het H- en N-type krijgen de griepvirussen een codenaam; de uitbraak van vogelgriep in Nederland van 2003 werd bijvoorbeeld veroorzaakt door H7N7.

Inmiddels zijn er enkele tientallen combinaties van H en N bekend, die vooral voorkomen in wilde vogels, het belangrijkste reservoir van aviaire

Influenza Virus



Het influenzavirus heeft een eiwitmantel die bestaat uit twee eiwitten, hemagglutinine en neuraminidase. Deze eiwitmantel omgeeft het capsid waarin zich het genetisch materiaal van het virus bevindt. Hemagglutinine speelt een rol bij de binding van het virus aan de celmembraan. Neuraminidase speelt een rol bij het vrijkomen van het virus uit de cel.
(© Alila Sao Mai)

griepvirussen. Een enkele keer worden zoogdieren, waaronder ook mensen, door deze virussen geïnfecteerd.

Influenzavirussen worden ingedeeld op basis van een tweetal eiwitten aan hun oppervlak: hemagglutinine (HA of H) en neuraminidase (NA). Zestien HA-subtypen en negen NA-subtypen zijn bekend bij vogels. Deze tabel geeft de aviaire influenzavirus subtypes weer zoals die zijn gedetecteerd op Nederlandse pluimveebedrijven in de periode 2006-2011. Over het algemeen

ondervinden wilde vogels weinig last van een griepje onder de leden. In een pluimveestal met gedomesticeerde vogels gaat het echter af en toe grondig mis. Griepvirussen kunnen hun uiterlijk constant een klein beetje veranderen, soms om het immuunsysteem van hun gastheer te slim af te zijn, soms om zich aan te passen aan nieuwe omstandigheden. Zo kan in bedrijfspluimvee een ongevaarlijke, zogeheten laagpathogene influenzastam die afkomstig is van een wilde vogelpopulatie veranderen in een hoogpathogene variant die zich makkelijk verspreidt onder de nieuwe omstandigheden. De selectiedruk in bedrijfspluimvee bevoordeelt namelijk varianten van het virus die zeer snel en in veel weefsels repliceren, ook al doden ze daardoor hun kippengastheer. Kippen en kalkoenen worden dan massaal doodziek en sterven. Heel af en toe worden mensen ziek door infectie met vogelgriepvirus. Naast enkele beschrijvingen van infecties met laagpathogene virussen gebeurt dat vooral met de voor kippen hoogpathogene vorm. Sinds 2003 zijn wereldwijd bijna zeshonderd mensen – althans geregistreerd – geïnfecteerd met een hoogpathogene variant van het H5N1-virus, blijkt uit een recente analyse van de WHO in het wetenschappelijke tijdschrift Science (24 februari 2012). Zestig procent van de geïnfecteerden is overleden, voornamelijk in landen als Egypte, Vietnam, Indonesië en China.

Vogelgriep in Nederland

In 1926 al kampte Nederland met een vogelgriep-epidemie. Ongetwijfeld zal de ziekte ook daarna ons land hebben aangedaan. Doordat verschijnselen van een laagpathogene griep bij kippen, zoals

HA	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N?*	Totaal
H1	2				1					3	6
H2			2							1	3
H3										2	2
H4											
H5		1								10	11
H6	1				1					3	5
H7	1		1	2			4			4	12
H8				3						9	12
H9		3								1	4
H10							2			1	3
H11											
H12										1	1
H13											
H14										1	1
H15											
H16											
H?*		1								13	14
Totaal	4	5	3	5	2		6			49	74

Influenzavirussen worden ingedeeld op basis van een tweetal eiwitten aan hun oppervlak: hemagglutinine (HA of H) en neuraminidase (NA). Zestien HA-subtypen en negen NA-subtypen zijn bekend bij vogels. De tabel op pagina 12 geeft de aviaire influenzavirus subtypes weer zoals die zijn gedetecteerd op Nederlandse pluimveebedrijven in de periode 2006-2011 (bron CVI).

snotterigheid, niet erg specifiek en verontrustend zijn, zullen veel infecties onopgemerkt zijn gebleven.

In 2003 diende zich een hoogpathogene variant aan van H7N7, die uitmondde in een epidemie. Sindsdien wordt er in Nederland standaard gemonitord op vogelgriep, ook op laagpathogene varianten. Bovendien geldt een meldplicht bij verdenking van de ziekte. Met enige regelmaat worden pluimveebedrijven ontdekt waar een besmetting is opgetreden met een laagpathogeen vogelgriepvirus. Gemiddeld gebeurt dat zo’n elf keer per jaar, blijkt uit gegevens van de

Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA). In zo’n vier gevallen per jaar gaat het om een potentieel gevaarlijk H5- of een H7-virus. Na 2003 is Nederland gevrijwaard gebleven van hoogpathogene virussen. Om besmetting in Nederland te voorkomen werd zowel in 2005 als in 2006 een ophokplicht voor pluimvee ingesteld na melding van met H5N1 besmette trekvogels in Duitsland. Zowel professionele als hobbypluimveehouders moesten hun dieren binnenhouden of afschermen van de buitenwereld. In 2007 gebeurde dat nogmaals, na massale sterfte van kalkoenen door hoogpathogene H5N1 op een bedrijf in Engeland.

Eieren voor je geld

Vogelgriep vormt een bedreiging voor een sector die van groot economisch belang is voor Nederland. Pluimveebedrijven zijn goed voor een bruto productiewaarde van twaalfhonderd miljoen euro per jaar, rekent het productschap Pluimvee en Eieren (PVE) voor in het jaarverslag van 2011. Ongeveer 22 duizend mensen vinden werk in deze sector, bijvoorbeeld in slachterijen en in verpakkingsbedrijven.

De basis hiervoor wordt gelegd door ongeveer tweeduizend pluimveebedrijven met ruim vijfduizend werknemers. De omvang van deze bedrijven is erg verschillend; van enkele duizenden kalkoenen tot honderdduizenden legkippen. Hoewel pluimveebedrijven in alle delen van Nederland voorkomen, zijn er twee belangrijke concentratiegebieden: de Gelderse Vallei rondom Barneveld en het grensgebied van Brabant en Limburg in de buurt van Weert.

In Nederland leven volgens het Centraal Bureau voor de Statistiek (CBS) zo'n honderd miljoen kippen, ruim de helft daarvan zijn leghennen; iets minder dan de helft zijn vleeskuikens. Het aantal vleeskuikens is stabiel, het aantal legkippen groeit iets. Legkippen en vleeskuikens vormen de grootste diergroepen binnen de pluimveesector, het aantal kalkoenen en eenden in Nederland is naar verhouding bescheiden: ongeveer drie miljoen stuks op jaarbasis.

De vogelgriep-epidemie van 2003 had grote negatieve economische gevolgen voor de pluimveesector. Wekenlang lag de export plat. Zowel

het aantal bedrijven als het aantal kippen nam in korte tijd flink af. De directe schade door de vogelgriep, zoals bestrijdingskosten en compensatie van veehouders, bedroeg circa 300 miljoen euro; de vervolgschade door prijsdalingen en het verlies van exportorders liep waarschijnlijk tegen de miljard euro.

Inmiddels is die neergang in productie weer ingelopen. Het aantal pluimveebedrijven is weliswaar flink afgenomen; het aantal kippen (legkippen en vleeskuikens) zit echter weer op het oude niveau doordat bedrijven groter zijn geworden. De productie van eieren bereikte in 2011 met 10,6 miljard stuks zelfs een nieuw record. Ongeveer driekwart van die eieren gaat naar Duitsland en Engeland. Beide landen zijn ook de belangrijkste importeurs van Nederlandse vleeskuikens.

Werkgelegenheid in de Nederlandse pluimvee(vlees)- en eiersector

	2010		2011	
	vestigingen	werkgelegenheid	vestigingen	werkgelegenheid
Primaire productie	1.858	5.300	135	4972
Pluimveeslachterijen (incl. wildslachterijen)	32	1.813	31	1834
Be- en verwerkende bedrijven	147	3.025	128	2918
Groothandel*	983	12.562	984	12774
Totaal	3.020	22.700	1.278	22.498
* Groothandel in pluimvee, wild en gevogelte (niet levend) en eieren				

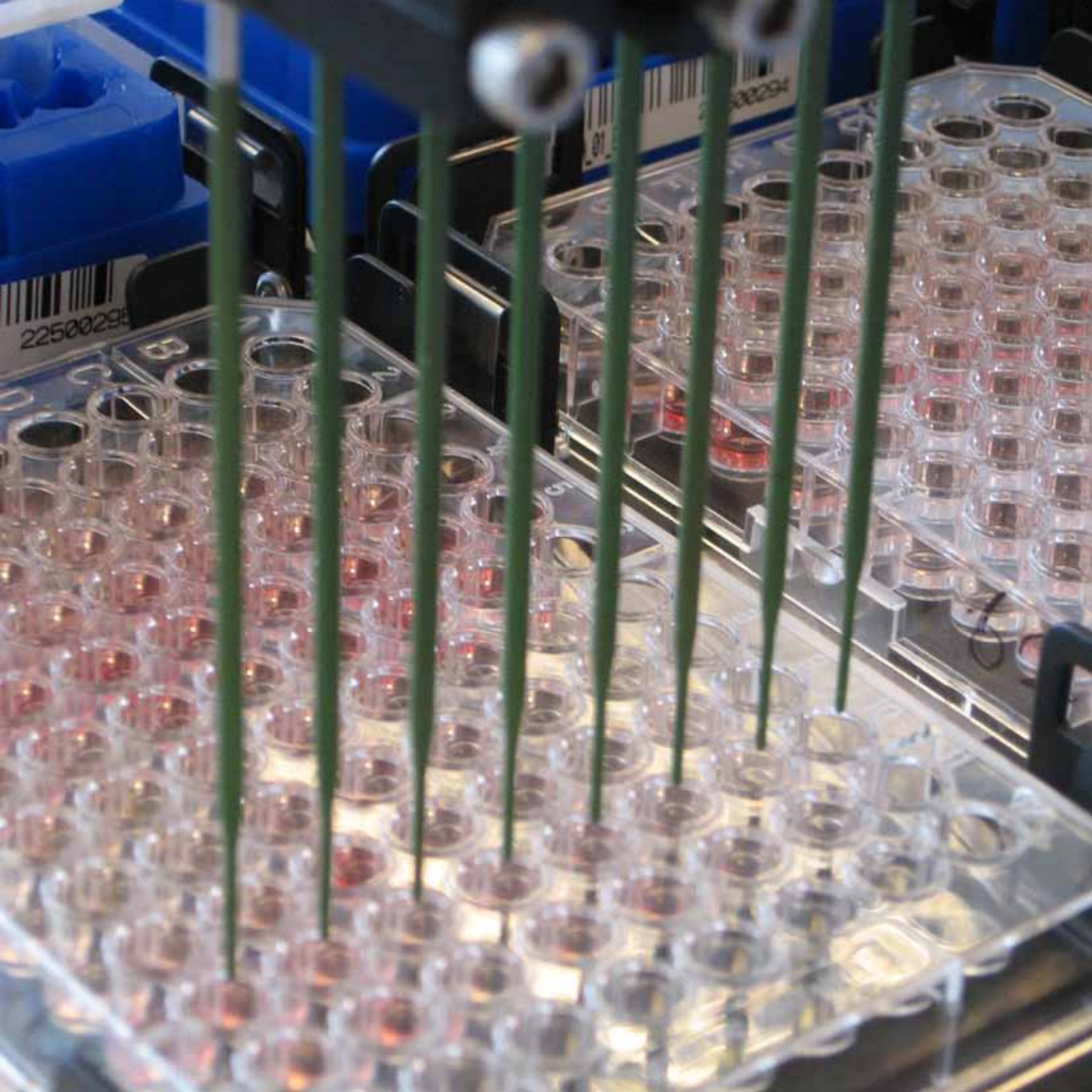
Bron: LISA/sociale zaken pluimveeindustrie

Aantallen pluimvee en bedrijven

	aantal dieren		aantal bedrijven	
	2010	2011	2010	2011
Vleeskuikens	44.500.000	45.000.000	647	638
Ouderdieren vleesras	4.100.000	4.300.000	244	233
Eenden	922.000	854.000	60	52
Kalkoenen	882.000	746.000	53	46
Leghennen	34.101.000	32.722.000	1131	1061
Totaal	84.505.000	83.622.000	2.135	2.030

Bron PVE, Koppel Informatiesysteem Pluimvee ('KIP')

Het belang van het pluimveebedrijfsleven in Nederland geïllustreerd aan de hand van het aantal bedrijven, het aantal werknemers en de aantallen dieren.



2

Van epidemie naar FES-AI



'Op vrijdagnacht 28 februari 2003 kregen we de monsters binnen. Zaterdag in de loop van de dag wisten we al dat het om een uitbraak van het H7-virus ging; zondag, om drie uur precies, was duidelijk dat het virus hoogpathogeen was. Althans, toen kwam de bevestiging. Een verrassing was het niet: de sterfte onder de kippen was namelijk groot; dat is een veeg teken,' vertelt Guus Koch van het CVI in Lelystad. Hij is nog altijd trots op het snelle werk in het voorjaar van 2003. 'Sindsdien hebben we qua methodiek niet veel kunnen verbeteren op het gebied van testen en diagnose.'



Overzichtskartaal met de AI verdenkingen en uitbraken op 14 april 2003 om 8.00 uur in de ochtend. (Bron: NVWA)

Foto links: Sectie op een verdachte zwaan. Om besmetting van de onderzoeker te voorkomen worden extra veiligheidsmaatregelen genomen. (© CVI)

Ook Thijs Kuiken herinnert zich deze periode nog goed. 'Het sectiebeeld van de gestorven kippen was indrukwekkend. Het was zo lang geleden dat klassieke vogelgriep in Nederland was vastgesteld en ik kende de ziekte alleen uit de boeken. De kippen zagen er indrukwekkend uit: door het oedeem waren hun koppen sterk gezwollen, het leken wel kikkers.'

Ondanks de snelle aanpak verspreidde het H7N7-virus zich als een bosbrand door de Gelderse Vallei en later ook naar andere delen van Nederland. Het was een race tegen een ziekte die zich al veel verder had verspreid dan aanvankelijk werd aangenomen. 'Daar waren we erg door verrast. Achteraf werd duidelijk dat het virus er vermoedelijk al een week zat,' aldus Koch. 'We hadden op een gegeven moment zes pluimveebedrijven in onderzoek, terwijl er al dertig waren geïnfecteerd, blijkt uit analyses die achteraf zijn gemaakt.' Vogelgriep was voor pluimveehouders en dierenartsen toentertijd een onbekende ziekte, iets van vroeger en van buiten onze landsgrenzen.

Aanvankelijk dacht de dierenarts die na twee dagen een bezoek bracht aan het getroffen bedrijf in Scherpenzeel aan een bacteriële besmetting. Hij adviseerde een monster naar de Gezondheidsdienst voor Dieren te sturen. Die testte op woensdag op *E. coli* en *Salmonella*; op donderdag op pseudovogelpest. Daarna kregen de onderzoekers argwaan; op vrijdag keken ze naar influenza. Koch: 'Toen hebben ze aan de bel getrokken.'

Opschalen van de bestrijding

Na dit voortraject waarin de diagnose werd gesteld volgde een reeks maatregelen om de ziekte in te dammen en uit te roeien, maatregelen die steeds verder moesten worden opgeschaald.

Dat gebeurde steeds volgens een vast stramien. Een getroffen bedrijf werd geruimd, net als omliggende pluimveebedrijven in een straal van 1 kilometer. In een straal van 10 kilometer gold een vervoersverbod voor pluimvee, eieren en mest, en al het pluimvee moest binnen worden gehuisvest.

Het pluimveebedrijf van Arie Schimmel in Renswoude was in 2003 een van de eerste besmettingsgevallen, ondanks alle hygiënemaatregelen die hij altijd in acht neemt, vertelt hij tegen de media. In de loop van de week begon de 'uitval' onder de kippen heel erg hoog te worden, schrijft *de Volkskrant*. 'Ze krijgen een piepende

Hoogpathogeen

Klassieke vogelpest wordt veroorzaakt door hoogpathogene influenzastammen. Deze behoren tot nu toe altijd tot de subtypen H5 of H7. Het virus veroorzaakt ernstige ziekte en plotselinge toename in sterfte.

Kenmerken:

- oedeem aan hoofd, aangezicht en nek
- onderhuidse bloedingen in poten, lellen en kam
- weefselsterfte
- luchtwegproblemen
- overvloedige traanvorming
- ontsteking bijholte van de neusholte
- diarree
- sloom
- ruw verenkleed
- eiproductiedaling

Laagpathogeen

De effecten van het laagpathogene virus variëren van zeer lichte verschijnselen tot ernstige ziekte.

Kenmerken:

- luchtwegbezwaren
- eiproductiedaling
- milde tot zware ontsteking van de luchtpijp
- longontsteking
- gezwollen kop

Als er hoge sterfte is bij een laagpathogene variant dan komt dit meestal door secundaire infecties. Het gevaar is altijd aanwezig dat deze laag-pathogene varianten kunnen veranderen in hoogpathogene varianten na introductie in kippen en kalkoenen.

ademhaling, gaan rochelen, en op een gegeven moment stikken ze,' aldus Schimmel. 'Een verschrikkelijk gezicht.'

Dat gaat de branche niet in de kouwe kleren zitten. Een jaar na de uitbraak constateert het RIVM dat een kwart van de pluimveehouders waar de dieren zijn geruimd nog zorgen heeft over het voortbestaan van hun bedrijf. Dat leidt tot veel stress. Bovendien heeft dan één op de zes behoefte aan aanvullende ondersteuning, hulp of zorg bij de verwerking van de vogelgriep epidemie.

Het crisisteam van het toenmalige ministerie van Landbouw in Den Haag en het CVI hadden te kampen met het snel opschalen van de ruiming en met onzekerheden over de precieze eigenschappen van de ziekteverwekker. 'Hoe belangrijk bijvoorbeeld is verspreiding via de wind, was een punt waar we uitvoerig over discussieerden. In de wetenschappelijke literatuur werd gesteld dat wind geen enkele rol speelt, maar dat was een stelling die slechts met anekdotes was onderbouwd. Nu weten we dankzij ons onderzoek dat wind wel degelijk van belang is bij de verspreiding van het virus,' aldus Koch.

