Transmissiestudie met vier vaccins tegen H5N1 hoogpathogeen vogelgriepvirus (clade 2.3.4.4b)

E.A. Germeraad[1], F.C. Velkers[2], M.C.M de Jong[3], J.L Gonzales[1], J.J. de Wit[2,4], J.A. Stegeman[2], N. Beerens[1#]

1 Wageningen Bioveterinary Research, Lelystad
2 Universiteit Utrecht
3 Wageningen University & Research, Wageningen
4 Royal GD, Deventer
verantwoording auteurschap wordt weergegeven in bijlage

Dit onderzoek is uitgevoerd door Wageningen Bioveterinary Research, Universiteit Utrecht, Wageningen University en Research en Royal GD en gesubsidieerd door het Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, in het kader van het Beleidsondersteunend onderzoekthema 'Effectiviteit van vaccins tegen vogelgriep' (projectnummer BO-43-111-074)

Wageningen Bioveterinary Research
Lelystad, Januari 2023

Rapport 2300528

WAGENINGEN
UNIVERSITY & RESEARCH

Dit rapport is gratis te downloaden op https://doi.org/10.18174/584306 of op www.wur.nl/bioveterinary-research (onder Wageningen Bioveterinary Research publicaties).

© 2023 Wageningen Bioveterinary Research
Postbus 65, 8200 AB Lelystad, T 0320 23 82 38, E info.bvr@wur.nl, www.wur.nl/bioveterinary-research.
Wageningen Bioveterinary Research.

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

Inhoud

Inhoud **3**

Samenvatting **5**

1 Introductie **9**

1.1 Groot aantal infecties met hoogpathogene vogelgriep in Nederland 9
1.2 Huidige beleid tegen hoogpathogene vogelgriep 9
1.3 Aanleiding en doel studie 10

2 Voorwaarden waaraan een vaccin tegen HPAI H5 vogelgriepvirus moet voldoen in NL **11**

2.1 Brede werking 12
2.2 Reduceren van virustransmissie en ziekteverschijnselen na vaccinatie 13
2.3 Onderscheid vaccinatie– en virusinfectie (DIVA) 13
2.4 Monitorings- en surveillanceprogramma's 14
2.5 Vaccineffectiviteit onder praktijkomstandigheden 15
2.6 Toepasbaarheid 15

3 Literatuurstudie **18**

3.1 Introductie literatuurstudie 18
3.2 Typen vaccins 18
3.2.1 Geïnactiveerde vaccins 18
3.2.2 Eiwit-vaccins (subunit-vaccins) 19
3.2.3 Recombinante vector-vaccins 21
3.2.4 mRNA- en DNA-vaccins 24
3.2.5 Levend verzwakte vaccins 25
3.3 Conclusie literatuurstudie 25

4 Dierstudie **26**

4.1 Inleiding 26
4.2 Materiaal en Methode 27
4.2.1 Vergunningen 27
4.2.2 Locatie en huisvesting 27
4.2.3 Dieren en groepen 28
4.2.4 Challengevirus 29
4.2.5 Vaccins 29
4.2.6 Proefopzet 29
4.2.7 NP-ELISA 30
4.2.8 HAR 30
4.2.9 M-PCR 31
4.2.10 Statistische analyses 31
4.3 Resultaten 32
4.3.1 Virustransmissie: berekenen van het reproductiegetal 32
4.3.2 Immuunrespons na vaccinatie 33
4.3.3 Bescherming tegen ziekteverschijnselen na infectie 34
4.3.4 Aantal geïnfecteerde kippen in het dierexperiment 36
4.3.5 Kwantificatie van virusuitscheiding na infectie 39
4.3.6 Correlates of protection 41
4.4 Conclusie 43
4.5 Discussie 44