Ook Marion Koopmans van het RIVM staat 28 februari nog goed bij. 'Dat betekende *alle hens aan dek* voor de infectieziektebestrijding van het RIVM. De datum staat bij ons in het geheugen gegrift omdat de WHO toentertijd ook net aankondigde dat er een vreemde uitbraak van longontsteking gaande was in China, de SARS-epidemie. Vanwege de kans op infectie van mensen met



Ruiming van kalkoenen na vogelgriepuitbraak in Egypte 2006
(©ChameleonsEye / Shutterstock.com)

vogelgriep werden ruimers en dierenartsen onderzocht. Al snel was het raak. Bij de mensen die betrokken waren bij de ruiming bleek opvallend vaak oogontsteking voor te komen waarin het virus werd aangetoond.'

Pas op 22 augustus kon minister Cees Veerman van Landbouw het sein *brand meester* geven. De schade was enorm. Er zijn 255 besmette pluimveebedrijven, voornamelijk in de Gelderse Vallei, geruimd. In totaal zijn 1.255 commerciële en ruim 17.000 hobbyhouderijen preventief geruimd. Al met al zijn zo'n 31 miljoen kippen, eenden en kalkoenen gedood. Het merendeel daarvan waren dieren die het risico liepen geïnfecteerd te worden. De schadepost voor de economie bedroeg honderden miljoenen euro's. In het Jeroen Bosch Ziekenhuis in Den Bosch stierf een dierenarts. In zijn longen werd het H7N7-virus gevonden, zeer waarschijnlijk de oorzaak van diens overlijden. Er meldden zich uiteindelijk 453 personen met



gezondheidsklachten, voornamelijk met oogvliesontsteking; bij 89 van hen werd het vogelgriepvirus aangetoond.

Soelaas

Na de epidemie van 2003 bestond er bij de ministeries van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit en Volksgezondheid, Welzijn en Sport behoefte aan meer kennis over de vogelgriep. Er waren veel vragen. Hoe komt het virus hier terecht, wat gebeurt er in een geïnfecteerde vogel, hoe toon je besmetting aan en hoe kun je de ziekte bestrijden? Kan bijvoorbeeld vaccinatie dan soelaas bieden? En hoe weet je of een vogelgriepvirus gevaarlijk is voor mensen? En op welke wijze moet dan bescherming worden geboden?

Momenteel geldt binnen de EU een verbod op het regulier vaccineren van vogels tegen vogelgriep. Wel kan een land besluiten tot noodvaccinatie, maar het geënte pluimvee mag niet naar het buitenland worden verhandeld. Aan de andere kant riepen de ruimingen van 2003 veel weer-

stand op in eigen land. Dat er twee jaar na de MKZ-crisis weer vrachtwagens bij boerderijen voorreden om gedode dieren af te voeren, was een grote schok voor veel Nederlanders. Is er werkelijk geen alternatief voor een dergelijke massavernietiging?

‘In Nederland was de schok groot, mede vanwege bezwaren tegen het vernietigen van gezonde dieren. De media-aandacht was enorm. Nederland is een dichtbevolkt land, dan hebben ruimingen een grote impact,’ aldus Koch. Bovendien was er de bedreiging voor de volksgezondheid. Die drijfveer voor meer wetenschappelijke input kreeg een extra lading door gebeurtenissen in het buitenland. In Azië zijn de afgelopen tien jaar honderden mensen gestorven aan een type



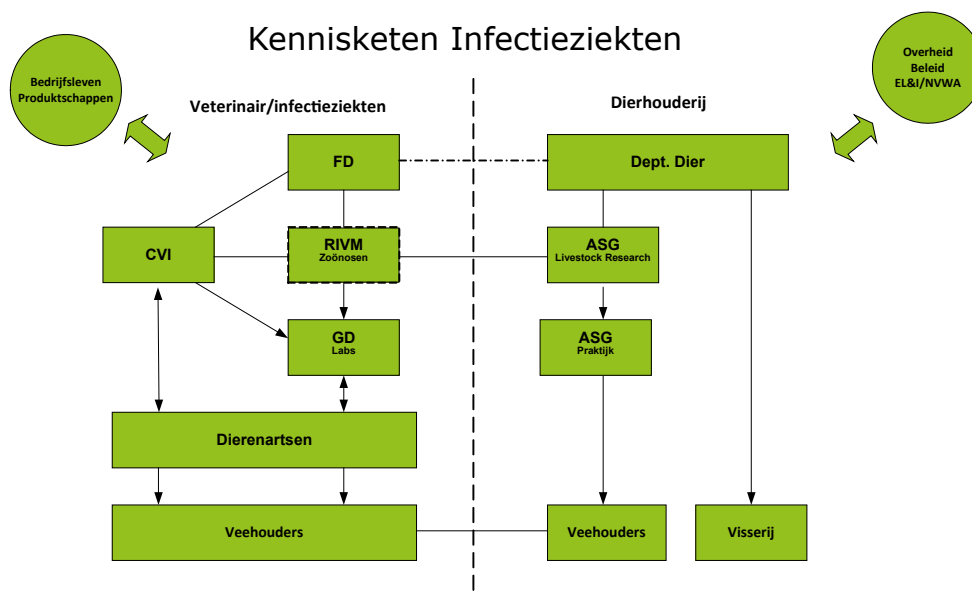
vogelgriep, H5N1, dat in 1997 voor het eerst opdook in Hong Kong. Op zich is dat al angstaanjagend genoeg, maar geluk bij een ongeluk is dat

deze virussen niet in staat zijn om zich tussen mensen te verspreiden. Onder virologen heerst echter de angst dat dat op termijn wel lukt; dat het vogelgriepvirus zich in de mens, of via tussen-gastheer het varken, ontwikkelt tot een menselijk griepvirus. Ook doordat verschillende griepvirussen die eenzelfde gastheer hebben geïnfecteerd soms genetisch materiaal uitwisselen, kan een nieuw influenzavirus ontstaan dat veel gevaarlijker is dan zijn beide voorouders. Het leed is dan niet te overzien: een wereldwijde pandemie ligt dan op de loer met mogelijk miljoenen doden, vergelijkbaar met de uitbraak van de Spaanse griep, begin vorige eeuw.

Deze angst vormde een belangrijke stimulans voor het opzetten van een omvangrijk onderzoeksprogramma naar vogelgriep, op het snijvlak van dier- en humane geneeskunde. Bijkomend punt, legt Rob Moormann van het CVI uit: 'In de veterinaire wereld zijn relatief weinig financiële middelen beschikbaar voor funderend onderzoek en vaccinontwikkeling. Met het nieuwe programma kon zo een enorme stimulans aan dit type onderzoek worden gegeven.'

Kennisketen

In september 2006 kreeg de Kennisketen Infectieziekten Dier (het samenwerkingsverband

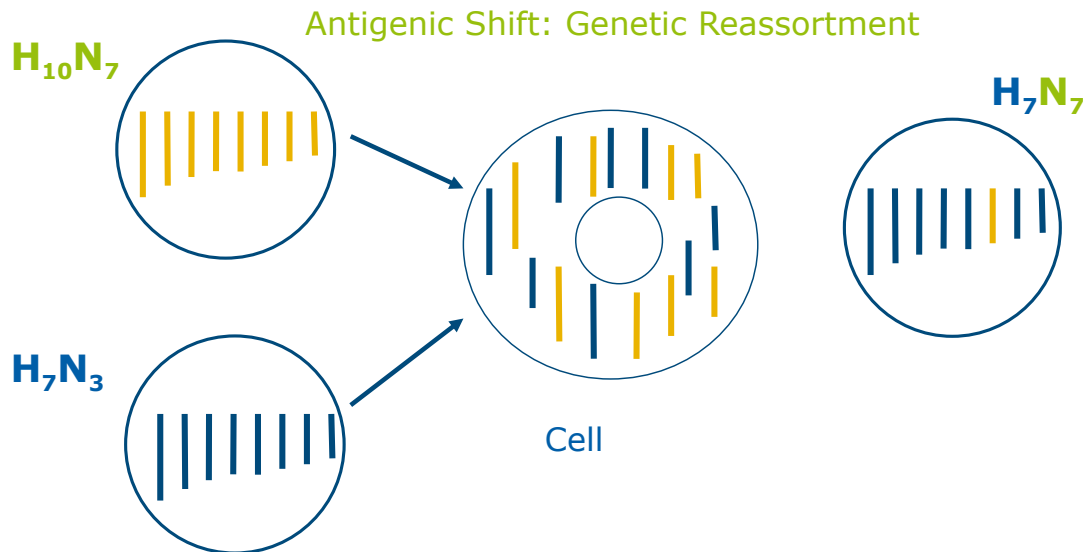


Het netwerk van kennisinstituten op het gebied van veterinaire infectieziekten en zoönosen in Nederland, samen de Kennisketen Infectieziekten Dier. FD: Faculteit Diergeneeskunde; GD: Gezondheidsdienst voor Dieren; CVI: Central Veterinary Institute; RIVM: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu; ASG: Animal Sciences Group

van CVI, Faculteit Diergeneeskunde en GD) voor vier jaar een bedrag van 15 miljoen euro toegekend uit de aardgasbaten, de zogeheten FES-gelden (Fonds Economische Structuurversterking) voor het onderzoeksprogramma Aviaire Influenza, het *Impulse Program on Avian Influenza*. Vanwege de risico's voor de volksgezondheid stapten ook het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en de afdeling Virologie van het Erasmus Medisch Centrum in.

De partners kregen als opdracht mee: het ontwikkelen van kennis over aviaire influenza, onder meer ten behoeve van de ontwikkeling van effectieve, efficiënte en veilige vaccins tegen vogelgriep plus de bijbehorende vaccinatiestrategieën om vogelgriepuitbraken te voorkomen,

evenals onderzoek naar de mogelijke preventie van een humane grieppandemie. Belangrijk hierbij is dat gevaccineerde dieren op basis van gerichte diagnostiek te onderscheiden zijn van geïnfecteerde dieren. De nieuwe vaccins moeten bovendien bij voorkeur snel en gemakkelijk toegediend kunnen worden. Daarnaast waren belangrijke neven doelstellingen het ontwikkelen van fundamentele kennis voor de bestrijding van vogelgriep en het bevorderen van de samenwerking tussen Nederlandse onderzoeksgroepen op het snijvlak van veterinaire en humane gezondheidszorg. Het project richtte zich dus niet alleen op het ontwikkelen van nieuwe vaccins. Voor uitroeiing



Reassortment, of de uitwisseling van RNA segmenten, kan optreden als twee griepvirussen één enkele gastheer cel infecteren en hun genetisch materiaal uitwisselen. Op deze manier kunnen er nieuwe virusstammen met nieuwe eigenschappen ontstaan. (Bron: CVI)

van het vogelgriepvirus moet vaccinatie worden ondersteund door regelmatige controle in het veld. Bovendien dient er rekening te worden gehouden met evolutie van het virus in verschillende gastheer. Daarom is niet alleen onderzoek naar de verspreiding van het virus wereldwijd, maar ook tijdens een uitbraak een belangrijk onderdeel van het project. Kortom, het FES-AI programma moest een mix zijn van fundamenteel onderzoek en het verwerven van praktische kennis over de epidemiologie die samen van belang kunnen zijn om een volgende uitbraak het hoofd te bieden. Er werden zeven werkgroepen ingesteld met een eigen aandachtsgebied. In oktober 2012 wordt het FES-AI programma afgerond met een symposium.

Belangrijke bijvangst

Naast nieuwe wetenschappelijke kennis en inzichten leverde het programma de afgelopen zes jaar ook een bijdrage aan de ontwikkeling van het veterinaire kennisveld in Nederland. Zo zijn onderzoekers uit de humane en veterinaire hoek, die elkaar en elkaars werkwijze, invalshoeken en inzichten slechts zijdelings kenden, nader tot elkaar gekomen. Dat is van groot belang omdat vogelgriep een dierziekte is met potentieel ernstige implicaties voor de volksgezondheid. Er zijn zeker 130 artikelen in internationale wetenschappelijke (top)tijdschriften verschenen of in voorbereiding. Het aantal bijdragen aan congressen en symposia is nog vele malen groter. Die output heeft een impuls gegeven aan de wetenschappelijke profilering van de deelnemende instellingen.

Het programma leverde bovendien een bijdrage aan de vorming van jonge onderzoekers. Mede dankzij het programma zijn zeven proefschriften tot stand gekomen. Enkele daarvan zijn door buitenlandse promovendi geschreven, wat bijdraagt aan het vormen van een internationaal netwerk van infectieziekteonderzoekers.

De onderzoeksgroep van de Universiteit Utrecht diende in 2011 een internationaal patent in op de productie van eiwitten van het influenzavirus (WO/2011/126370).



Moderne vaccinproductie waarbij influenzavirus gekweekt wordt in celkweken in fermentoren. (©Sanofi Pasteur)

3

Spuiten en sprayen



Vaccineren tegen vogelgriep is een hot item. Met inenten valt immers te voorkomen dat er bij een uitbraak van de ziekte heel veel pluimvee moet worden geruimd. Toch verbiedt de EU op dit moment actieve immunisatie. Alleen met speciale EU-toestemming mogen vaccins ingezet worden, maar er is met de bestaande diagnostische testen niet altijd onderscheid te maken tussen de antigenen in het bloed van gevaccineerde vogels en dat van besmette vogels. Dat geeft onduidelijkheid in de internationale handel. Landen zijn bang het vogelgriepvirus zo ongemerkt binnen te halen.

Individuele landen kunnen toestemming krijgen van de Europese Commissie om noodvaccinaties uit te voeren om de ziekte onder controle te krijgen. Geënte kippen mogen dan niet de grens over; hun vlees en eieren onder voorwaarden wel. 'In 2003 hebben we in Rotterdam permissie gekregen van de Europese Commissie om dieren-tuinvogels te vaccineren tegen H7N7,' vertelt Thijs Kuiken van het Erasmus MC. 'Zo konden we voorkomen dat die vogels afgemaakt moesten worden als de 2003-vogelgriep zich zou uitbreiden tot het gebied van Diergaarde Blijdorp en andere dierentuinen.'

In 2006 werd in Nederland hobbypluimvee op vrijwillige basis gevaccineerd, nadat in omliggende landen de vogelgriepvariant H5N1 was opgedoken; vanaf 2007 is dat ook gebeurd bij enkele vrije-uitloopbedrijven. De animo is vaak niet groot omdat bedrijven vervolgens moeilijker hun producten kunnen verhandelen.

Voor noodvaccinaties zijn goedgekeurde, maar weinig toegesneden vaccins beschikbaar die de farmaceutische industrie op de plank heeft liggen, maar waarvan onbekend is hoe effectief die zijn tegen actueel circulerende stammen. Deze klassieke vaccins zijn gebaseerd op onschuldige vogelgriepvarianten, bijvoorbeeld het H5N2-virus. De farmaceutische bedrijven claimen dat die vaccins desondanks bescherming bieden tegen een aantal virussen, maar het is niet duidelijk hoe effectief ze zijn bij het tegengaan van virusverspreiding en hoe lang de immuniteit aanhoudt. In Azië en Egypte bieden deze H5N2-vaccins al geen bescherming meer tegen bepaalde hoogpathogene H5N1-varianten.

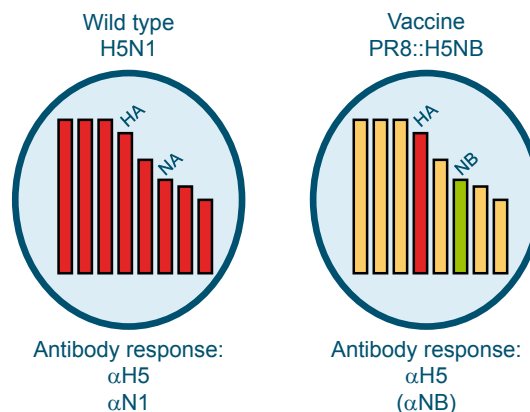
Bij de productie van het humane influenzavaccin wordt het vaccin elk jaar aangepast aan de virusvariant die waarschijnlijk de kop op zal steken. De vraag is of ook voor vaccinatie tegen vogelgriep gebruik kan worden gemaakt van zo'n vaccin dat aangepast is aan de actuele uitbraak-

stam. 'Wel is er in de veterinaire wereld minder geld beschikbaar voor vaccinontwikkeling', vertelt Rob Moormann van het CVI. 'Een humaan vaccin mag best iets kosten, een veterinair vaccin bijna niets. Dus is er weinig ruimte voor verdere ontwikkeling. Omdat de EU een non-vaccinatiebeleid hanteert, wordt ook de ontwikkeling van nieuwe, betere vaccins niet actief gestimuleerd. Veel omzet is er namelijk niet te verwachten. Met het FES-AI programma is geprobeerd dit dilemma te doorbreken door geld te investeren in een verdere technologische ontwikkeling van veterinaire influenzavaccins.'

DIVA

Voor de invulling van deze lacune in onderzoek en ontwikkeling bewandelden de betrokken onderzoekers meerdere wegen om tot betere vaccins te komen. Ze richtten zich daarbij op de hoogpathogene virussen H5N1 en H7N7. De nieuwe vaccins moeten snel zijn aan te passen aan de te verwachten vogelgriepstam. En eenvoudig toe te dienen, bijvoorbeeld via een spray of met het drinkwater.

Een ander belangrijk uitgangspunt is dat er onderscheid gemaakt moet kunnen worden tussen dieren die zijn besmet en dieren die zijn gevaccineerd. 'Het is essentieel voor dit zogeheten DIVA-principe – *Differentiating Infected from Vaccinated Animals* – dat er onderscheid valt te maken tussen antilichamen die zijn opgewekt door het vaccin en antilichamen die zijn aangemaakt na besmetting,' aldus Moormann.



Ontwikkeling van een vogelgriepvaccin: door in een onschuldige griepvirus (geel) (PR8 A/Puerto Rico/8/1934 H1N1) het hemagglutinine-eiwit (rood) van het gevaarlijke vogelgriepvirus, in dit geval H5 of H7, op te nemen wekt het vaccin bescherming op tegen vogelgriep.

Door ook een neuraminidase-eiwit (groen) van het niet bij vogels voorkomende influenzavirus type B op te nemen kan onderscheid worden gemaakt tussen gevaccineerde en geïnfecteerde dieren.

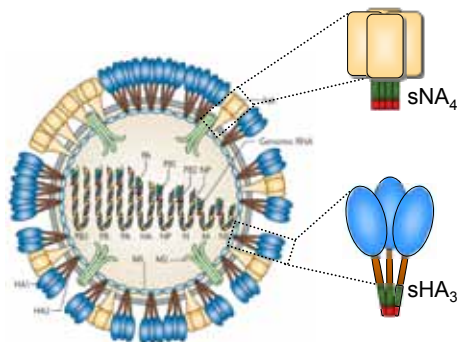
Geïnfecteerde dieren hebben wel antilichamen tegen het "rode" neuraminidase; gevaccineerde dieren alleen tegen het "groene" neuraminidase. (Bron: CVI)

Een DIVA-vaccin kan zo werken als een soort paspoort bij het vervoer van dieren over de landsgrenzen. Zo kan worden bewezen dat er, ondanks antilichamen in het bloed van de uitgevoerde vogels, zeer waarschijnlijk geen vogelgriep heerst in het land van herkomst. Voor Nederland als exportland – 70 procent van ons pluimvee gaat naar het buitenland – is dat van groot belang. Bij de ontwikkeling van geschikte vaccins in het kader van het FES-AI programma werden meerdere sporen gevolgd.

Eiwitvaccin

Eén daarvan is een spin off van fundamenteel onderzoek in het kader van FES-AI naar de rol van hemagglutinine, een eiwit aan de buitenkant van het vogelgriepvirus. 'Dat speelt een belangrijke rol bij het hechten aan en het binnendringen van de lichaamscellen van de gastheer,' zegt Lonneke Vervelde van de Universiteit Utrecht. 'Uit ons onderzoek blijkt bovendien dat het eiwit ook een rol speelt bij het op scherp zetten van het immuunsysteem van de gastheer.'

Vanuit deze wetenschap ontstond het idee dit eiwit te gebruiken als vaccin. Er wordt dan niet, zoals gebruikelijk, een heel afgedood virus ingespoten, maar alleen het hemagglutinine-eiwit, in een speciale vorm. Het lukte de onderzoekers insecten- en zoogdiercellen zo te dressereren dat ze deze eiwitproductie voor hun rekening namen. Deze cellen zijn genetisch veranderd waardoor ze hemagglutinine aanmaken in clusters van drie,



Influenza virus (schematisch)

Hemagglutinine en neuraminidase kunnen ook synthetisch geproduceerd worden en als vaccin worden toegepast.

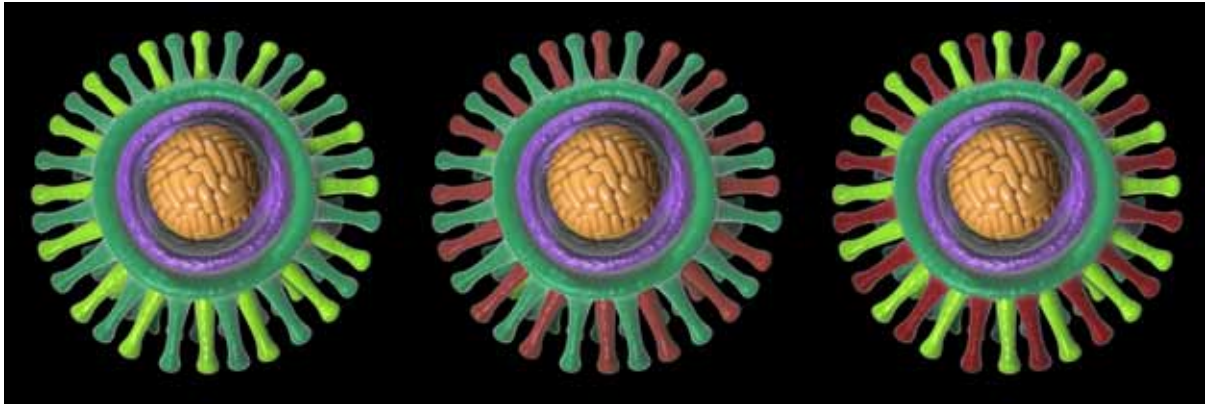
(Bron: Peter Rottier)



Klassieke vaccinproductie van influenzavirus in eieren.
(©CVI)

precies in de helixachtige trimeervorm zoals die op de buitenkant van het influenzavirus voorkomt. 'Wordt dit trimeereiwit ingespoten dan geeft dat bescherming tegen H5N1, niet alleen bij kippen maar ook bij bijvoorbeeld fretten en varkens,' zegt Peter Rottier van de Universiteit Utrecht. 'De dieren maken niet alleen beschermende antilichamen aan, ze blijven ook gezond bij blootstelling aan een virulente infectie.'

'Doordat de proefdieren alleen antistoffen aanmaken tegen het hemagglutinine-eiwit en niet tegen de andere viruseiwitten, is het DIVA-principe verzekerd,' aldus Rottier. 'Voordeel van deze aanpak is de eenvoud,' meent hij. 'Er is voor de productie van het vaccin geen virusmateriaal nodig, zoals bij de klassieke vaccinproductie. Gaat het bij de vaccinproductie om een influenzavirus dat heel pathogeen is, dan is het werken ermee niet van gevaar ontbloot.' Nadeel van een eiwitvaccin is de voorbereiding en de kweek van de cellen die het eiwit moeten produceren. Dat is momenteel nog wat ingewikkelder en prijziger dan de klassieke productie van vaccins in eieren.



Constructie van een DIVA vogelgriepvaccin: Wild vogelgriepvirus (links) wekt antilichamen op tegen zijn hemagglutinine-eiwit (groen). Door in het genoom van een onschuldig griepvirus het hemagglutinine-eiwit (rood) van een influenzavirus B stam die niet in vogels voorkomt (midden) te incorporeren ontstaat een vaccinstam (rechts) die antilichamen opwekt tegen het rode hemagglutinine. De antilichamen die door dit vaccin worden opgewekt, kunnen alleen maar opgewekt zijn door het neuraminidase-eiwit van het vaccin. Met een diagnostische test die specifiek antilichamen tegen neuraminidase van het veldvirus detecteert, kan vervolgens onderscheid worden gemaakt tussen gevaccineerde en besmette kippen.

Backbone

Binnen FES-AI is ook een tweede optie voor de ontwikkeling van een DIVA-vaccin nader uitgezocht. Deze is sterker gelieerd aan de klassieke bereiding van griepvaccins in kippeneieren. De virussen die zo zijn geproduceerd, worden na afdoden intramusculair toegediend, legt Moormann uit. 'Op dezelfde manier wordt ook het menselijke griepvaccin gemaakt.' Als basis werd een onschuldig griepvirus gebruikt – in labtaal bekend als A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 (PR8) – dat uitstekend groeit in eieren. De gestripte versie van dit virus, de *backbone*, is met *genetische technieken* ('knippen en plakken') opgetuigd met het hemagglutinine-eiwit van het vogelgriepvirus, in dit geval of H5 of H7. Ook is er een ander neuraminidase-eiwit aan bevestigd. Dit eiwit is niet afkomstig

van het vogelgriepvirus maar is geleend van een influenzastam die niet voorkomt bij vogels. Zo is het DIVA-principe gestalte gegeven. Ook dit vaccin vertoont, net als het eiwitvaccin, al na één keer inspuiten een zodanige immunrespons dat kippen volledig zijn beschermd tegen een infectie met virulent H5N1- of H7N7-virus. Een belangrijk aspect van deze vaccins, waarnaar nog verder onderzoek nodig is, is de breedte van de bescherming die ze bewerkstelligen tegen varianten van het H5- of H7-vogelgriepvirus. Waarschijnlijk zijn deze vaccins ook binnen twee maanden aan te passen aan andere varianten van het vogelgriepvirus.

Castellum

De twee vaccinkandidaten hebben beide commerciële potentie. De komende jaren worden ze



De speciale structuur van lama antilichamen maakt deze bijzonder geschikt voor toepassing in diagnostische testen. Daarom zijn in het onderzoek lama's geïmmuniseerd met eiwitten van het influenzavirus.

daarom doorontwikkeld en geëvalueerd binnen het Castellum-programma, een vervolg op het FES-AI programma. Het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw en Innovatie heeft hiervoor vijf miljoen euro uitgetrokken. In nauwe samenwerking met MSD Animal Health in Boxmeer, het voormalige Intervet, zal vaccinproductie verder worden ontwikkeld. Ook zal een vergelijking worden gemaakt qua kosten en effectiviteit. 'In de vier jaar dat het programma loopt kunnen wij een *proof of principle* leveren,' zegt Rottier over het eiwitvaccin. 'Voor vaccinatie-experimenten heb je aan milligrammen genoeg, voor de sprong naar commerciële vaccinproductie komt meer kijken.

Dan hebben we geschiktere cellen voor de weefselkweekproductie nodig.' Ook het CVI moet nog sleutelen aan de productie van zijn vaccinkandidaat. Uiteindelijk zal binnen Castellum een keuze worden gemaakt. Dat gebeurt op basis van de kosten, patentsituaties, DIVA-eigenschappen, productie-eigenschappen en natuurlijk de breedte van de bescherming en de duur daarvan.



Omdat het bij pluimveebedrijven veel werk is alle dieren in de hand te pakken en te injecteren, zou een andere toediening van een vaccin veel praktischer en betaalbaarder zijn. Zo worden kippen tegen pseudovogelpest vaak gevaccineerd via hun drinkwater of met een spray. Voor massapplicatie tegen griep ligt het ook voor de hand om te denken aan een spray waardoor dieren het vaccin binnenkrijgen via de ademhalingsorganen, waar ook het virus de aanval inzet. Beide vaccinkandidaten zijn daar nog niet klaar voor. Ook zijn er vraagtekens bij de veiligheid van zulke vaccins. Het immuunsysteem wordt bij deze wijze van



toediening onvoldoende getriggerd, zeker als de vaccinvirussen niet actief repliceren. 'Toch is dit idee nog niet verlaten', vertelt Vervelde. 'Ik denk nog altijd dat een spray-vaccin de beste optie is, maar daar moeten we nog meer fundamenteel onderzoek aan doen.'

Registratie

Of een van deze vaccins daadwerkelijk in de praktijk ingezet zal worden, is niet alleen afhankelijk van de kosten en van de effectiviteit. Dit hangt ook af van het belang dat de nationale en internationale beleidsmakers hechten aan het DIVA-principe. Is de meerwaarde daarvan voldoende duidelijk om handelsbelemmeringen te (willen) doorbreken? Internationale organisaties als de VN, alsmede Europese landen, Japan en de VS propageren deze vaccin-aanpak, maar in belangrijke vogelgrieplanden als Indonesië, Vietnam en China

wordt intensief gevaccineerd zonder DIVA-principe. Niet alleen wordt daar breed gedacht dat dergelijke incomplete vaccins minder goed werken, maar bovendien ontbreekt het aan de benodigde infrastructuur, geld, mankracht en overzicht om tot goede controle te komen. Probleem bij nieuwe vaccins vormt ook het registratietraject. Dat duurt voor een veterinair vaccin momenteel zo'n vijf jaar, langer dan de gangbare drie jaar dat een nieuw vaccin meegaat. Humane griepvaccins daarentegen kunnen al in negen maanden tot een jaar worden aangepast aan nieuwe circulerende stammen. Zo'n versnelde procedure zou ook voor veterinaire vaccins mogelijk moeten zijn, vindt Koch. Die zou ook de deur openzetten voor het maken van vaccins op basis van de te verwachten vogelgriepvariant die naar Europa komt.



De actuele situatie van vogelgriep wordt wereldwijd bijgehouden. Op de kaart de gerapporteerde AI-uitbraken augustus 2011 – augustus 2012. (Bron: ProMed)

4

Van trekvogel naar kip



Naast vaccinontwikkeling als belangrijk speerpunt, was er binnen FES-AI ook aandacht voor de verspreiding van vogelgriepvirussen, de wijze waarop pluimveebedrijven besmet raken, de surveillancemogelijkheden, de maatregelen om een uitbraak in te dammen en de te ondernemen stappen om besmetting van mensen te voorkomen. Aan de basis daarvan staat een beter begrip van vogelgriepvirussen in de natuur.

'We wisten niet alleen weinig van het H5N1-virus,' zegt Thijs Kuiken van het Erasmus MC, 'maar ook over alle andere, laagpathogene vogelgriepvirussen die vooral in wilde vogels circuleren, bestond onvoldoende kennis. Dankzij FES-AI konden we de expertise van virologen en pathologen samenbrengen.'

Influenza bij de mens is grotendeels een ademhalingsziekte, maar in met H7N1 besmette kippen worden ook andere organen dan de ademhalingsorganen aangetast. Zelfs al is dat virus laagpathogeen. 'Dat was een flinke verrassing,' legt Lonneke Vervelde van de Universiteit Utrecht uit. 'Het virus wordt, nadat het in de longen terecht is gekomen, binnen een week verspreid naar andere organen in de kip, inclusief hart en hersenen.'

Wilde eenden daarentegen vertoonden na besmetting geen klinische verschijnselen en het virus bleef bij deze vogels beperkt tot de ademhalingsorganen. 'De ene vogel is dus de andere niet,'

aldus Kuiken. Eenden waren onderwerp van studie omdat verschillende soorten over grote afstanden migreren tussen Azië – het herkomstgebied van H5N1 – en Europa. Het ontbreken van klinische verschijnselen bij de wilde eend gaat gepaard aan een hoge virusuitscheiding. Dat maakt deze soort, in tegenstelling tot bijvoorbeeld de kuifeend die wel neurologische afwijkingen krijgt, een potentieel geschikte verspreider van H5N1.



Uitloopbedrijven

Dat wilde vogels de besmetting overbrengen op pluimvee lijkt op basis van het FES-AI onderzoek erg waarschijnlijk, ook al is de bewijsvoering nog altijd 'circumstantial'. 'Wel is het opvallend dat de laatste jaren vooral uitloopbedrijven worden getroffen door infecties met (laagpathogene) vogelgriepvirussen,' constateert Guus Koch van het CVI. 'Uit de analyses die we hebben gedaan van de uitbraken tussen 2004 en medio 2010 blijkt dat dieren op uitloopbedrijven elf keer vaker worden geïnfecteerd. Dat klopt met de hypothese dat wilde vogels de bron zijn. Je kunt je voorstellen dat kippen die buiten lopen meer contact hebben met wilde vogels of met de poep van wilde vogels.'

Mede op grond van de FES-AI resultaten is een surveillanceprogramma opgezet om te waarschuwen voor de komst van vogelgriepvirussen. Dat is onderdeel van het wildziekten surveillance-pro-

gramma van het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC). Dit onderzoek, dat doorgaans gebeurt aan de hand van dood gevonden of geschoten dieren, beperkt zich voor wat betreft vogelgriep niet alleen tot wilde vogels. Ook roofdieren worden onder de loep genomen. Onderzoek wees namelijk uit dat vossen die eten van karkassen van met H5N1-virus geïnfecteerde vogels een infectie kunnen ontwikkelen en vervolgens het virus uitscheiden en dus kunnen verspreiden, bijvoorbeeld naar pluimveebedrijven.

In andere Europese landen is een vergelijkbaar surveillance-programma opgezet. Daardoor is het mogelijk de komst van potentieel gevaarlijke virus-subtypes als H5N1 'aan te zien komen' uit Azië en Oost-Europa. 'Als je meer H5N1-virus tegenkomt in wilde vogels in Polen of Duitsland bijvoorbeeld, dan zou je preventiemaatregelen kunnen nemen. Bijvoorbeeld ophokken, het sluiten van kippenrennen, om contact te voorko-



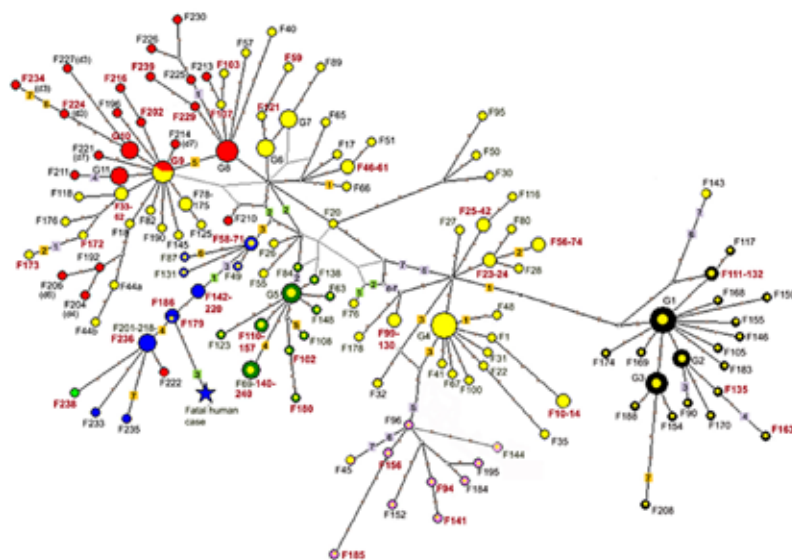
De risico's van virusoverdracht tussen wilde vogels en bedrijfspluimvee in beeld gebracht. Foto: Jeanet van der Goot (CVI).

men,' aldus Kuiken. 'We weten nu veel beter dan vroeger welke wilde vogelsoorten een risico vormen en in welke tijd van het jaar, zodat de preventiemaatregelen veel gericht(er) uitgevoerd kunnen worden.'

Hygiëne

Een gedetailleerde analyse van de uitbraak in 2003 met hoogpathogeen H7N7 leverde de afgelopen jaren veel nieuwe inzichten op over de verspreiding van het vogelgriepvirus. Zo was bijvoorbeeld niet goed bekend hoe het virus overspringt van bedrijf naar bedrijf, hoe en op

welk moment dat gebeurt, hoe effectief hygiëne-maatregelen zijn, en hoe en wanneer ook mensen besmet raken. 'Deze epidemie was een van de grootste uitbraken ter wereld waarbij ook transmissie naar de mens optrad. We hebben er daarom veel van kunnen leren,' zegt Marion Koopmans van het RIVM. 'In totaal zijn 89 mensen besmet geraakt, van wie er één overleed. Aan de hand van de humane en veterinaire gegevens die we gezamenlijk binnen FES-AI hebben verzameld, hebben we de epidemie in 2003 nog eens goed tegen het licht gehouden.'