Literatuur **46**

Bijlage 1: verantwoording auteurschap **52**

Bijlage 2: vaccingegevens **53**

Bijlage 3: schatting van volgende generatie matrix (NGM) **55**

Samenvatting

Nu het hoogpathogene aviaire influenza (HPAI) virus het hele jaar door aanwezig is in Nederland wordt gezocht naar mogelijkheden om pluimvee tegen het vogelgriepvirus te beschermen Dit rapport beschrijft het onderzoek naar de mogelijkheid tot vaccinatie van pluimvee tegen de huidige H5 vogelgriepvirussen in Nederland en de vaccineffectiviteit van vier vaccins. Voor het bepalen van de effectiviteit van een vaccin kunnen verschillende parameters worden beoordeeld. Het belangrijkste is dat door middel van vaccinatie de virustransmissie (virusspreiding) tussen dieren in voldoende mate tegen kan worden gegaan in een gevaccineerd koppel. Dit kan gekwantificeerd worden in een transmissiestudie. De virusuitscheiding gemeten in keel- en cloaca swabs wordt veelal gebruikt in studies om een indicatie te krijgen van de mate van besmettelijkheid. Daarnaast kan ook de effectiviteit in het verminderen van ziekteverschijnselen van de infectie worden beoordeeld. Echter, een vaccin dat alleen in staat is om ziekteverschijnselen te verminderen zonder dat virustransmissie afdoende wordt tegengegaan, wordt in de veterinaire context niet als een effectief vaccin beschouwd. In het eerste deel van het rapport worden de voorwaarden gedefinieerd waaraan een geschikt vaccin tegen HPAI H5 vogelgriepvirussen moet voldoen. Vervolgens geeft de uitgevoerde literatuurstudie een overzicht van de verschillende typen vaccins voor vogelgriep die zijn beschreven in de literatuur en die potentieel effectief zijn tegen HPAI H5 clade 2.3.4.4b virussen die momenteel in Europa circuleren. Het tweede deel van het rapport omvat een beschrijving van de transmissiestudie in opfokleghennen waarin de effectiviteit van vier vaccins tegen transmissie van een HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus is onderzocht.

Een voor Nederland geschikt vaccin tegen de huidige en toekomstige HPAI H5 vogelgriepvirussen dat kan worden ingezet om pluimvee te beschermen, moet voldoen aan meerdere voorwaarden. Het vaccin moet (in combinatie met een ander vaccin) effectief zijn in het reduceren van de virustransmissie ($R<1$) onder praktijkomstandigheden en passen in het huidige vaccinatieprogramma voor pluimvee. Daarnaast moet het mogelijk zijn om gevaccineerde dieren serologisch te onderscheiden van geïnfecteerde dieren (DIVA-principe). Ook moet het mogelijk zijn om monitorings- en surveillanceprogramma's uit te voeren om te bepalen of pluimvee voldoende beschermd is door vaccinatie en of er geen vogelgriepvirus aanwezig is. De literatuur werd bestudeerd om vaccins tegen HPAI H5 vogelgriepvirussen te identificeren. Er zijn verschillende typen vaccins beschreven: geïnactiveerde vaccins, eiwit-, vector-, mRNA- en DNA-vaccins. Daarnaast zijn er levend verzwakte virussen als vaccin beschikbaar, maar het gebruik hiervan is niet toegestaan volgens de WOAH en EU. Vaccins gebaseerd op nieuwe technologieën bevatten slechts een deel van het virus, meestal alleen het HA-gen, waardoor gevaccineerde dieren serologisch zijn te onderscheiden van geïnfecteerde dieren. Dit geldt dus niet voor geïnactiveerde vaccins die het gehele virus bevatten. Geïnactiveerde vaccins wekken met name een antilichaamrespons op. Voor vector-vaccins, mRNA/DNA-vaccins zijn er aanwijzingen dat ook de cellulaire immuunrespons wordt geactiveerd, waardoor ze een bredere werking hebben tegen diverse HPAI H5 virussen. De literatuur geeft onvoldoende informatie over de vaccineffectiviteit na infectie met HPAI H5 clade 2.3.4.4b virussen, en welke immunologische parameters goede maten zijn om te bepalen of dieren voldoende beschermd zijn door vaccinatie. Het gaat daarbij niet om de bescherming van individuele dieren, maar of de groep (het koppel in het veld) beschermd is tegen virustransmissie. Daarom is een transmissiestudie uitgevoerd in groepen opfokleghennen.