Door het genetisch materiaal van de geïsoleerde vogelvirussen volledig in kaart te brengen kan de verwantschap tussen deze virussen worden vastgesteld. Daarmee kunnen ook de routes die het virus gevolgd heeft worden vastgesteld. Hoe korter de afstand tussen twee virussen, hoe meer verwant ze zijn. Bron: Evolutionary analysis of inter-farm transmission dynamics in a highly pathogenic avian influenza epidemic. Bataille A, van der Meer F, Stegeman A, Koch G; PLoS Pathog. 2011 Jun;7(6):e1002094. Epub 2011 Jun 23.

Zo is de route bepaald die het virus aflegde van bedrijf naar bedrijf. Daarvoor is gebruik gemaakt van de virussen die geïsoleerd zijn op 241 besmette pluimveebedrijven. Doordat het virus elke dag een klein beetje muteert, is aan de hand van kleine veranderingen in de gensequentie, de volgorde van de basen in het erfelijk materiaal, te achterhalen vanuit welke bron bedrijven zijn geïnfecteerd. 'Zo hebben we een infectieboom opgesteld,' legt Arjan Stegeman van de Universiteit Utrecht uit.

Eierophalers

Ook is gekeken aan de hand van uitgebreide vragenlijsten en interviews welke contacten er zijn geweest tussen pluimveebedrijven, met name in de concentratiegebieden als de Gelderse Vallei en Noord-Limburg. Bovendien werd achterhaald welke routes landbouwvoorlichters, dierenartsen, voerleveranciers en eierophalers in die periode hebben gebruikt. Daarnaast zijn de werkzaamheden in kaart gebracht van de duizenden mensen die aan de ruimingen hebben meegedaan, plus de wijze van bescherming. Deze gegevens zijn gecombineerd met de gevonden infectieboom. Uit de infectieboom kan ook worden afgeleid welke bedrijven dezelfde of zeer nauwverwante virussen hadden. Door de contactgegevens er naast te leggen kan worden vastgesteld welke activiteit het virus heeft overgebracht. 'Zo is na te gaan wie, waar is geïnfecteerd en welke werkzaamheden toen werden verricht,' vertelt Koopmans. 'Dat bewijst dat mensen die rechtstreeks met de dieren werkten, zoals de ruimers en de dierenartsen, een besmettingsrisico vormen. Zij hadden drie maal zo

vaak infecties en klachten als andere mensen in de pluimveeketen. Dat pluimveehouders op besmette bedrijven vaak oogklachten kregen, was in 2003 al aangetoond. Hoe mensen precies die infectie oplopen is niet duidelijk, maar direct contact met pluimvee en de mest geeft een verhoogd risico. Het lastige daarbij is dat het infectierisico het grootst is in de week voordat de kippen echt ziek worden. Op het moment dat ergens een besmetting wordt geconstateerd, moeten dan ook alle signalen op rood komen te staan.'

Toch is de overdracht van bedrijf naar bedrijf slechts zelden gebeurd door mensen die in de bestrijding werkten. De hygiëne-maatregelen werkten blijkbaar goed, concludeerden de onderzoekers. De overdrachtskans was wel aanzienlijk bij eierophalers, voedertrucks en dergelijke. Het grootste deel van de infecties kan daarmee echter nog steeds niet worden verklaard. Een deel van de infecties werd door de wind overgebracht, maar voor het grootste deel van de infecties is onduidelijk welk contact verantwoordelijk is geweest voor de overdracht.

Mutaties

'Op grond van alle bevindingen zouden de veiligheids- en hygiënemaatregelen moeten worden aangescherpt,' vindt Koopmans. 'Zodra de verdenking bestaat dat een bedrijf besmet is, moeten bezoekers oog- en mondbescherming dragen. Uit onderzoek in 2003 blijkt dat dat er weleens bij in schiet. Bovendien dienen ze een virusremmer, zoals Tamiflu, te slikken én gevaccineerd te zijn tegen de seizoensgriep. Dat laatste om de kans te

verkleinen dat in het lichaam tegelijkertijd twee influenzavirussen actief zijn, wat zou kunnen leiden tot uitwisseling van genetisch materiaal. Ook moet het virus op de voet worden gevolgd. Gaandeweg een epidemie kunnen mutaties ontstaan waardoor het risico voor de ruimers toeneemt. Zo'n virus kan veranderen waar je bij staat. Je moet je je steeds afvragen wat die veranderingen voor gevolgen hebben voor infectierisico's van mensen. In 2003 heeft zo'n gemuteerd virus geleid tot de dood van een dierenarts. Tijdens een uitbraak kan een continue virologische surveillance laten zien wat er genetisch met het virus gebeurt, bijvoorbeeld of het niet aan het veranderen is in een type dat dieper doordringt in de longen.' Inmiddels is daarvoor in Nederland een snelle methode ontwikkeld die *real time* monitoring mogelijk maakt. Ook zijn testen ontwikkeld waarmee snel antistoffen kunnen worden aangetoond tegen allerlei verschillende influenzavirussen bij mensen en bij pluimvee. Daarmee is het mogelijk om periodiek te monitoren of mensen die veel met pluimvee in contact komen infecties doormaken.

Windrichting

Hoewel in de wetenschappelijke literatuur de rol van de verspreiding van het vogelgriepvirus via de lucht werd gebagatelliseerd, blijkt uit het FES-AI onderzoek naar de transmissieroutes in 2003, dat in gebieden waar pluimveebedrijven dicht bij elkaar liggen wind wel degelijk een rol kan spelen. Die verspreiding gebeurt waarschijnlijk hoofdzakelijk via besmet stof. Door de genetische en epidemiologische gegevens over besmettingen te



combineren met meteorologische data blijkt dat zo'n 20 tot 30 procent van de besmettingen in 2003 valt te verklaren vanuit de heersende windrichting. Dat is waarschijnlijk een conservatieve schatting. Daaruit concluderen de onderzoekers dat stofdeeltjes met virusmateriaal vanuit een besmette kippenboerderij naar een schoon bedrijf geblazen kunnen worden over een afstand van enkele kilometers.

Die wetenschap heeft consequenties voor het geval de nood weer aan de man komt. Koch: 'Je zou bedrijven die in de week voorafgaand aan de detectie van de besmetting benedenwinds lagen van een geïnfecteerd bedrijf bij het ruimen prioriteit kunnen geven ten opzichte van bedrijven die in diezelfde periode bovenwinds lagen.'

Surveillance

Om te voorkomen dat het zover komt, is het zaak te zorgen voor een optimale surveillance op laagpathogene vogelgriepvirussen in Nederland, menen de FES-AI onderzoekers. Een mogelijke besmetting met vogelgriep van het subtype H5 of

H7 is sinds 2005 aangifteplichtig. Een boer die verdachte verschijnselen ziet, zoals luchtweginfecties of een gedaalde eiproductie, moet aan de bel trekken. Bovendien worden momenteel op alle pluimveebedrijven in Nederland minstens één keer per jaar bloedmonsters genomen; op uitloopebedrijven gebeurt dit vier keer per jaar.

Analyse van dergelijke surveillancesystemen in de EU toont aan dat infecties met vogelgriep in kippen en kalkoenen gemakkelijk gemist kunnen worden als gevolg van een lage prevalentie op



Vogelgriep kan opgespoord worden door antilichamen tegen het virus in de dooier te detecteren. De kippen hoeven dan niet meer handmatig te worden bemonsterd. Om dit grootschalig te kunnen uitvoeren is deze robot ontwikkeld. Foto: Armin Elbers (CVI)

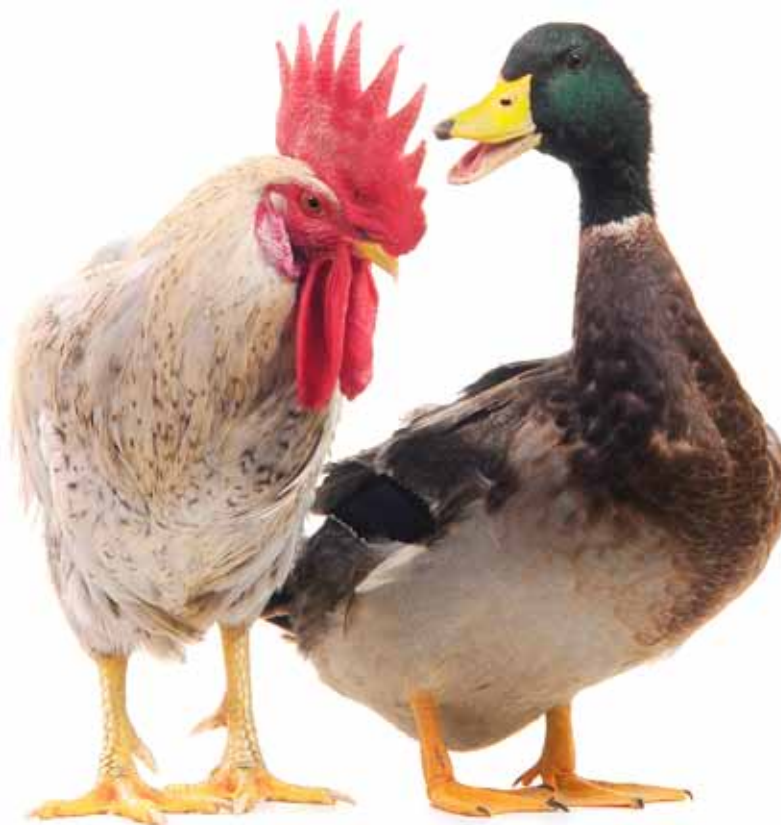
geïnfecteerde bedrijven. 'Verhogen van het aantal monsters, maar vooral verhoging van de frequentie van monstername in de risicogebieden is dan ook nodig', meent Stegeman. Daarvoor is een alternatieve methodiek ontwikkeld, gebaseerd op de detectie van antilichamen tegen het virus in de dooiers van eieren. Van elk pluimveebedrijf worden op een eierpakstation een aantal eieren verzameld die worden geanalyseerd door een daarvoor ontwikkelde robot. 'Er hoeft dan geen dierenarts meer op bezoek te gaan bij het te controleren bedrijf, waardoor de in- en uitsleep van virussen wordt beperkt. De eieren worden immers toch al opgehaald. Als ik elke keer tien eieren voor de analyse gebruik, dan kan ik bovendien een bijna continue monitoring uitvoeren. Wij hebben dat systeem gevalideerd. Beleidsmakers moeten nu over de invoering beslissen,' aldus Stegeman.

Model

Gaat het toch mis, krijgt Nederland te maken met een uitbraak van een hoogpathogeen vogelgriepvirus, dan kan voor de aanpak worden teruggegrepen op de ervaringen die in het buitenland en binnen FES-AI zijn opgedaan. Op basis van alle wetenschappelijke gegevens die naar boven zijn gekomen, is door de onderzoekers een model ontwikkeld dat de verspreiding van zo'n hoogpathogeen virus tussen pluimveebedrijven beschrijft. Dat model kan een nuttig instrument zijn bij het kiezen en evalueren van bestrijdingsmaatregelen. De algemene opinie is dat als de nood weer aan de man komt, een palet aan maatregelen zal worden ingezet om de uitbraak in te dammen.

'In vergelijking met mond-en-klauwzeer en klas-sieke varkenspest verspreidt vogelgriep zich een stapje sneller,' vertelt Stegeman. 'Met de vaccins die voorhanden zijn, blijf je de epidemie niet voor. Zolang we kippen in Nederland niet preventief, profylactisch, vaccineren, komen we nooit van de ruiming af. Sowieso is het onvermijdelijk dat je besmette bedrijven moet ruimen. Waar we vanaf willen, is het ruimen van niet-besmette bedrijven,

bijvoorbeeld door een combinatie van vaccinatie en strakke hygiënemaatregelen om transmissie te voorkomen. Dan moet je wel een vaccin hebben dat snel werkt, waarmee je bijvoorbeeld in de concentratiegebieden preventief gaat vaccineren als in Duitsland vogelgriep uitbreekt.'



Interview

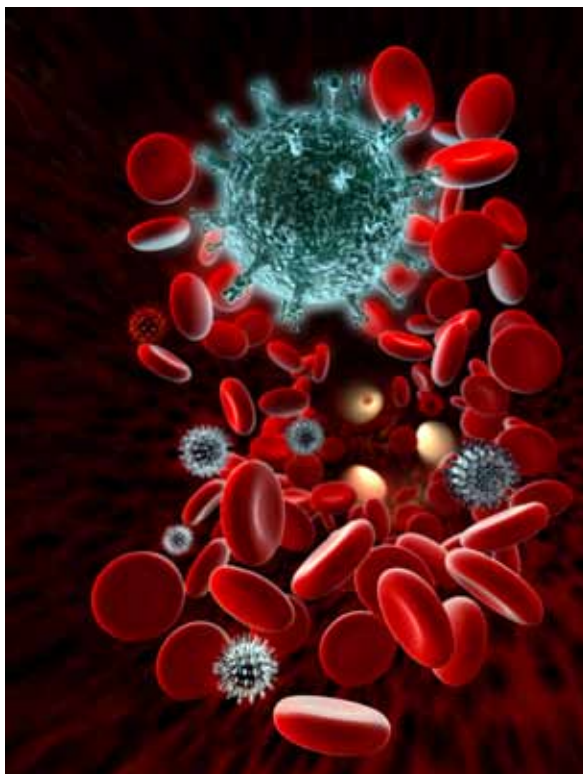
Guus Koch: Feilloos detecteren

Dr. Guus Koch is biochemicus. Sinds 1983 werkt hij bij het CVI in Lelystad. Eerst als immunoloog, later als viroloog. Koch is projectleider van het FES-AI onderdeel Diagnostiek.

Koch: 'Vaccinatie van pluimvee met een afgedood, inactief vaccin of met een eiwitvaccin zou kunnen worden gebruikt als aanvullende maatregel om verspreiding van vogelgriepvirus in kippen te voorkomen en daarmee ook de overdracht naar mensen. Gevaccineerde kippen kunnen vaak nog wel geïnfecteerd worden, ze worden daar echter zelden ziek van. Zo kunnen ze het virus ongemerkt verspreiden. Dit wordt versterkt doordat influenzavirussen gemakkelijk muteren. Ze breken dan door de weerstand die door vaccinatie is geïnduceerd. Om te onderzoeken of virus circuleert in gevaccineerde koppels is het belangrijk om geïnfecteerde van gevaccineerde kippen te kunnen onderscheiden. Zo valt te voorkomen dat het gemuteerde virus wordt verspreid. Worden gewone vaccins (zonder DIVA) ingezet dan lukt dat bijna niet. Een gevaccineerde kip maakt dan namelijk antistoffen aan die niet te onderscheiden zijn van de antistofrespons ten gevolge van een besmetting met het echte virus. Er zijn daarom geavanceerde DIVA-vaccins ontwikkeld (zie interviews Moormann en Rottier) die zo zijn

ontworpen dat het immuunsysteem van een gevaccineerde kip geen antistoffen maakt tegen het eiwit (antigeen) waarop later wordt getest; de geïnfecteerde kip doet dit wel.

Bij het CVI hebben we diagnostische testen ontwikkeld waarmee snel onderscheid valt te maken tussen geïnfecteerde en gevaccineerde kippen. Die testen zoeken naar antistoffen tegen het neuraminidase-eiwit op de mantel van het virus dat wordt aangemaakt als gevolg van infectie maar niet bij vaccinatie. Daarvoor gebruiken we de ELISA-techniek, een standaard laboratoriumtest die, als antistoffen aanwezig zijn, een kleurreactie op gang brengt. Er zijn negen verschillende neuraminidase-eiwitten. Er zijn dus ook negen testen ontwikkeld voor al die N-eiwitten zodat we zijn voorbereid op alle mogelijke vogelgriep types die in pluimvee en vooral wilde watervogels kunnen circuleren. Er zijn met deze DIVA-testen in het laboratorium proeven gedaan bij honderden kippen en andere vogels, een deel gevaccineerd met DIVA-vaccin en een deel



Virus in bloedbaan

geïnfecteerd met vogelgriepvirus. Met die geavanceerde ELISA-test zijn geïnfecteerde dieren feilloos te detecteren.

In het kader van het FES-AI onderzoeksprogramma hebben we ook gezocht naar een snellere en simpele detectiemethode om direct op een pluimveebedrijf vast te kunnen stellen of er vogelgriep heerst. Zo'n simpele test zou de nu gebruikte, tijdrovende PCR-techniek kunnen vervangen, was de hoop. Voor een PCR-test is

dure apparatuur nodig in een goed geoutilleerd laboratorium. Zeker in landen als Vietnam en Indonesië waar laboratoria op grote afstand staan en het soms weken duurt voor de uitslag er is, zou het een doorbraak zijn als ter plekke te zien is wat er met de zieke kippen aan de hand is. Er zijn enkele alternatieve technieken ontwikkeld en uitgetest maar die bleken niet goed genoeg te werken: ze zijn minder specifiek en minder gevoelig dan de PCR-methode.'

Referenties

- Bataille A, van der Meer F, Stegeman A, Koch G. Evolutionary analysis of inter-farm transmission dynamics in a highly pathogenic avian influenza epidemic. PLoS Pathog. 2011 Jun;7(6): e1002094.
- De Jong MC, Stegeman A, van der Goot J, Koch G. Intra- and interspecies transmission of H7N7 highly pathogenic avian influenza virus during the avian influenza epidemic in The Netherlands in 2003. Rev Sci Tech. 2009 Apr;28(1):333-40.
- Koch G, Steensels M, van den Berg T. Vaccination of birds other than chickens and turkeys against avian influenza. Rev Sci Tech. 2009 Apr; 28(1):307-18.

Interview

Rob Moormann: Klassieke vaccins

Prof. dr. Rob Moormann is moleculair bioloog. Sinds 1983 doet hij bij het CVI in Lelystad onderzoek op het gebied van de veterinaire virologie. Daarnaast is hij sinds 2007 deeltijd-hoogleraar vaccinologie van virale zoönosen aan de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Moormann is projectleider van het FES-AI onderdeel Vaccinontwikkeling.

Moormann: 'Onderzoekers bij het CVI in Lelystad hebben een modern vaccin tegen vogelgriep ontwikkeld dat voldoet aan het zogeheten DIVA-principe. DIVA staat voor *Differentiating Infected from Vaccinated Animals*. Hiermee is te zien of antilichamen in dieren zijn veroorzaakt door vaccinatie of door infectie. Deze DIVA-techniek is in de jaren tachtig van de vorige eeuw bij het CVI ontwikkeld om de ziekte van Aujeszky bij varkens uit te roeien. Vaccins, zo is het idee, zijn te gebruiken als ondersteuning bij een virusuitbraak om verdere verspreiding in te dammen, bijvoorbeeld door een noodvaccinatie rondom een besmet pluimveebedrijf. Het duurt dan ongeveer twee weken voordat voldoende immuniteit is opgebouwd. In die periode kunnen kippen nog steeds besmet raken. Als er wordt gevaccineerd met de huidige vaccins zijn gevaccineerde en geïnfecteerde kippen niet van elkaar te onderscheiden. Beide hebben vergelijkbare antilichamen in het bloed. Met DIVA-vaccins is dat onderscheid wel te maken. Zitten er geen geïnfecteerde kippen tussen gevaccineerd pluimvee dan is de uitbraak

onder controle. Twee eiwitten op de buitenmantel van het influenzavirus doen het eigenlijke werk: zij zetten het immuunsysteem aan tot de productie van antilichamen. Het belangrijkste is het hemagglutinine-eiwit (H). Daarnaast is er het neuraminidase-eiwit (N) dat veel minder van belang is voor bescherming, het wekt nog wel antilichamen op.

Bij de bouw van het DIVA-vaccin zijn in het genetische materiaal van het influenzavirus veranderingen (modificaties) aangebracht. In dit geval is een geavanceerde aanpak gevolgd die vergelijkbaar is met de moderne productie van het menselijke griepvaccin. Als basis is een onschuldig griepvirus gebruikt – in labtaal bekend onder de naam A/Puerto Rico/8/1934 H1N1 (PR8) – dat uitstekend groeit in eieren. Een gestripte versie ervan, de *backbone*, is met genetische technieken voorzien van het hemagglutinine-eiwit van het relevante vogelgriepvirus, in dit geval van de gevaarlijke H5- of H7-stam, plus het neuraminidase-eiwit. Dit laatste is echter niet afkomstig van



het vogelgriepvirus maar van een menselijke influenzastam die niet voorkomt in vogels. Dit geeft het DIVA-principe gestalte. De antilichamen die dit oplevert, kunnen alleen maar opgewekt zijn door het neuraminidase-eiwit van het vaccin. Met een diagnostische test die specifiek antilichamen tegen neuraminidase van het veldvirus detecteert, kan vervolgens onderscheid worden gemaakt tussen gevaccineerde en besmette kippen. Het vaccinvirus dat zo genetisch is veranderd, kan in eieren of in celweken op grote schaal worden vermenigvuldigd voor de productie van vaccins. Het uiteindelijke vaccin ontstaat na doding van het virus en toevoeging van een zogeheten adjuvans, een stof die de reactie van immuunsysteem versterkt. In het kader van het FES-AI programma zijn er in het laboratorium twee vogelgriepvaccins gemaakt: één biedt bescherming tegen H5-virussen en één tegen H7-virussen. Beide bieden

effectieve bescherming na eenmalige injectie in de spieren, blijkt uit onderzoek in kippen. In het inmiddels begonnen vervolgproject Castellum zullen deze prototypevaccins verder worden ontwikkeld.' (Zie ook interview Rottier)

Referenties

- Van Wielink R, Harmsen M, Martens D, Peeters, B, Wijffels, R, Moormann, R. MDCK cell line with inducible allele B NS1 expression propagates delNS1 influenza virus to high titres. *Vaccine* 2011; 29:6976-6985.
- Loeffen, W, Stockhofe, N, Weesendorp, E, van Zoelen-Bos, D, Heutink, R, Quak, S, Goovaerts, D, Heldens J, Maas, R, Moormann, R, Koch, G. Efficacy of a pandemic (H1N1) 2009 virus vaccine in pigs against the pandemic influenza virus is superior to commercially available swine influenza vaccines. *Vet. Microbiol.* 2011; 152:304-314.
- Wielink van R, Kant-Eenbergen, H, Harmsen, M, Martens, D, Wijffels, R, Coco-Martin, J. Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Vero and BHK21 cell lines. *J. Virol. Methods.* 2011; 171 (1):53-60.

Interview

Lonneke Vervelde: Wakkere killer-cellen

Dr. ir. Lonneke Vervelde is bioloog. Ze is hoofd van de groep aviaire immunologie van de afdeling Infectieziekten & Immunologie van de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht. Vervelde is projectleider van het FES-AI onderdeel Virus-gastheerinteracties.

Vervelde: 'We zijn op zoek geweest naar een soort heilige graal: een andere manier van vaccinatie, zonder te prikken, dus zonder intensief mens-dier-contact. We hebben daarvoor een sprayvaccin gemaakt tegen het vogelgriepvirus, vergelijkbaar met die sprayvaccins die nu worden gebruikt om kippen te beschermen tegen pseudo-vogelpest. Kippen ademen dit vernevelde vaccin in. Het komt zo op het slijmvlies in de neusholte en in de longen terecht, dus op dezelfde plek waar ook het griepvirus zich in de kip nestelt. Met zo'n spray-techniek zou pluimvee massaal gevaccineerd kunnen worden tegen vogelgriep. Dit type vaccin wordt momenteel in de praktijk al met succes tegen andere virussen ingezet. Het virus vermeerderd zich op de slijmvliezen om vervolgens het immuunsysteem aan te zetten tot de productie van beschermende antilichamen. Het is niet toegestaan om levend influenzavirusmateriaal te gebruiken voor een vaccin. Daarom hebben we vergelijkbare proeven gedaan met gedood virusmateriaal en adjuvant, volgens de bekende klassieke manier om vaccins te maken. In spray-

vorm werkt dit echter niet. Er wordt dan geen immuniteit opgebouwd, het immuunsysteem wordt niet wakker geschud.

Slijmvliezen produceren voortdurend slijm dat constant wordt afgevoerd. Een deel van het vaccin verdwijnt daardoor te snel om effect te sorteren, lijkt het. De ontwikkeling van een sprayvaccin is hiermee nog niet van de baan. We willen proberen of we de verblijftijd kunnen vergroten bijvoorbeeld door stoffen toe te voegen die ervoor zorgen dat virusdeeltjes zich beter – en dus langer – hechten aan het slijmvlies in de luchtwegen.

Mogelijk ligt nog een andere route open. We hebben geprobeerd erachter te komen waarom een kip zo snel, binnen 48 tot 72 uur, sterft na besmetting met een hoogpathogeen vogelgriepvirus en alleen wat snotterig wordt van een laagpathogene variant. Dit is misschien wel het meest fundamentele onderdeel geweest van het FES-AI programma. Een belangrijk verschil tussen hoog- en laagpathogene varianten zit in een klein



Een geïnfecteerde cel wordt aangevallen door Natural Killer Cellen

stukje van het hemagglutinine-eiwit op de buitenmantel van het virus. Door dit verschil kan een hoogpathogeen virus elk orgaan besmetten en zich daar vermenigvuldigen. Een laagpathogeen vermenigvuldigt zich vooral in de longen en de darmen. Het hoogpathogene virus is in staat de zogeheten de *natural killer*-cellen te ontlopen, hebben we ontdekt. Deze cellen zijn bedoeld om door het virus geïnfecteerde lichaamscellen op te sporen en vervolgens te vernietigen. Samen met andere beschermers, zoals macrofagen en dendritische cellen, vormen ze de vroege afweer tegen vogelgriepvirussen. Laagpathogene virussen activeren die natural killer-cellen wel. In het laboratorium zijn we nu aan het uitzoeken hoe dat in zijn werk gaat. In een vaccin zou je dus wellicht stoffen kunnen stoppen om die natural killer-cellen, die het nu laten afweten, alsnog flink te stimuleren. Het is een route die mogelijk te

gebruiken is voor de ontwikkeling van een spray-vaccin dat het immuunsysteem wel wakker krijgt.'

Referenties

- Post J, Burt D, Cornelissen J, Broks V, van Zoelen D, Peeters B, Rebel J. Systemic virus distribution and host responses in brain and intestine of chickens infected with low pathogenic or high pathogenic avian influenza virus. *Virology Journal* 2012; 9: 61.
- De Geus E, Jansen C, Vervelde L. Uptake of particulate antigens in a non-mammalian lung; phenotypic and functional characterization of avian respiratory phagocytes using bacterial or viral antigens. *Journal of Immunology* 2012; 188, 4516.
- Jansen C, van de Haar P, van Haarlem D, van Kooten P, de Wit S, van Eden W, Vierterböck B, Göbel T, Vervelde L. Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. *Developmental Comparative Immunology* 2010; 34, 759.

Interview

Peter Rottier: Werkende eiwitvaccins

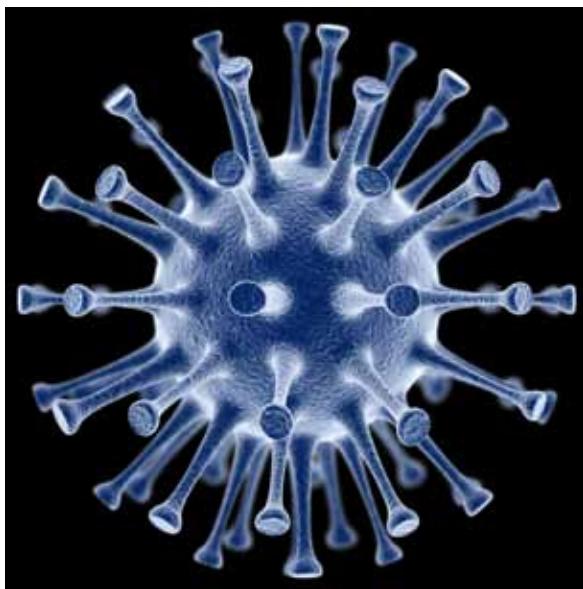
Prof. dr. Peter Rottier is biochemicus. Hij doet sinds 1979 onderzoek aan veterinaire infectieziekten bij de faculteit diergeneeskunde van de Universiteit Utrecht en is sinds 1996 hoogleraar virologie. Rottier is projectleider van het FES-AI onderdeel Pathobiologie en Virus-gastheerinteracties.

Rottier: 'De ervaring die we hier in Utrecht hebben opgebouwd met zogeheten coronavirussen hebben we gebruikt bij het vogelgriepvirus. Op de buitenkant daarvan zitten manteleiwitten. We hebben ontdekt hoe we die eiwitten afzonderlijk kunnen maken, zonder dat de rest van het virus meedoet. Die losse eiwitten, precies zoals ze voorkomen op de virusmantel, hebben we gebruikt voor fundamenteel onderzoek om erachter te komen hoe het virus zich hecht aan epitheelcellen in de gastheer, kippen bijvoorbeeld, of mensen. Dit is afhankelijk van de receptoren op de celwand. De ene gastheer raakt besmet, de andere niet. We hebben gekeken hoe het virus bindt aan deze zogeheten receptoren, die onder meer zijn opgebouwd uit suikermoleculen. De ruimtelijke vorm van deze suikermoleculen (sialzuurmoleculen) bepaalt de mate van hechting. Is er een goede hechting dan zal het vervolgtraject, infectie van de cel, efficiënter worden ingezet. We hebben tijdens dit onderzoek een geheel nieuwe route ontdekt die het virus gebruikt om de gastheer cel binnen te dringen. Dit fundamentele onderzoek heeft een grote spin-off

gehad, zoals de ontwikkeling van een nieuw eiwitvaccin. De vinding is neergelegd in een patent.

Aan de buitenkant van het virus zitten twee verschillende manteleiwitten: hemagglutinine- (H) en neuraminidase (N)- eiwitten. Ze komen alleen voor in de vorm van multimeren. De H-eiwitten komen voor als cluster van drie in elkaar gedraaide enkelvoudige eiwitten, het cluster van N-eiwitten is een kwartet. Het is de helixachtige constructie van deze trimeren die zorgt voor een goede hechting aan de gastheer cel. H-eiwitten zetten het immuunsysteem van de gastheer aan tot de productie van beschermende antilichamen, N-eiwitten dragen hier nauwelijks aan bij, blijkt uit ons onderzoek.

We hebben daarom een gen gemaakt dat insecten- en zoogdiercellen aanzet tot de productie van alleen trimeren. We hebben zo een methode ontwikkeld om veel trimeer-eiwitten te maken. Zoveel dat daarmee vaccins zijn te produceren.



Die blijken goed te werken. Onze trimeren zetten het immuunsysteem van de gastheer, de kip, aan tot de productie van voldoende beschermende antilichamen, net zoals het hele virus dat doet. We hebben een vaccin gemaakt gebaseerd op trimeren van het hoogpathogene H5N1-virus. Kippen die met dit trimeervaccin zijn ingespoten, worden prima beschermd, zo blijkt uit onze proeven. Net als fretten, varkens en muizen. Ook bij deze zoogdieren wekken de trimeren voldoende beschermende antilichamen op. Met onze methode hebben we niet alleen trimeren gemaakt van het meest virulente vogelgriepvirus H5N1 maar ook van een trits andere vogelgriepvirussen en van het Mexicaanse griepvirus. Ook die lijken goed te werken. De trimeervaccins werken volgens het moderne DIVA-principe (zie interview Moormann). Een besmette kip is daarmee te onderscheiden

van een gevaccineerde kip. Deze eiwitvaccins zijn een enorme verbetering, verwachten we. Influenzavaccins worden nu gemaakt van het virus zelf: dat wordt dan eerst gedood en inactief gemaakt. Om vaccin te kunnen maken wordt vaccinvirus opgekweekt in eieren, onder strikte veiligheidscondities. Voor productie van ons vaccin zijn geen eieren meer nodig en geen infectieus virusmateriaal. Er kleven dus minder risico's aan en zo'n eiwitvaccin is beter gedefinieerd. Momenteel werken we aan de optimalisatie van de productie er van.'

Referenties

- De Vries E, Tscherne D, Wienholts M, Cobos-Jiménez V, Scholte F, García-Sastre A, Rottier P, de Haan C. Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog* 2011, 7(3):e1001329.
- De Vries R, de Vries E, Moore K, Rigter A, Rottier P, de Haan C. Only two residues are responsible for the dramatic difference in receptor binding between swine and new pandemic H1 hemagglutinin. *J Biol Chem* 2011, 286:5868-75.
- Cornelissen L, de Vries R, de Boer-Luijtz E, Rigter A, Rottier P, de Haan C. A single immunization with soluble recombinant trimeric hemagglutinin protects chickens against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *PLoS One* 2010, 5(5):e10645.

Interview

Arjan Stegeman: Wind verspreidt

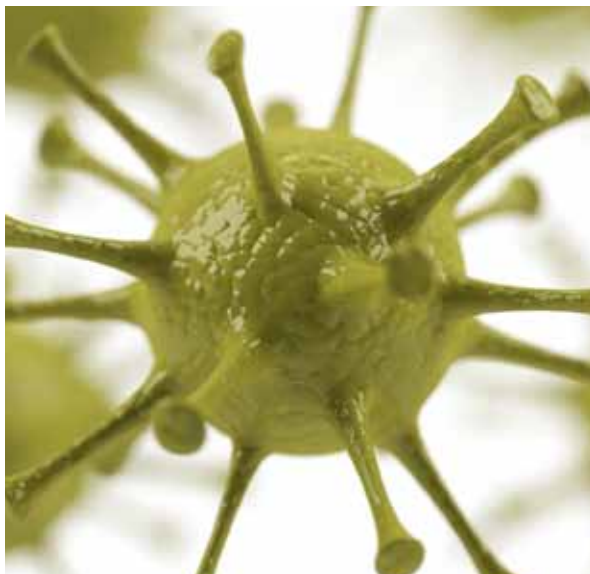
Prof. dr. Arjan Stegeman is dierenarts. Sinds 2001 is hij hoogleraar gezondheidszorg landbouwhuisdieren aan de Universiteit Utrecht en doet hij onderzoek naar de epidemiologie van infectieziekten bij landbouwhuisdieren. Stegeman is projectleider van het FES-AI onderdeel Epidemiologie.

Stegeman: 'In het kader van het FES-AI programma hebben epidemiologen van onze onderzoeksgroep in Utrecht samen met die van het CVI, RIVM en van de universiteit in Wageningen gekeken naar de rol van de wind bij de verspreiding van het vogelgriepvirus. Hiervoor zijn ook laboratoriumproeven gedaan. De resultaten daarvan zijn gecombineerd met veldgegevens uit 2003 toen het vogelgriepvirus zich massaal had verspreid over Nederlandse pluimveehouderijen.

In het lab zijn kippen in hokken gezet op verschillende afstanden van elkaar. Vervolgens is er gekeken hoe lang het duurt voordat virusmateriaal van een geïnfecteerde kip bij omringende soortgenoten terechtkomt, afhankelijk van de luchtstroming en van de stromingsrichting. We hebben hiervoor een hoogpathogene H5N1-stam uit Turkse kalkoenen gebruikt. Aanvankelijk experimenteerden we met twee kippen in een hok. De infectiesnelheid viel toen, opmerkelijk genoeg, tegen. De besmettingskans wordt exponentieel kleiner naarmate de afstand toeneemt. Zo blijkt

uit de proeven dat het zelden lukt kippen te infecteren die op meer dan 1,10 meter leven van besmette kippen. Het aantal kippen in een hok hebben we daarom verhoogd tot maximaal zeven om voldoende gegevens te krijgen over de infectiekans. Die proeven zijn vele malen herhaald om statistisch verantwoorde data te krijgen voor onze computermodellen.

De uitbraak in 2003 in Nederland met een hoogpathogene H7N7-stam, de grootste ooit, heeft een schat aan informatie opgeleverd, onder meer over de rol van de wind bij de verspreiding van het virus. Op 241 pluimveebedrijven is virus aangetoond, de meeste in de Gelderse Vallei. Van kippen op al deze bedrijven zijn bloedmonsters genomen. Virussen die zich verplaatsen van kip naar kip, van pluimveebedrijf naar pluimveebedrijf, veranderen telkens iets van genetische gedaante. Aan de hand van de gensequentie – het DNA-profiel – is de onderling verwantschap te achterhalen en is met enige zekerheid te achterhalen via welke route het virus zich over de pluimveebedrijven moet hebben



verspreid. Vervolgens is deze informatie gelegd op de kaart met de overheersende windrichting. Dan blijkt dat ongeveer 20 tot 30 procent van de infecties gerelateerd kan worden aan de windrichting. Ook uit de laboratoriumproeven blijkt dat wind virusdeeltjes meeneemt en dus deels verantwoordelijk is voor de verspreiding van het virus.