Op basis van de bovengenoemde voorwaarden, literatuur en gesprekken met farmaceuten zijn drie moderne vaccins geselecteerd voor de dierstudie. Het betreft HVT-H5 vaccin van Ceva Sante Animale (Ceva), het HVT-H5 vaccin van Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH), en het DNA-vaccin van Huvepharma (HP). Daarnaast werd het Nobilis LPAI H5N2 vaccin (MSD) als vierde vaccin getest in de dierstudie. Dit vaccin is op dit moment het enige in Nederland geregistreerde vaccin en de effectiviteit ervan tegen het huidige vogelgriepvirus werd niet eerder getest. Dit vaccin is gebaseerd op een geïnactiveerd LPAI H5N2 virus en voldoet niet aan de gestelde voorwaarden van het serologische DIVA-principe. In de dierstudie werden er per vaccin 10 commerciële opfokleghennen gevaccineerd op de dag van uitkomst (beide HVT-H5 vaccins), 8 dagen (Nobilis) of 14 dagen (DNA vaccin) leeftijd. Daarnaast was er een controlegroep met 10 kippen die niet werd gevaccineerd. Op 8 weken leeftijd werden 5 kippen van elke groep geïnfecteerd (infectiedieren) met een HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus. De andere 5 kippen, de contactdieren, werden niet geïnfecteerd, zodat kon worden

onderzocht of er virustransmissie kon optreden van de infectiedieren naar deze contactdieren. Daarnaast werd er een additionele Nobilis titergroep getest, waarin de infectiedieren na vaccinatie werden geselecteerd op de aanwezigheid van antilichamen, terwijl de contactdieren ongevaccineerd waren. Voor elk vaccin en de controlegroep werd dit experiment tweemaal uitgevoerd.

De resultaten laten zien dat beide HVT-H5 vaccins virustransmissie in het experiment voorkwamen. De berekende reproductiegetallen (R) voor beide HVT-H5 vaccingroepen waren in dit experiment 0 (95% betrouwbaarheidsinterval (BI) 0-0,70) en daarmee significant lager dan in de controlegroep waarin wel virustransmissie optrad en het reproductiegetal 3,64 (95% BI 1,89-6,99) was. Virustransmissie werd voorkomen in één van de twee Nobilis groepen, maar in geen van de 'DNA HP' groepen. Voor zowel het DNA-vaccin als het Nobilis vaccin ligt de berekende R niet significant onder de 1, respectievelijk 1,89 (95% BI 0,55-5,22) en 1,48 (95% BI 0,30-3,44), volgens de 'final size' methode. In de Nobilis groep werd voor een deel van de infectiedieren geen antilichaamrespons gemeten. Wanneer er werd geselecteerd voor dieren met een antilichaamtiter in de "Nobilis MSD titergroep" dan werd er geen virustransmissie gezien.

De dierstudie laat verder zien dat beide HVT-H5 vaccins 100% effectief zijn in het reduceren van ziekte en sterfte na infectie met het HPAI H5N1 virus. Na vaccinatie met het DNA-vaccin was er 70% sterfte van de infectiedieren en 40% sterfte van de contactdieren na infectie. Ook zijn er ziekteverschijnselen geobserveerd in overlevende dieren. Na toediening van het Nobilis vaccin werd 40% sterfte van de infectiedieren en 30% sterfte van de contactdieren gezien. De sterfte bij de contactdieren in de Nobilis groep was alleen in de groep waar transmissie optrad en niet in de groep waar geen transmissie optrad. Ook was de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding en de hoeveelheid virusuitscheiding door de gevaccineerde infectiedieren met de HVT-H5 vaccins significant minder dan werd gemeten in de ongevaccineerde controlegroep. De waarschijnlijkheid van virusuitscheiding van de kippen die het DNA-vaccin hebben gekregen was niet lager dan voor de controlegroep, maar de hoeveelheid virus die werd uitgescheiden was wel significant lager. De waarschijnlijkheid van virusuitscheiding na vaccinatie met het Nobilis vaccin van MSD was in de cloaca significant verminderd vergeleken met de controlegroep, maar in de keel was dit verschil niet significant. Na vaccinatie met het Nobilis vaccin van MSD was de hoeveelheid virusuitscheiding significant minder dan die van de ongevaccineerde controlegroep. Dus ondanks dat de antigene afstand van het Nobilis vaccin tot het huidige HPAI H5 clade 2.3.4.4b virus relatief groot is, was het vaccin voor dit aspect toch deels effectief. Tot slot werd in de transmissiestudie geïllustreerd dat de HAR-titers onder experimentele omstandigheden een goede maat voor bescherming ('ook wel 'correlates of protection' genoemd) zijn op het gebied van virustransmissie voor het Nobilis vaccin. Voor de nieuwe typen vaccins, die ook cellulaire immuniteit opwekken, en voor de lange termijn onder veldomstandigheden, kunnen op basis van deze studie geen uitspraken gedaan worden.