Samen met het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) hebben we de routekaart van het virus ook gebruikt om andere risicofactoren te achterhalen die indertijd gezorgd hebben voor verspreiding van virusdeeltjes. Er zijn tijdens de uitbraak veel contacten geweest tussen pluimveebedrijven, bijvoorbeeld via dierenartsen, ruimers, familieleden, vrienden en kennissen maar ook via veevoeder- en eierophaalbedrijven. Ook die kunnen met hun auto's virusmateriaal hebben

verspreid (zie ook interview Koopmans). Deze contactroutes en contactmomenten tussen verschillende pluimveebedrijven zijn aan de hand van uitgebreide vragenlijsten en enquêtes in beeld gebracht.'

Referenties

- Spekrijse D, Bouma A, Koch G, Stegeman J. Quantification of dust-borne transmission of highly pathogenic avian influenza virus between chickens, Influenza and Other Respiratory Diseases. In press.
- Ssematimba A, Elbers R, Hagenaars T, de Jong M. Estimating the per-contact probability of infection by highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus during the 2003 epidemic in the Netherlands. PLoSOne, accepted.
- Gonzales J, Elbers A, Bouma A, Koch G, de Wit J, Stegeman, J. Transmission characteristics of low pathogenic avian influenza virus of H7N7 and H5N7 subtypes in layer chicken. Vet. Microbiol. 2012; 155: 207-13.

Interview

Marion Koopmans: Transmissie-puzzel ontrafelen

Prof. dr. Marion Koopmans is dierenarts. Ze is hoofd van de afdeling virologie van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM). Sinds 2007 is ze bijzonder hoogleraar virologie aan het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam. Koopmans is projectleider van het FES-AI onderdeel Zoönotische transmissie.

Koopmans: 'De uitbraak van het vogelgriepvirus H7N7 in 2003 was niet alleen een van de grootste uitbraken ter wereld, er heeft ook virusoverdracht naar de mens plaatsgevonden. Mensen zijn besmet geraakt. Verreweg de meesten van hen hadden milde klachten, enkelen klaagden over griepverschijnselen. Er is één dode gevallen, een dierenarts. Drie van besmette mensen hebben het virus niet rechtstreeks van kippen gekregen maar zijn door andere mensen besmet geraakt. Om te achterhalen hoe het virus zich heeft verspreid en onder welke omstandigheden mensen geïnfecteerd zijn geraakt, zijn er veel gegevens verzameld. Die zijn de afgelopen jaren door het RIVM, de Universiteit Utrecht, het Erasmus Medisch Centrum en CVI in Lelystad geanalyseerd. Bij de ruimingen in 2003 waren duizenden mensen betrokken die op verschillende pluimveebedrijven hebben gewerkt. De mensen is gevraagd vragenlijsten te beantwoorden om in kaart te kunnen brengen waar iemand is geweest, bij welk bedrijf, op welke dag, hoe laat en wat daarbij de bescherming was, van mondkapje, oogbescherming,

hoofdkapje tot laarzen. Ook is gevraagd welke route iemand heeft afgelegd, langs welke pluimveebedrijven.

Bovendien is gedetailleerd in kaart gebracht wanneer bedrijven besmet zijn geraakt en wie daar een week of zelfs weken daarvoor op bezoek is geweest. Van de kippen op de pluimveebedrijven en van de ruimers, dierenartsen en de werkers op de bedrijven zijn bloedmonsters en keeluitstrijkjes verzameld om een eventuele virusbesmetting te achterhalen.

Van elk gevonden virus bij mensen is – net als bij de bedrijven – de precieze RNA-sequentie uitgezocht. Het griepvirus vermenigvuldigt zich namelijk razendsnel, het verandert daarbij een heel klein beetje van genetische gedaante. De genetische veranderingen, die in de loop van de epidemie zijn opgetreden, hebben we gebruikt om verwantschappen tussen virusstammen op verschillende boerderijen uit te zoeken. Leg je alle stukjes van de puzzel over elkaar heen dan kun je

zien hoe de verspreiding van het virus is geweest, op welk bedrijf iemand besmet is geraakt, welk type werk het meeste risico op besmetting (overdracht van virus) geeft en of mensen het virus hebben kunnen verspreiden.

De mensen die direct in aanraking komen met dieren, hebben het grootste infectierisico: dat zijn ruimers en dierenartsen. Dierenartsen hadden drie maal zo vaak een infectie als andere mensen in de pluimveeketen zoals ruimers. Daar zit een zekere logica in. Ruimers gaan naar bedrijven waarvan bekend is dat er mogelijk virus rondwaart. Zij zullen zich goed beschermen. Dierenartsen bezoeken dagelijks bedrijven waar iets met dieren aan de hand is: het vogelgriepvirus is dan nog niet in beeld. Dierenartsen moeten hier bedacht op zijn. De opgedane kennis over verspreidingsrisico's heeft tot verscherpte regels in draaiboeken geleid. In de eerste week van een besmetting, als de gezondheidsklachten bescheiden zijn, is de kans op verspreiding het grootst. Mensen krijgen pas één à twee dagen na de besmetting koorts-klachten. Ze zijn die twee dagen het meest infectieus. Bij kippen is dit niet anders, blijkt uit proeven. De piek is wat breder: het duurt langer voordat problemen worden opgemerkt. Zijn er klachten op een bedrijf in de vorm van zieke kippen dan zijn die vermoedelijk een week tot tien dagen daarvoor besmet geraakt. Vroege symptomen van vogelgriep zijn niet eenduidig waardoor het risico bestaat dat een besmetting voor iets anders wordt aangezien. Het advies is nu om bij de geringste aanwijzing vogelgriepalarm te slaan. Nederland is een land met een hoge dierconcen-

tratie en dus met een verhoogde kans op de ontwikkeling van een virulente stam. Komt zo'n virus onze pluimveesector binnen dan is het bijna niet te stuiten.'

Referenties

- Jonges M, Bataille A, Enserink R, Meijer A, Fouchier RA, Stegeman A, Koch G, Koopmans M. Comparative analysis of avian influenza virus diversity in poultry and humans during a highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus outbreak. *J Virol* 2011; Oct;85(20):10598-604. Epub 2011 Aug 17.
- Te Beest D, van Boven M, Bos M, Stegeman A, Koopmans M. Effectiveness of personal protective equipment and oseltamivir prophylaxis during avian influenza A (H7N7) epidemic, the Netherlands, 2003. *Emerg Infect Dis.* 2010; Oct;16(10):1562-8.
- Koopmans M, de Bruin E, Godeke G, Friesema I, van Gageldonk R, Schipper M, Meijer A, van Binnendijk R, Rimmelzwaan G, de Jong M, Buisman A, van Beek J, van de Vijver D, Reimerink J. Profiling of humoral immune responses to influenza viruses by using protein microarray. *J. Clin Microbiol Infect.* Article first published online 23 dec 2011; doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03701.x. Epub ahead of print.

Interview

Thijs Kuiken: Trekvogels volgen

Prof. dr. Thijs Kuiken is dierenarts. Sinds 1999 werkt hij als hoogleraar vergelijkende pathologie bij de afdeling Virologie van het Erasmus MC in Rotterdam. Kuiken is project-leider van het FES-AI onderdeel Wilde vogels en zoogdieren.

Kuiken: 'We hebben tientallen wilde vogels hier in het laboratorium onderzocht, waaronder zes verschillende eendensoorten, soorten die over lange afstand migreren tussen Azië en Europa. Trekvogels kunnen wellicht een rol spelen bij de verspreiding van vogelgriepvirussen als H5N1 vanuit Azië, maar daarover waren meningen verdeeld. Vogelaars legden de schuld van de vogelgriep-epidemie vooral bij de pluimvee-industrie. Trekvogels die het virus meevoeren zijn ziek, zo redeneerden zij, waardoor die vogels nauwelijks kunnen vliegen, laat staan over lange afstanden. De pluimveesector daarentegen wees juist op de rol van trekvogels. Die controverse is nu weg. Trekvogels vormen het grootste reservoir van laagpathogene virussen. Wel zijn er aanzienlijke verschillen: in kokmeeuwen bijvoorbeeld hebben we maar twee verschillende laagpathogene virustypes aangetroffen, wilde eenden kunnen veertien types onder de leden hebben.

Veel van deze wilde vogelsoorten hebben zelf geen last van het virus. In het laboratorium hebben we

wilde vogels besmet onder meer met een hoogpathogeen H5N1-virus en vervolgens ontleed om de verschillende organen te bekijken. De kuifeend en tafeleend werden doodziek, de wintertaling had daarentegen nergens last van; hij scheidde echter ook maar weinig virus uit. De wilde eend was in ons onderzoek de belangrijkste virusdrager: hij wordt zelf niet ziek, maar scheidt wel veel virus uit en is dan zeer besmettelijk. Deze soort kan in principe dus over lange afstand virus meedragen en uitscheiden zonder zelf in de problemen te komen.

Hoogpathogene vogelgriep is in kippen een ziekte die meerdere organen aanpakt. Het virus komt binnen via het ademhalingsstelsel, van waar het zich via de endotheelcellen van de bloedvaten verspreidt naar alle organen. Tijdens onze eendenproef hebben we, ter controle, kippen geïnfecteerd met het hoogpathogene H5N1-virus. De kippen gingen binnen één à twee dagen dood, de eenden bleven vrolijk voortleven en hadden geen enkel klinisch verschijnsel. Het virus kwam niet verder

dan het ademhalingsstelsel. Net als bij de mens. Ons onderzoek in Rotterdam leverde een grote verrassing op. Bij eenden verlaat het meeste H5N1-virusmateriaal het lichaam niet door de cloaca, maar via de keel. Voordat we dat ontdekten, werden wereldwijd de meeste wilde vogels op H5N1 getest door het nemen van uitstrijkjes van het slijmvlies in de cloaca. Inmiddels hebben we vrijwel alle experts kunnen overtuigen dat dit een verkeerde techniek is en dat het uitstrijkje uit de keel moet komen.

De afgelopen jaren is een surveillanceprogramma opgezet. Zieke en dode wilde vogels worden naar het Dutch Wildlife Health Centre (DWHC) gestuurd voor pathologisch onderzoek. Ontdek je bij hen H5- of H7-virus, dan moet je alerter zijn. Verder worden andere wilde dieren zoals vossen gevolgd. In de Gelderse Vallei, een gebied met veel pluimveebedrijven, komen veel vossen voor. Die kunnen geïnfecteerd raken met H5N1 door het eten van besmette vogels, zo ontdekten we. Bovendien scheiden ze het virus een aantal dagen uit. Is H5N1-virus in een gebied aanwezig, dan moet je dus rekening houden met de vos en met wellicht andere roofdieren, als doorgeefluik van het virus.'

Referenties

- Reperant L, van de Bildt M, van Amerongen G, Buehler D, Osterhaus A, Jenni-Eiermann S, Piersma T, Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infection in a long-distance migrant shorebird under migratory and non-migratory states. PLoS One. 2011;6(11):e27814.
- Reperant L, van Amerongen G, van de Bildt M,



Rimmelzwaan G, Dobson A, Osterhaus A, Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in red foxes fed infected bird carcasses. Emerg Infect Dis. 2008;14(12):1835-41.

- Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer W, van Lavieren R, Osterhaus A, Fouchier R, Kuiken T. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). Emerg. Infect. Dis. 2008; 14: 600 – 607.

Output in peer reviewed journals

WP1

- Bataille A, van der Meer F, Stegeman A, Koch G. Evolutionary analysis of inter-farm transmission dynamics in a highly pathogenic avian influenza epidemic. 2011 PLoS Pathog. 2011 Jun;7(6):e1002094. Epub 2011 Jun 23.
- Ypma RJ, Bataille AM, Stegeman A, Koch G, Wallinga J, van Ballegooijen WM. Unravelling transmission trees of infectious diseases by combining genetic and epidemiological data. Proc Biol Sci. 2012 Feb 7; 279(1728):444-50. Epub 2011Jul 6.
- Blokker J.C, M.M. Harmsen, W. Bartelink, J.L. Gonzales J. Kant-Eenberg, G. Koch. Development and evaluation of an ELISA for detection of poultry antibodies against avian influenza neuraminidase subtype 2 using llama single-domain antibody fragments. In preparation
- Diagnostisch algoritme respiratoire infecties: een handleiding voor het inzetten van diagnostiek bij uitbraken van luchtweginfecties. LCI draaiboek September 2011. <http://www.rivm.nl/dsresource?objectid=rivmp:53167&type=org&disposition=inline>
- Marcel Jonges, Wai Ming Liu, Erhard van der Vries, Ronald Jacobi, Inge Pronk, Claire Boog, Marion Koopmans, Adam Meijer, Ernst Soethout. Influenza virus inactivation for studies of antigenicity and phenotypic neuraminidase inhibitor resistance profiling. J. Clin. Microbiol, Mar. 2010, p. 928-940, vol 48, no. 3.
- Liselotte van Asten et al. Strengthening the diagnostic capacity to detect Bio Safety Level 3 organisms in unusual respiratory viral outbreaks. J Clin Virol 45 (2009) 185-190.
- Adam Meijer et al. Preparing the outbreak assistance laboratory network in the Netherlands for the detection of the influenza virus A (H1N1) variant. J Clin Virol 45 (2009) 179-184.
- Jonges M, van der Lubben IM, Dijkstra F, Verhoef L, Koopmans M, Meijer A. Dynamics of antiviral-resistant influenza viruses in the Netherlands, 2005-2008. Antiviral

Res. 2009 Sep;83(3):290-7.

- Gooskens J, Jonges M, Claas EC, Meijer A, van den Broek PJ, Kroes AM. Morbidity and mortality associated with nosocomial transmission of oseltamivir-resistant influenza A(H1N1) virus. JAMA. 2009 Mar 11;301(10):1042-6.
- Gooskens J, Jonges M, Claas EC, Meijer A, Kroes AC. Prolonged influenza virus infection during lymphocytopenia and frequent detection of drug-resistant viruses. J Infect Dis. 2009 May 15;199(10):1435-41.
- Marcel Jonges, Adam Meijer, Pieter Overduin, Titia Kortbeek, Rob van Kessel, Paul Bijkerk, Martin Schutten, Theo Bestebroer, Charles Boucher, Guus Rimmelzwaan, Ron Fouchier, Ab Osterhaus, and Marion Koopmans. Travel-associated influenza A (H1N1) with a virus containing a mutation in PB2. ProMED-mail 2009; 8 May: 20090508.1722.
- M Jonges, A Meijer, J van Steenberg, T Oomen, H Vennema, J Spaargaren, Kampman, P van der Tas, R Ter Schegget, W van der Hoek, J Tjje, R Benne, S Herfst, S Chutinimitkul, A Osterhaus, R Fouchier, M Koopmans. Influenza pandemic (H1N1) 2009 (58): the Netherlands,PB2 mutations. ProMED-mail 2009; 28 September: 20090928.3394.
- Zhou J, Zou L, Zhang X, Liao J, Ni H, Hou N, Wang Y, Li H, Wu J, Jonges M, Meijer A, Koopmans M, Ke C. Adamantane- and oseltamivir-resistant seasonal A (H1N1) and pandemic A (H1N1) 2009 influenza viruses in Guangdong, China, during 2008 and 2009. J Clin Microbiol. 2011 Jul;49(7):2651-5. Epub 2011 May 18.

WP2

- Cornelissen LAHM, de Vries RP, de Boer-Luijtz EA, Rigter A, Rottier PJM, de Haan, CAM. (2010) A Single Immunization with Soluble Recombinant Trimeric Hemagglutinin Protects Chickens against Highly Pathogenic Avian Influenza Virus

H5N1. PLoS ONE 5(5): e10645.

- Cornelissen LAHM, de Leeuw OS, Tacke MG, Klos HC, de Vries RP, de Boer-Luijtz E, van Zoelen-Bos D, Rigter A, Rottier PJM, Moormann RJM, de Haan CAM. 2012. Protective efficacy of Newcastle Disease Virus expressing soluble trimeric hemagglutinin against highly pathogenic influenza in chickens and mice. PLoS ONE, 7(8): e44447.
- Van Wielink R, Harmsen MM, Martens DE, Peeters BPH, Wijffels RH, Moormann RJM. (2011), MDCK cell line with inducible allele B NS1 expression propagates delNS1 influenza virus to high titres. Vaccine 29:6976-85.
- Van Wielink R, Kant-Eenbergen HV, Harmsen MM, Wijffels RH, Coco-Martin JM. (2011), Adaptation of a Madin-Darby canine kidney cell line to suspension growth in serum-free media and comparison of its ability to produce avian influenza virus to Vero and BHK21 cell lines. J. Virol Methods 171(1):53-60.
- Van Wielink R, Harmsen MM, Martens DE, de Leeuw OS, Peeters BPH, Wijffels RH, Moormann RJM. Effect of different natural and chimeric hemagglutinin genes on influenza A virus replication efficiency in baby hamster kidney cells. J. Biotechnology, 2012. conditionally accepted..
- Van Wielink R, Harmsen MM, Martens DE, Peeters BPH, Wijffels RH, Moormann RJM. Changes in the ratio of the M1 and M2 protein levels and in the subcellular distribution of the M1 protein can compensate for the loss of NS1 function in influenza virus NS1 deletion mutants. 2012. J. Virol., accepted.
- Peeters B, de Boer M, Tjeerdsma G, Moormann R, Koch G. New universal DIVA vaccine for the protection of poultry against highly pathogenic H5 subtype avian influenza viruses. 2012. Vaccine, conditionally accepted.

WP3a

- E.D. de Geus, C.A. Jansen and L. Vervelde. Uptake of particulate antigens in a non-mammalian lung; phenotypic and functional characterization of avian respiratory phagocytes using bacterial or viral antigens. Journal Immunology, 2012, 188, 4516-4526.
- E.D. de Geus, J.M.J. Rebel and L. Vervelde. Induction of respiratory immune responses in the chicken; implications for development of mucosal avian influenza virus vaccines. Veterinary Quarterly, 2012, 32, 75-86.
- E.D. de Geus, Rebel JM, Vervelde L Kinetics of the avian influenza-specific humoral responses in lung are indicative of local antibody production. Dev Comp Immunol. 2012, 36(2):317-22.
- E.D. de Geus, Enten tegen vogelgriep in zicht. Pluimveehouderij, 2012, 22 juni, 10-11.
- S. Reemers, D. van Haarlem, A. Sijts, L. Vervelde and C. Jansen. Identification of novel avian influenza virus derived CD8+ T-cell epitopes. PLoS ONE 2012 7(2): e31953.
- J. Post, D. Burt, J. Cornelissen, V. Brooks, D. van Zoelen, B. Peeters and J. Rebel. Systemic distribution and host responses in brain and intestine of chickens infected with

low pathogenic or high pathogenic avian influenza virus. Virology Journal 2012, 9:61

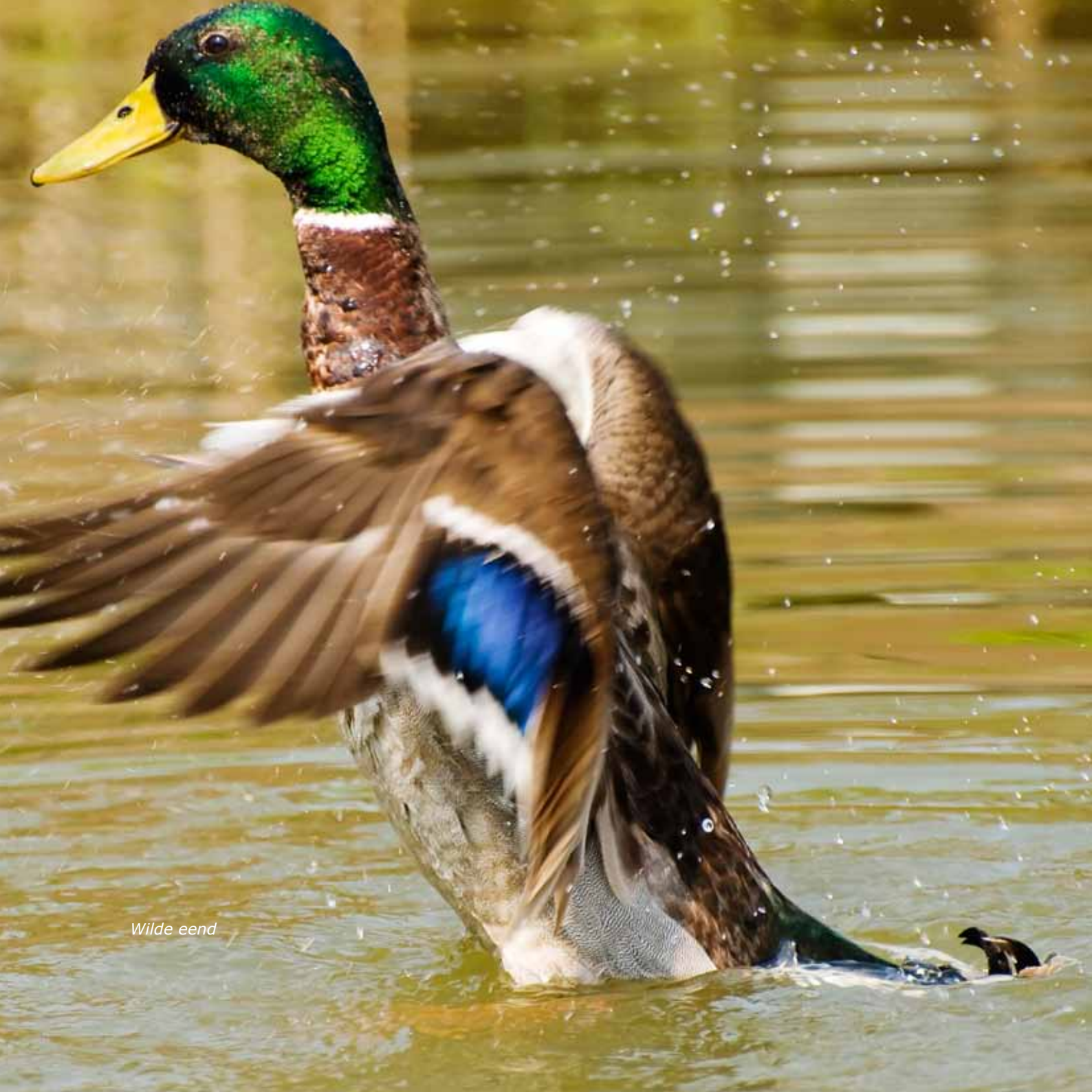
- J. Cornelissen, J. Post, B. Peeters, L. Vervelde, J.M.J. Rebel. Differential innate responses of chickens and ducks to low pathogenic avian influenza virus. Avian Pathology, 2012 in press
- J. M.J. Rebel, B. Peeters, H. Fijten, J. Post, J. Cornelissen, L. Vervelde. Highly pathogenic or low pathogenic avian influenza virus subtype H7N1 infection in chicken lungs: small differences in general acute responses. Veterinary Research 2011, 42(1):10.
- E.D. de Geus, D.A. van Haarlem, O.N. Poetri, J.J. de Wit, L. Vervelde. A lack of antibody formation against inactivated influenza virus after aerosol vaccination in presence or absence of adjuvantia. Vet Imm Immunopathol., 2011, 143:143-7
- L. Vervelde, E. de Geus, C. Jansen, D.E. Heller. Contribution of the genetic background to the immune response of broilers vaccinated or challenged with LPAI H9N2. BMC Proc. 2011 Jun 3;5 Suppl 4:S5.
- Jansen CA, van de Haar PM, van Haarlem D, van Kooten P, de Wit S, van Eden W, Viertlböck BC, Göbel TW, Vervelde L. Identification of new populations of chicken natural killer (NK) cells. Dev Comp Immunol. 2010, 34, 759-67.
- J. Post, E. D. de Geus, L. Vervelde, J. B. W. J. Cornelissen and J. M. J. Rebel. Systemic distribution of different Low Pathogen Avian Influenza (LPAI) Viruses in Chicken. Submitted
- E.D. de Geus, B. Tefsen, D.A. van Haarlem, D.F. Smith, W. van Eden, I. van Die, L. Vervelde. Glycans from avian influenza virus are targets for the humoral immune response in chicken and are recognized by chicken bone marrow-derived dendritic cells. Submitted
- J. Cornelissen, J. Post, L. Vervelde, J. Rebel. Highly pathogenic avian influenza virus subtype H7N1 infection in ducks and chickens lungs: controlled responses versus hypercytokinemia. Submitted
- T.J. Hagenaars et al. Modelling the innate immune response against avian influenza in chicken.
- L. Vervelde, S. Reemers, J. Post, E. Claassen, A. Rebel and C. Jansen. Enhanced activation of chicken dendritic cells upon infection with highly pathogenic avian influenza virus. In preparation
- C. Jansen, P. vd Haar, D. van Haarlem, B. Löndt, T. Göbel, S. Graham, W. van Eden, S. Brooks, and L. Vervelde. Diminished lung NK-cell responses correlate with enhanced pathogenicity following infection with avian influenza viruses in the natural host. Submitted
- C. Jansen, E. de Geus, D. van Haarlem, P. van Kooten, B. Viertlböck, L. Vervelde and T. Göbel Identification of activating Chicken Ig-like receptors recognizing avian influenza viruses. Submitted

WP3b

- de Vries RP, de Vries E, Bosch BJ, de Groot RJ, Rottier PJM, de Haan CA. The influenza A virus hemagglutinin glycosylation state affects receptor-binding specificity. *Virology*. 2010, 403:17-25.
- Widjaja I, de Vries E, Tscherne DM, García-Sastre A, Rottier PJ, de Haan CA. Inhibition of the ubiquitin-proteasome system affects influenza A virus infection at a postfusion step. *J Virol*. 2010, 84:9625-31.
- Cornelissen LA, de Vries RP, de Boer-Luijtz EA, Rigter A, Rottier PJM, de Haan CA. A single immunization with soluble recombinant trimeric hemagglutinin protects chickens against highly pathogenic avian influenza virus H5N1. *PLoS One*. 2010, 5(5):e10645.
- Bosch BJ, Bodewes R, de Vries RP, Kreijtz JH, Bartelink W, van Amerongen G, Rimmelzwaan GF, de Haan CA, Osterhaus AD, Rottier PJM. Recombinant soluble, multimeric HA and NA exhibit distinctive types of protection against pandemic swine-origin 2009 A(H1N1) influenza virus infection in ferrets. *J Virol*. 2010, 84:10366-74.
- de Vries RP, de Vries E, Moore KS, Rigter A, Rottier PJM, de Haan CA. Only two residues are responsible for the dramatic difference in receptor binding between swine and new pandemic H1 hemagglutinin. *J Biol Chem*. 2011, 286:5868-75.
- Loeffen WL, de Vries RP, Stockhofe N, van Zoelen-Bos D, Maas R, Koch G, Moormann RJ, Rottier PJM, de Haan CA. Vaccination with a soluble recombinant hemagglutinin trimer protects pigs against a challenge with pandemic (H1N1) 2009 influenza virus. *Vaccine*. 2011, 29:1545-50.
- de Vries E, Tscherne DM, Wienholts MJ, Cobos-Jiménez V, Scholte F, García-Sastre A, Rottier PJ, de Haan CA. Dissection of the influenza A virus endocytic routes reveals macropinocytosis as an alternative entry pathway. *PLoS Pathog*. 2011, 7(3):e1001329.
- Wickramasinghe, IN, de Vries RP, Gröne A, de Haan CAM, and Verheije MH. Binding of avian coronavirus spike proteins to host factors reflects virus tropism and pathogenicity. *J Virol*. 2011, 85:8903-12.
- de Vries E, de Vries R, Wienholts MJ, Floris CE, Jacobs MS, van den Heuvel A, Rottier PJM, and de Haan CAM. Influenza A virus entry into cells lacking sialylated N-glycans. *Proc. Natl.Acad.Sci (USA)* 2012, 109:7457-7462.
- de Vries R, Smit C, de Bruin E, Rigter A, de Vries E, Cornelissen L, Eggink D, Sanders R, Hokke C, Koopmans M, Rottier PJM, and de Haan C. Glycan-dependent immunogenicity of recombinant soluble trimeric hemagglutinin. *J. Virol*. 2012, Aug 22. [Epub ahead of print; PMID: 22915811].
- dynamics in a highly pathogenic avian influenza epidemic. *PLOS pathogens* 7, e1002094.
- Gonzales, J.L., Elbers, A.R.W., Bouma, A., Koch, G., de Wit, J.J., Stegeman, J.A., 2010. Low-pathogenic notifiable avian influenza serosurveillance and the risk of infection in poultry – a critical review of the European Union active surveillance programme (2005-2007). *Influenza and other Respiratory Diseases* 2010; 4: 91-99.
- Gonzales, J.L., Van der Goot, J., Stegeman, J.A., Elbers, A.R.W., and Koch, G., 2011. Transmission between chickens of an H7N1 Low Pathogenic Avian Influenza virus isolated during the epidemic of 1999 in Italy. *Veterinary Microbiology*, 152, 187-90.
- Gonzales, GL., Elbers, A.R.W., Bouma, A., Koch, G., De Wit, J.J., and Stegeman, J.A., 2012. Transmission characteristics of low pathogenic avian influenza virus of H7N7 and H5N7 subtypes in layer chickens. *Veterinary Microbiology*, 155, 207-13.
- Gonzales, J.L., Elbers, A.R.W., Van der Goot, J.A., Bontje, D., Koch, G., De Wit, J.J., and Stegeman, J.A., 2012. Using egg production data to quantify within-flock transmission of low pathogenic avian influenza virus in commercial layer chickens. *Prev. Vet. Med.*, in press.
- Gonzales, J.L., Stegeman, J.A., Koch, G., De Wit, S.J., and Elbers, A.R.W. Rate of introduction of low pathogenic avian influenza virus in different poultry production sectors in the Netherlands. *Influenza and other respiratory viruses* 2012; DOI:10.1111/j.1750-2659.2012.00348.x.
- De Jong, M.C.M., and Hagenaars, T.J., 2009. Modelling control of avian influenza in poultry: the link with data. *Rev. Sci. Tech. OIE* 28, 371-377.
- De Jong, M.C.M., Stegeman, A., van der Goot, J. and Koch, G., 2009. Intra- and interspecies transmission of H7N7 highly pathogenic avian influenza virus during the avian influenza epidemic in the Netherlands in 2003. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties* 28, 333-340.
- Jonges, M., Bataille, A., Enserink, R.M., Meijer, A., Fouchier, R., Stegeman A., Koch, G., Koopmans M., 2011. Comparative analysis of avian influenza virus diversity during a highly pathogenic avian influenza virus (H7N7) outbreak. *J. Virology*, 85, 10598-10604.
- Rutten, N., Gonzales, J.L., Elbers, A.R.W., Velthuis, A.G.J. Cost analysis of low pathogenic avian influenza surveillance systems in the Dutch layer sector. *PLoS ONE* 2012; 7(4):e33930. doi:10.1371/journal.pone.0033930.
- Spekrijse, D., Bouma, A., Koch, G., Stegeman, J.A. Airborne transmission of a highly pathogenic avian influenza virus strain H5N1 between groups of chickens quantified in an experimental setting. *Veterinary Microbiology*, 152, 88-95.
- Spekrijse, D., Bouma, A., Stegeman, J., Koch, G., and De Jong, M.C.M., 2011. The effect of inoculation dose of Highly Pathogenic Avian Influenza virus strain H5N1 on the infectiousness of chickens. *Veterinary Microbiology*, 147,

WP4

- Bataille, A., Van der Meer, F., Stegeman, A., and Koch, G., 2011. Evolutionary analysis of inter-farm transmission



Wilde eend

- 59-66.
- Spekrijse, D., Bouma, A., Koch, G., and Stegeman, J.A., 2012. Quantification of dust-borne transmission of highly pathogenic avian influenza between chickens. *Influenza and other respiratory viruses*. doi: 10.1111/j.1750-2659.2012.00362.x
 - Ssematimba, A., Hagenaars, T.J., de Wit, J.J., Ruiterkamp, F., Fabri, T.H., Stegeman, J.A., de Jong, M.C.M., 2012. Avian Influenza transmission risks: analysis of biosecurity measures and contact structure in Dutch poultry farming. *Preventive Veterinary Medicine*, accepted.
 - Ssematimba, A., Elbers, A.R.W., Hagenaars, T.J., and De Jong, M.C.M., 2012. Estimating the per-contact probability of infection by highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus during the 2003 epidemic in the Netherlands. *PLoS ONE* 7(7): e40929.
 - Ssematimba, A., Hagenaars, T.J., and De Jong, M.C.M., 2012. Modelling the Wind-Borne Spread of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus between Farms. *PLoS ONE* 7(2): e31114.
 - Stegeman, J.A., Bouma, A., and De Jong, M.C.M., 2011. Epidemiological models to assist the management of Highly Pathogenic Avian Influenza. *Rev. Scient OIE*, 30, 571-9.
 - Te Beest, D.E., Hagenaars, T., Stegeman, A., Koopmans, M.P., and Van Boven, M., 2011. Risk based culling for highly infectious livestock diseases. *Vet Res* 42, 81
 - Te Beest, D.E., Stegeman, J.A., Mulder, Y.M., Van Boven, M., and Koopmans, M.P.G., 2011. Exposure of uninfected poultry farms to HPAI (H7N7) virus by professionals during outbreak control activities. *Zoonoses and Public Health*, 58, 493-9.
 - Ypma, R.J.F., Bataille, A.M.A., Stegeman, A., Koch, G., Wallinga, J., and Van Ballegooijen, W.M., 2012. Unraveling transmission trees of infectious diseases by combining genetic and epidemiological data. *Proceedings of the Royal Society B*, 279, 444-450.
 - Spekrijse, D., Bouma, A., Koch, G., Stegeman, J.A.. Vaccination with 1/3 dose of a H5N9 vaccine prevents cloacal shedding and transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 virus upon experimental infection of chickens. Submitted.
 - Spekrijse, D., Stegeman, J.A., Bouma, A., Koch, G. Evolution of a highly pathogenic avian influenza H5N1 virus strain in chickens during a transmission experiment. In preparation.
 - Hagenaars, T.J., Fischer, E.A.J., Backer, J.A., Rebel, J.M.J., Spekrijse, D., Jansen, C.A., Vervelde, L., M.C.M. de Jong, Koets, A., 2012. Modelling the innate immune response against avian influenza in chicken. Submitted.
 - Klinkenberg, D., Koets, A., and De Jong, M.C.M., 2012. Antigenic drift of influenza virus in relation to population structure and host life span. Submitted
 - Ssematimba, A., Hagenaars, T.J., Boender, G.J., van Bunnik, B.A.D., and De Jong, M.C.M., 2012. Mechanistic modelling of highly pathogenic avian influenza transmission risk: the role of delayed transmission. Submitted .
 - van Bunnik, B.A.D., Ssematimba, A., Hagenaars, T.J., Nodelijk, G., Bootsma, M.C.J., Bonten, M.J.M., Haverkate, M.R., and De Jong, M.C.M., 2012. Small distances can keep bacteria at bay for days. Submitted