De conclusie van deze dierstudie is dat beide HVT-H5 vaccins voldoen aan de vooraf gestelde voorwaarden onder de experimentele condities waaronder deze vaccins zijn getest. De virustransmissie voor beide vaccins was vergeleken met de ongevaccineerde controlegroep significant verminderd en de R was significant kleiner dan 1 (R<1). De kippen werden volledige beschermd tegen ziekte na infectie met het HPAI H5N1 virus. De vaccins voldoen aan het DIVA-principe en kunnen *in ovo* (in het ei) of per injectie subcutaan bij eendagskuikens worden toegediend in de broederij. Dit type vector-vaccin is voor zover bekend alleen werkzaam in kippen en kalkoenen. Mogelijk zijn er verschillen in de effectiviteit van deze HVT-vaccins tussen kippen en kalkoenen en verschillende rassen. Verder onderzoek moet uitwijzen hoe verschillende vaccins enkelvoudig, of eventueel in combinatie met een booster, presteren onder veldomstandigheden, wat de duur van de bescherming is en hoe deze kunnen worden ingepast in bestaande vaccinatieprogramma's. Het inrichten van een effectief monitoring- en surveillanceprogramma is essentieel bij toepassing van een vaccinatieprogramma, evenals registratie van de vaccins door de farmaceuten voor gebruik in pluimvee in Nederland.

Abstract
With the year-round presence of the highly pathogenic avian influenza (HPAI) virus in the Netherlands, solutions are being sought to protect poultry from the avian influenza virus. This report describes the research on the possibility of vaccinating poultry against the current H5 avian influenza viruses in the Netherlands and the vaccine effectiveness of four vaccines. Several parameters can be assessed to determine vaccine effectiveness. The most important parameter is that vaccination must sufficiently reduce or prevent virus transmission (virus spread) between animals in a vaccinated flock. Virus transmission can be quantified in a transmission study. Virus excretion measured in throat and cloaca swabs is commonly used in studies to get an indication of the degree of infectivity. In addition, effectiveness in reducing clinical signs from infection can also be assessed. However, a vaccine that is only able to reduce clinical signs without adequately inhibiting virus transmission is not considered an effective vaccine in the veterinary field. The first part of the report defines the conditions that a vaccine against HPAI H5 avian influenza viruses must meet. Next, the literature review provides an overview of the different types of avian influenza vaccines described in the literature that are potentially effective against HPAI H5 clade 2.3.4.4b viruses currently circulating in Europe. The second part of the report includes the description of the transmission study in rearing layers in which the effectiveness of four vaccines against transmission of an HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus was investigated.

A vaccine against current and future HPAI H5 avian influenza viruses that can be used to protect poultry must meet several conditions for use in the Netherlands. The vaccine (in combination with another vaccine) must be effective in reducing virus transmission (R<1) under field conditions and fit into the current vaccination program for poultry. In addition, it must be possible to serologically distinguish vaccinated animals from infected animals (DIVA principle). It should also be possible to conduct monitoring and surveillance programs to determine whether poultry are adequately protected by vaccination and whether no avian influenza virus is present. The literature was reviewed to identify vaccines against HPAI H5 avian influenza viruses. Several types of vaccines have been described: inactivated vaccines, protein, vector, mRNA and DNA vaccines. In addition, live attenuated viruses are available as vaccines, but their use is not permitted by the WOAH and EU. Vaccines based on new technologies contain only a part of the virus, usually only the HA gene, making vaccinated animals serologically distinguishable from infected animals. This is not true for inactivated vaccines that contain the entire virus. Inactivated vaccines in particular elicit an antibody response, but for vector vaccines, mRNA/DNA vaccines, there is evidence that the cellular immune response is also activated, giving them broader activity against various HPAI H5 viruses. The literature does not provide sufficient information on vaccine efficacy after infection with HPAI H5 clade 2.3.4.4b viruses and which immune parameters are good measures of protection to define if the animals are protected by the vaccine. The issue is not the protection of individual animals, but whether the group (the flock in the field) is protected against virus transmission. Therefore, a transmission study was conducted in groups of rearing layers.

Based on the above conditions, literature and discussions with pharmaceutical companies, three modern vaccines were selected for the animal study. They are HVT-H5 vaccine from Ceva Sante Animale (Ceva), the HVT-H5 vaccine from Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH), and the DNA vaccine from Huvepharma (HP). In addition, the Nobilis LPAI H5N2 vaccine (MSD) was the fourth vaccine tested in the animal study. This vaccine is currently the only vaccine registered in the Netherlands and its effectiveness against the current avian influenza virus has not been tested before. This vaccine is based on an inactivated LPAI H5N2 virus and does not meet the set conditions of the serological DIVA principle. In the animal study, 10 commercial rearing layers were vaccinated per vaccine on the day of hatching (both HVT-H5 vaccines) , 8 days (Nobilis) or 14 days (DNA vaccine) of age. In addition, there was a control group with 10 chickens that were not vaccinated. At 8 weeks of age, 5 chickens from each group were infected (infection animals) with a HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus. The other 5 chickens, the contact animals, were not infected so that it could be investigated whether virus transmission could occur from the infected animals to these contact animals. In addition, an additional Nobilis titre group was tested, in which the infected animals were selected for the presence of antibodies after vaccination, while the contact animals were unvaccinated. For each vaccine and control group, this experiment was performed twice.

The results show that both HVT-H5 vaccine prevent viral transmission in the experiment. The calculated reproduction numbers (R) for both HVT-H5 vaccine groups in this experiment were 0 (95% confidence interval (BI) 0-0.70) and thus significantly lower than in the control group in which viral transmission did occur and the reproduction number was 3.64 (95% BI 1.89-6.99). Virus transmission was prevented in one of the two Nobilis groups, but not in the two 'DNA HP' groups. For both the DNA vaccine and the Nobilis vaccine, the calculated R is not significantly below 1, 1.89 (95% BI 0.55-5.22) and 1.48 (95% BI 0.30-3.44), respectively, according to the 'final size' method. In the Nobilis group, no antibody response was measured for some of the infection animals. When animals with antibody titers in the "Nobilis MSD titering group" were selected, no virus transmission was seen.

The animal study further shows that both HVT-H5 vaccines are 100% effective in reducing clinical signs and mortality after infection with the HPAI H5N1 virus. After vaccination with the DNA vaccine, there was 70% mortality of infection animals and 40% mortality of contact animals after infection. Disease symptoms were also observed in surviving animals. After administration of the Nobilis vaccine, 40% mortality of infection animals and 30% mortality of contact animals was seen. Mortality in contact animals in the Nobilis group was only in the group where transmission occurred and not in the group where no transmission occurred. Also, the probability of virus excretion and the amount of virus excretion by the infected animals vaccinated with the HVT-H5 vaccines was significantly less than was measured in the unvaccinated control group. The probability of virus excretion of the chickens that received the DNA vaccine was not lower than for the control group, but the amount of virus excreted was significantly lower. The probability of virus excretion after vaccination with the Nobilis vaccine was significantly reduced in the cloaca compared to the control group, but in the throat this difference was not significant. After vaccination with MSD's Nobilis vaccine, the amount of virus excretion was significantly less than that of the unvaccinated control group. Thus, despite the fact that the antigenic distance of the Nobilis vaccine from the current HPAI H5 clade 2.3.4.4b virus is relatively large, the vaccine was also partially effective for this aspect. Finally, the transmission study illustrated that the HAR titers under experimental conditions are a good measure of protection ("also called correlates of protection") in terms of virus transmission for the Nobilis vaccine. For the new types of vaccines, which also induce cellular immunity, and for the long term under field conditions, no statements can be made based on this study.