WP5

- Hahné S, Donker T, Meijer A, Timen A, van Steenbergen J, Osterhaus A, van der Sande M, Koopmans M, Wallinga J, Coutinho R; Dutch New Influenza A(H1N1)v Investigation Team. Epidemiology and control of influenza A(H1N1)v in the Netherlands: the first 115 cases. *Euro Surveill*. 2009 Jul 9;14(27). pii: 19267.
- Munster VJ, de Wit E, van den Brand JM, Herfst S, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, van de Vijver D, Boucher CA, Koopmans M, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD, Fouchier RA. Pathogenesis and Transmission of Swine-Origin 2009 A(H1N1) Influenza Virus in Ferrets. *Science*. 2009, 325(5939):481-483.
- Marion P.G. Koopmans, Adam Meijer, Mariken I.M. van der Lubben, Charles Bouchier, Ron A.M. Fouchier, Ab D.M.E. Osterhaus, Aura Timen, Menno D. de Jong en Jim E. van Steenbergen. Bestrijding van de nieuwe influenza A (H1N1). Deel I. *Ned Tijdschr Geneesk* 2009 20 juni; 153(25), 1223 -1227.
- Aura Timen, Marion M.P. Koopmans, Ann C.T.M. Vossen, Gerard J.J. van Doornum, Stephan Günther, Franchette van den Berkmoortel, Kees M. Verduin, Sabine Dittrich, Petra Emmerich, Albert D.M.E. Osterhaus, Jaap T. van Dissel, and Roel A. Coutinho. Response to Imported Case of Marburg Hemorrhagic Fever, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases*, vol. 15, no. 8, Augustus 2009, 1171-1175.
- C.C. van den Wijngaard, Jim E. van Steenbergen, Marianne A.B. van der Sande en Marion P.G. Koopmans. New Influenza A (H1N1): advised indication and prescription of antiviral drugs. *Ned Tijdsch Geneesk*. 2009; 153:A1053.
- Koopmans MP, Meijer A, van der Lubben MI, Boucher C, Fouchier RA, Osterhaus AD, Timen A, de Jong MD, van Steenbergen JE. Combating the new influenza A (H1N1) virus. I. Overview of the virological aspects. *Ned Tijdschr Geneesk*. 2009;153:A770. Review.
- E. van der Vries, M. Jonges, S. Herfst, J. Maaskant, A. Van der Linden, J. Guldemeester, G.I. Aron, T.M. Bestebroer, M. Koopmans, A. Meijer, R.A.M. Fouchier, A.D.M.E. Osterhaus, C.A. Boucher, M. Schutten. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y). *Journal of Clinical Virology* 47 (2010) 34-37.
- Sander Herfst, Salin Chutinimitkul, Jianqiang Ye, Eefje Schrauwen, Theo Bestebroer, Vincent Munster, Emmie de Wit, Marcel Jonges, Adam Meijer, Marion Koopmans, Guus Rimmelzwaan, Albert Osterhaus, Daniel Perez, Ron Fouchier. Introduction of virulence markers in PB2 of pandemic



Tafeleend

- swine-origin influenza virus does not result in enhanced virulence or transmission. *Journal of Virology*, Apr. 2010, p. 3752-3758.
- Michiel van Boven, Tjibbe Donker, Mariken van der Lubben, Rianne van Gageldonk-Lafeber, Dennis te Beest, Marion Koopmans, Adam Meijer, Aura Timen, Corien Swaan, Anton Dalhuijsen, Anneke van den Hoek, Susan Hahné, Peter Teunis, Marianne A.B. van der Sande, Jacco Wallinga. Transmission of novel influenza A(H1N1) in households with post-exposure antiviral prophylaxis. *PLoS ONE*, July 2010, Volume 5, Issue 7, e11442.
 - Marian E.H. Bos, Dennis E. te Beest, Michiel van Boven, Mirna Robert Du-Ry van Beest Holle, Adam Meijer, Arnold Bosman, Yonne M. Mulder, Marion P.G. Koopmans, and Arjan Stegeman. High probability of avian influenza virus (H7N7) Transmission from Poultry to Humans Active in Disease Control on Infected Farms. *JID* 2010: 201 (1 May), p. 1390-p. 1396.
 - Cees C. van den Wijngaard, Liselotte van Asten, Adam Meijer, Wilfrid van Pelt, Nico J.D. Nagelkerke, Gé A. Donker, Marianne A.B. van der Sande and Marion P.G. Koopmans. Detection of Excess Influenza Severity: associating respiratory hospitalization and mortality data with reports of influenza-like illness by primary care physicians. *American Journal of Public Health*, 2010 Nov; 100(11):2248-54.
 - te Beest DE, van Boven M, Bos ME, Stegeman A, Koopmans MP. Effectiveness of personal protective equipment and oseltamivir prophylaxis during avian influenza A (H7N7) epidemic, the Netherlands 2003. *Emerging Infect Dis.* 2010 Oct; 16(10):1562-8.
 - Chutinimitkul S, Herfst S, Steel J, Lowen AC, Ye J, van Riel D, Schrauwen EJ, Bestebroer TM, Koel B, Burke DF, Sutherland-Cash KH, Whittleston CS, Russel CA, Wales DJ, Smith DJ, Jonges M, Meijer A, Koopmans M, Rimmelzwaan GF, Kuiken T, Osterhaus AD, Garcia-Sastre A, Perez DR, Fouchier RA. Virulence-associated substitution D222G in the hemagglutinin of 2009 pandemic influenza A(H1N1) virus affects receptor binding. *J Virol.* 2010 Nov; 84(22): 11802 – 13.
 - R. Bodewes, G. de Mutsert, F.R.M. van der Klis, M. Ventresca, S. Wilks, D.J. Smith, M. Koopmans, R.A.M. Fouchier, A.D.M.E. Osterhaus and G.F. Rimmelzwaan. Prevalence of Antibodies against Seasonal Influenza A and B Viruses in Children in Netherlands. *Clinical and Vaccine Immunology*, Mar 2011, p. 469-476.
 - Fraaij PL, van der Vries E, Beersma MF, Riezebos-Brilman A, Niesters HG, van der Eijk AA, de Jong MD, Reis Miranda D, Horrevorts AM, Ridwan BU, Wolfhagen MJ, Houmes RJ, van Dissel JT, Fouchier RA, Kroes AC, Koopmans MP, Osterhaus AD, Boucher CA. Evaluation of the Antiviral Response to Zanamivir Administered Intravenously for Treatment of Critically Ill Patients with pandemic influenza A (H1N1) Infection. *J Infect Dis.* 2011 Sep; 204(5):777-82.
 - Te Beest DE, Stegeman JA, Mulder YM, van Boven M, Koopmans MP. Exposure of Uninfected Poultry Farms to HPAI (H7N7) Virus by professionals during outbreak control activities. *Zoonoses Public Health.* 58 (2011) 493-499.
 - Huijskens E, Rossen J, Mulder P, van Beek R, van Vugt H, Verbakel J, Rimmelzwaan G, Koopmans M, Peeters M. Immunogenicity, Boostability, and Sustainability of the Immune Response after Vaccination against influenza A Virus (H1N1) 2009 in a Healthy Population. *Clin Vaccine Immunol.* 2011 Sep; 18 (9): 1401-5.
 - Meijer A, Jonges M, Abbink F, Ang W, van Beek J, Beersma M, Bloembergen P, Boucher C, Claas E, Donker G, van Gageldonk-Lafeber R, Isken L, de Jong A, Kroes A, Leenders S, van der Lubben M, Mascini E, Niesters B, Oosterheert JJ, Osterhaus A, Riesmeijer R, Riezebos-Brilman A, Schutten M, Sebens F, Stelma F, Swaan C, Timen A, Van't Veen A, van der Vries E, Te Wierik M, Koopmans M. Osteltamivir-resistant pandemic A(AHN1) 2009 influenza viruses detected through enhanced surveillance in the Netherlands 2009-2010. *Antiviral Res.* 92, 2011 ,p 81-89.
 - M.L.B. Hillaire, S.E. van Trierum, R. Bodewes, C.A. van Baalen, R.S. van Binnendijk, M.P. Koopmans, R.A.M. Fouchier, A.D.M.E. Osterhaus and G.F. Rimmelzwaan. Characterization of the Human CD8+ T Cell Response following Infection with 2009 Pandemic Influenza H1N1 Virus. *Journal of Virology*, Nov. 2011, p. 12057-12061. Published ahead of print on 14 September 2011.
 - Anneke Steens; Sandra Waaijenborg; Peter F. M. Teunis; Johan H. J. Reimerink; Adam Meijer; Mariken van der Lubben; Marion Koopmans; Marianne A. B. van der Sande; Jacco Wallinga; Michiel van Boven. Age-Dependent Patterns of Infection and Severity Explaining the Low Impact of 2009 Influenza A (H1N1): Evidence From Serial Serologic Surveys in the Netherlands, *Am J Epidemiol.* 2011;174(11):1307-1315.
 - Frederika Dijkstra, Marcel Jonges, Ruud van Beek, Gé A. Donker, Francois G. Schellevis, Marion Koopmans, Marianne A.B. van der Sande, Albert D.M.E. Osterhaus, Charles A.B. Boucher, Guus F. Rimmelzwaan and Adam Meijer. Influenza A(H1N1) Osteltamivir Resistant Viruses in the Netherlands during the winter 2007/2008. *The Open Virology Journal*, 2011, 5, 154-162.
 - M. Koopmans, E. de Bruin, G.J. Godeke, I. Friesema, R. van Gageldonk, M. Schipper, A. Meijer, R. van Binnendijk, G.F. Rimmelzwaan, M.D. de Jong, A. Buisman, J. van Beek, D. van de Vijver and J. Reimerink. Profiling of humoral immune responses to influenza viruses by using protein microarray. *Clin Microbiol Infect.* Published online 2011: 10.1111/j.1469- 0691.2011.03701.x
 - Koopmans M, Dittrich S, Bijlmer H, Meijer A. Evaluatie van opschaling van laboratoriumdiagnostiek tijdens de influenzapandemie. *Ned Tijdschr Med Microbiol* 2011; 19(1):33-37.
 - Jonges M, Bataille A, Enserink R, Meijer A, Fouchier RA, Stegeman A, Koch G, Koopmans M. Comparative analysis of

avian influenza virus diversity in poultry and humans during a highly pathogenic avian influenza A (H7N7) virus outbreak. *J Virol.* 2011 Oct;85(20):10598-604. Epub 2011 Aug 17.

- R.J.F. Ypma, M. Jonges, A. Bataille, A. Stegeman, G. Koch, M. van Boven, M. Koopmans, W.M. van Ballegooijen, J. Wallinga. Genetic data provides evidence for wind-mediated transmission of highly pathogenic avian influenza between poultry farms in the Netherlands. Submitted for publication
- Marcel Jonges, Janette Rahamat-Langendoen, Adam Meijer, Bert Niesters, Marion Koopmans. Sequencing influenza viruses to characterize transmission of nosocomial influenza. Submitted for publication.

WP6

- Höfle U, van de Bildt M, Leijten L, Verhagen J, Fouchier R, Osterhaus A, Kuiken T. Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Avian Pathol.* 2012, in press.
- Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. Adaptive pathways of zoonotic influenza viruses: from exposure to establishment in humans. *Vaccine.* 2012;30:4419-34.
- Kuiken T, Riteau B, Fouchier RA, Rimmelzwaan GF. Pathogenesis of influenza virus infections: the good, the bad and the ugly. *Curr Opin Virol.* 2012;2:276-86.
- Ramis AJ, van Riel D, van de Bildt MW, Osterhaus A, Kuiken T. Influenza A and B virus attachment to respiratory tract in marine mammals. *Emerg Infect Dis.* 2012;18:817-20.
- Costa T, Chaves AJ, Valle R, Darji A, van Riel D, Kuiken T, Majó N, Ramis A. Distribution patterns of influenza virus receptors and viral attachment patterns in the respiratory and intestinal tracts of seven avian species. *Vet Res.* 2012;43:28.
- Hoyer BJ, Fouchier RA, Klaassen M. Host behaviour and physiology underpin individual variation in avian influenza virus infection in migratory Bewick's swans. *Proc Biol Sci.* 2012;279:529-34.
- Reperant LA, Kuiken T, Osterhaus AD. Influenza viruses: from birds to humans. *Hum Vaccin Immunother.* 2012;8:7-16.
- Verhagen JH, Munster VJ, Majoor F, Lexmond P, Vuong O, Stumpel JB, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Schutten M, Slaterus R, Fouchier RA. Avian influenza A virus in wild birds in highly urbanized areas. *PLoS One.* 2012;7:e38256.
- Gunnarsson G, Latorre-Margalef N, Hobson KA, Van Wilgenburg SL, Elmberg J, Olsen B, Fouchier RA, Waldenström J. Disease dynamics and bird migration—linking mallards *Anas platyrhynchos* and subtype diversity of the influenza A virus in time and space. *PLoS One.* 2012;7:e35679.
- Kuiken T, Ryser-Degiorgis MP, Gavriel-Widén D, Gortázar C. Establishing a European network for wildlife health surveillance. *Rev Sci Tech.* 2011;30:755-61.
- Keawcharoen J, van den Broek J, Bouma A, Tiensin T, Osterhaus AD, Heesterbeek H. Wild birds and increased transmission of highly pathogenic avian influenza (H5N1) among poultry, Thailand. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:1016-22.
- Daoust PY, Kibenge FS, Fouchier RA, van de Bildt MW, van Riel D, Kuiken T. Replication of low pathogenic avian influenza virus in naturally infected Mallard ducks (*Anas platyrhynchos*) causes no morphologic lesions. *J Wildl Dis.* 2011;47:401-9.
- Reperant LA, van de Bildt MW, van Amerongen G, Buehler DM, Osterhaus AD, Jenni-Eiermann S, Piersma T, Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus H5N1 infection in a long-distance migrant shorebird under migratory and non-migratory states. *PLoS One.* 2011;6:e27814.
- Jourdain E, van Riel D, Munster VJ, Kuiken T, Waldenström J, Olsen B, Ellström P. The pattern of influenza virus attachment varies among wild bird species. *PLoS One.* 2011;6:e24155.
- Hoyer BJ, Munster VJ, Nishiura H, Klaassen M, Fouchier RA. Surveillance of wild birds for avian influenza virus. *Emerg Infect Dis.* 2010;16:1827-34.
- Kuiken T, van den Brand J, van Riel D, Pantin-Jackwood M, Swayne DE. Comparative pathology of select agent influenza A virus infections. *Vet Pathol.* 2010 Sep;47:893-914.
- Reperant LA, Fockar NS, Osterhaus AD, Dobson AP, Kuiken T. Spatial and temporal association of outbreaks of H5N1 influenza virus infection in wild birds with the 0 degrees C isotherm. *PLoS Pathog.* 2010;6:e1000854.
- Munster VJ, Fouchier RA. Avian influenza virus: of virus and bird ecology. *Vaccine.* 2009;27:6340-4.
- Reperant LA, Rimmelzwaan GF, Kuiken T. Avian influenza viruses in mammals. *Rev Sci Tech.* 2009;28:137-59.
- Artois M, Bricout D, Doctrinal D, Fouchier R, Gavriel-Widen D, Globig A, Hagemeijer W, Mundkur T, Munster V, Olsen B. Outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe: the risks associated with wild birds. *Rev Sci Tech.* 2009;28:69-92.
- Fouchier RA, Munster VJ. Epidemiology of low pathogenic avian influenza viruses in wild birds. *Rev Sci Tech.* 2009;28:49-58.
- Latorre-Margalef N, Gunnarsson G, Munster VJ, Fouchier RA, Osterhaus AD, Elmberg J, Olsen B, Wallensten A, Haemig PD, Fransson T, Brudin L, Waldenström J. Effects of influenza A virus infection on migrating mallard ducks. *Proc Biol Sci.* 2009;276:1029-36.
- Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Bestebroer TM, Guldemeester J, Beyer WE, de Wit E, Schutten M, Rimmelzwaan GF, Osterhaus AD, Fouchier RA. Practical considerations for high-throughput influenza A virus surveillance studies of wild birds by use of molecular diagnostic tests. *J Clin Microbiol.* 2009;47:666-73.
- Reperant LA, van Amerongen G, van de Bildt MW, Rimmelzwaan GF, Dobson AP, Osterhaus AD, Kuiken T. Highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) infection in red foxes fed infected bird carcasses. *Emerg Infect Dis.*

- 2008;14:1835-41.
- Wahlgren J, Waldenström J, Sahlin S, Haemig PD, Fouchier RA, Osterhaus AD, Pinhassi J, Bonnedahl J, Pisareva M, Grudin M, Kiselev O, Hernandez J, Falk KI, Lundkvist A, Olsen B. Gene segment reassortment between American and Asian lineages of avian influenza virus from waterfowl in the Beringia area. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2008;8:783-90.
 - Keawcharoen J, van Riel D, van Amerongen G, Bestebroer T, Beyer WE, van Lavieren R, Osterhaus AD, Fouchier RA, Kuiken T. Wild ducks as long-distance vectors of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1). *Emerg Infect Dis.* 2008;14:600-7.
 - Munster VJ, Baas C, Lexmond P, Waldenström J, Wallensten A, Fransson T, Rimmelzwaan GF, Beyer WE, Schutten M, Olsen B, Osterhaus AD, Fouchier RA. Spatial, temporal, and species variation in prevalence of influenza A viruses in wild migratory birds. *PLoS Pathog.* 2007;3:e61.
 - Ducatez MF, Tarnagda Z, Tahita MC, Sow A, de Landtsheer S, Londt BZ, Brown IH, Osterhaus DM, Fouchier RA, Ouedraogo JB, Muller CP. Genetic characterization of HPAI (H5N1) viruses from poultry and wild vultures, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:611-3.
 - Wallensten A, Munster VJ, Latorre-Margalef N, Brytting M, Elmberg J, Fouchier RA, Fransson T, Haemig PD, Karlsson M, Lundkvist A, Osterhaus AD, Stervander M, Waldenström J, Björn O. Surveillance of influenza A virus in migratory waterfowl in northern Europe. *Emerg Infect Dis.* 2007;13:404-11.
 - van Gils JA, Munster VJ, Radersma R, Liefhebber D, Fouchier RA, Klaassen M. Hampered foraging and migratory performance in swans infected with low-pathogenic avian influenza A virus. *PLoS One.* 2007;2:e184.

Colofon

Uitgever

Central Veterinary Institute, onderdeel van Wageningen UR
Postbus 65, 8200 AB Lelystad
T 0320-238 605
E info.cvi@wur.nl
I www.wageningenur.nl/cvi

Samenstelling beeldmateriaal

Dorine Luijkx (CVI)

Tekst

Broer Scholtens, Rik Nijland

Vormgeving en fotografie

Wageningen UR, Communication Services

Druk

227, Kampen

Copyright

© Central Veterinary Institute (CVI), onderdeel van Wageningen UR 2012
Overname van de inhoud is toegestaan na overleg met het CVI.

Aansprakelijkheid

Central Veterinary Institute (CVI), onderdeel van Wageningen UR, aanvaardt geen aansprakelijkheid voor eventuele schade voortvloeiend uit het gebruik van de resultaten van dit onderzoek of de toepassing van adviezen.

Dit vogelgrieponderzoek is gefinancierd door het Ministerie van Economische Zaken, Landbouw & Innovatie (FES-AI Onderzoeksprogramma).

ISBN-nummer: 978-94-6173-490-7