The conclusion of this animal study is that both HVT-H5 vaccines meet the predetermined conditions in an experimental environment under which these vaccines were tested. Virus transmission for both vaccines was significantly reduced relative to the unvaccinated control group and the R was significantly smaller than 1 ($R<1$). Chickens were completely protected from disease after infection with the HPAI H5N1 virus. The vaccines comply with the DIVA principle and can be administered *in ovo* (in the egg) or by injection subcutaneously to day-old chicks in the hatchery. This type of vector vaccine is known to be effective only in chickens and turkeys. There may be differences in the efficacy of these HVT vaccines between chickens and turkeys and different breeds. Further research should reveal how different vaccines perform singly, or possibly in combination with a booster, under field conditions, the duration of protection, and how they can be incorporated into existing vaccination programs. Establishing an effective monitoring and surveillance program is essential when applying a vaccination program, as is registration of the vaccines by pharmaceutical companies for use in poultry in the Netherlands.

1 Introductie

1.1 Groot aantal infecties met hoogpathogene vogelgriep in Nederland

In Nederland zijn er de laatste jaren hoogpathogene aviaire influenza (HPAI) H5 virussen gedetecteerd in pluimvee en wilde vogels. In 2014, 2016 t/m 2018 en 2020 is er in de wintermaanden in totaal op 27 pluimveebedrijven HPAI H5 virus gedetecteerd [1-3]. In 2021-2022 was het aantal infecties in pluimvee veel hoger dan in voorgaande jaren. Van 1 oktober 2021 t/m 30 september 2022 zijn er in totaal op 66 commerciële pluimveebedrijven en op 20 locaties met >50 gehouden vogels HPAI H5 virussen gedetecteerd [4]. Daarnaast werden er, in tegenstelling tot voorgaande jaren, in 2022 ook in de zomer met hoge frequentie HPAI H5 virussen gedetecteerd in pluimvee en wilde vogels. De HPAI H5 vogelgriepvirussen werden in Nederland geïntroduceerd door wilde watervogels, die vanuit de broedgebieden in Rusland naar Nederland trekken om te overwinteren. In oktober arriveren de meeste watervogels in Nederland, zoals kuifeenden, smienten, zwanen en verschillende soorten ganzen. Tijdens hun verblijf in Nederland infecteren ze andere vogels, maar in het voorjaar vertrekken de trekvogels weer en wordt de vogeldichtheid lager. Daarnaast worden de weersomstandigheden in het voorjaar minder gunstig voor de overleving van het aviaire influenza virus (AIV). Deze factoren zorgden in eerdere jaren ervoor dat het vogelgriepvirus weer uit Nederland verdween in het voorjaar. Echter, in 2022 werd het vogelgriepvirus gedurende de zomer nog in een groot aantal dood gevonden wilde vogels en pluimvee gedetecteerd [4]. Door het grote aantal infecties en de aanwezigheid van het vogelgriepvirus gedurende de zomer is de vogelgriepsituatie in Nederland veranderd. Niet alleen in Nederland waren er in 2021-2022 een groot aantal infecties met vogelgriep, maar ook andere Europese landen detecteerden in dezelfde periode een groot aantal vogelgriepinfecties in pluimvee. Van 1 oktober 2021 t/m 30 september 2022 zijn er in Frankrijk op 1450 pluimveelocaties en in Italië op 319 pluimveelocaties HPAI H5 virussen gedetecteerd. Het vogelgriepvirus werd aangetoond in 36 Europese landen in deze periode [5].

1.2 Huidige beleid tegen hoogpathogene vogelgriep

Nederland heeft een grote pluimveepopulatie. In 2021 telde Nederland ongeveer 80 miljoen stuks pluimvee [6]. De pluimveesector bestaat voor ongeveer 98% uit kippen, waarvan 45% leghennen en 55% vleeskuikens (beide incl. ouderdieren), 1% vleeseenden, 0,5% kalkoenen en 0,5% overig pluimvee [7]. Door de hoge pluimveedichtheid zijn goede monitoring, snelle diagnostiek en snel ingrijpen bij besmettingen van belang om vogelgriepvirustransmissie tussen bedrijven tegen te gaan. De huidige EU-regelgeving kent een "stamping-out" beleid voor hoogpathogene vogelgriep, wat betekent dat een pluimveebedrijf wordt geruimd bij detectie van het virus [8]. Daarnaast wordt er om een besmet pluimveebedrijf, of een locatie met gehouden pluimvee >50 dieren, een beperkingszone (10 km) ingesteld rond het bedrijf, waarbinnen een vervoers- en jachtverbod geldt en die bestaat uit een bewakingszone (3-10 km) en beschermingszone (<3 km), waar extra maatregelen gelden. Voorheen werden pluimveebedrijven binnen 1 km rond het besmette bedrijf altijd preventief geruimd om virustransmissie tussen bedrijven (tussen-bedrijf transmissie) te voorkomen. Echter, in het seizoen van 2021-2022 heeft de NVWA per casus bepaald of deze bedrijven preventief geruimd moesten worden. Er werd alleen geruimd als het reproductiegetal (R, een maat voor het aantal secundaire besmettingen veroorzaakt door één besmette locatie) van bedrijven hoger werd geschat dan 1 of er risicovolle contacten tussen bedrijven werden geïdentificeerd.

Om vogelgriepinfecties in pluimvee te voorkomen nemen veehouders extra hygiënemaatregelen. Daarnaast is pluimvee van commerciële bedrijven al sinds oktober 2021 in een groot deel van Nederland opgehokt. In de periode van 28 juni 2022 t/m 5 oktober 2022 was in enkele regio's in het oosten van Nederland de ophokplicht tijdelijk opgeheven, maar vanaf 6 oktober 2022 gold weer een landelijke ophokplicht [9]. Voor hobbyhouders geldt sinds oktober 2021 een afschermplicht, waarbij getracht wordt om contact tussen pluimvee en wilde vogels te voorkomen.

1.3 Aanleiding en doel studie

Het huidige bestrijdingsbeleid van hoogpathogene vogelgriep is bij een ziekte die een groot deel van het jaar voorkomt niet houdbaar. De bestrijding van het vogelgriepvirus gaat gepaard met het ruimen van grote aantallen dieren. Dit heeft een grote sociaal-economische impact. Bovendien is het langdurig ophokken of afschermen van het pluimvee en vogels als preventieve maatregel een aantasting voor het dierwelzijn. Het grote aantal infecties op pluimveebedrijven toont daarnaast aan dat het huidige beleid niet afdoende blijkt om virusinsleep te voorkomen. Daarom wordt er gezocht naar mogelijkheden om het pluimvee tegen vogelgriep te beschermen door te vaccineren. Op dit moment behoort vaccinatie in Nederland nog niet tot de mogelijkheden, omdat er geen geschikt vaccin is geregistreerd. Daarnaast zal vaccinatie gevolgen hebben voor de handelsmogelijkheden voor pluimvee- en pluimveeproducten.

In opdracht van het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) is een studie uitgevoerd om de mogelijkheid tot vaccinatie van pluimvee tegen vogelgriep in Nederland te onderzoeken. Deze studie is uitgevoerd door Wageningen Bioveterinary Research (WOT-unit Besmettelijke Dierziekten), Universiteit Utrecht, WUR en Royal GD Deventer. In deze studie wordt de effectiviteit van vier vaccins onderzocht. Voor het bepalen van de effectiviteit van een vaccin kunnen verschillende parameters worden beoordeeld. Het belangrijkste doel van vaccinatie tegen vogelgriep is het voorkomen dat koppels pluimvee besmet raken. Om dit te bereiken moet het vaccin virustransmissie (virusspreiding) tussen dieren in voldoende mate tegen kunnen gaan. Wanneer virustransmissie tussen dieren voldoende kan worden verminderd zal een infectie van een enkel dier niet leiden tot een uitbraak in het koppel. Hierdoor neemt ook de kans op tussen-bedrijf transmissie, de kans op ziekte bij pluimvee en de kans op humane blootstelling af.

Een vermindering van virustransmissie kan bereikt worden door een vermindering van de mate van besmettelijkheid (infectiviteit) en/of een vermindering van de vatbaarheid van de individuen in een gevaccineerd koppel. De virusuitscheiding gemeten in keel- en cloaca swabs wordt veelal gebruikt in studies om de mate van besmettelijkheid te kwantificeren. Daarnaast kan ook de effectiviteit in het verminderen van ziekteverschijnselen van de infectie worden beoordeeld. Echter, een vaccin dat alleen in staat is om ziekteverschijnselen te verminderen zonder dat virustransmissie afdoende wordt tegengegaan, wordt niet als een effectief vaccin beschouwd. In deze situatie zouden infecties namelijk niet snel opgemerkt worden terwijl het virus blijft circuleren tussen dieren en bedrijven. Hoewel in een veterinaire context het verminderen van ziekteverschijnselen niet het doel op zichzelf zal zijn van de vaccinatie, hangt het wel samen met de andere parameters. Wanneer dankzij vaccinatie een dier niet besmet raakt wordt het dier ook niet ziek. In dit rapport worden dan ook voornamelijk de effecten gerelateerd aan de virustransmissie bedoeld wanneer er gesproken wordt over vaccineffectiviteit en/of bescherming tegen infectie.

Dit rapport bestaat uit twee delen. Het eerste deel start met de voorwaarden voor het vaccineren van pluimvee in Nederland tegen het huidige HPAI H5 virus. Vervolgens vat de literatuurstudie de verschillende typen vaccins die ontwikkeld zijn voor de bescherming van pluimvee tegen HPAI H5 virussen samen. Naast traditionele geïnactiveerde vaccins worden eiwit-vaccins, vector-vaccins en mRNA/DNA-vaccins voor de bescherming van pluimvee tegen vogelgriep besproken. In de literatuur is met name gezocht naar informatie over de vaccineffectiviteit in het voorkomen of verminderen van de virustransmissie na infectie met H5 virussen van clade 2.3.4.4b. Het tweede deel van het rapport omvat de methode en resultaten van de uitgevoerde dierstudie, waarbij de virustransmissie na vaccinatie met vier vaccins na een infectie met het huidige HPAI H5N1 virus is onderzocht.

2 Voorwaarden waaraan een vaccin tegen HPAI H5 vogelgriepvirus moet voldoen in NL

Aanbevelingen van de World Organisation for Animal Health met betrekking tot vaccinatie
De World Organisation for Animal Health (WOAH) heeft voorwaarden waaraan vaccins tegen vogelgriep moeten voldoen beschreven in de "Terrestrial manual" [10]:

- Vaccinproductie moet plaatsvinden onder gecontroleerde omstandigheden en de vaccins moeten aantoonbaar zuiver zijn.
- Het vaccin moet veilig zijn voor het doeldier en niet-doeldieren. Dierstudies moeten worden uitgevoerd om tolerantie en veiligheid van het vaccin aan te tonen.
- Levende (verzwakte) vaccins worden niet aanbevolen, vanwege het risico op reassortment van gensegmenten of reversie tot virulentie.
- Vaccins moeten worden getest door na vaccinatie kippen experimenteel te infecteren (> 3 weken na vaccinatie) met een dosis van 10^6 Egg Infectious Dose (EID_{50}), of een dosis die minimaal 90% sterfte geeft in ongevacineerde dieren.
- Er wordt een minimum antigene dosis aanbevolen van 50 Protective Dose (PD_{50}, de dosis waarin 50% van de geïnfecteerde dieren overleeft) of 3 µg haemagglutinine per vaccin dosis.
- De HAR-titers in het veld moeten minimaal 5 zijn om tegen sterfte te beschermen en minimaal 7 zijn om virusuitscheiding te reduceren.
- Een vaccin moet minimaal een jaar houdbaar zijn.

Europese wetgeving met betrekking tot vaccinatie
Op dit moment is HPAI door de Europese Unie ingeschaald als een ziekte die gewoonlijk niet voorkomt in de EU en waarvoor onmiddellijke bestrijdingsmaatregelen moeten worden genomen zodra de ziekte wordt aangetoond en waarvoor verspreidingsmaatregelen en bewaking nodig zijn (stamping out) [11]. Op dit moment is de Europese Commissie bezig met een wetswijziging [12]. Deze wijziging geeft EU lidstaten de mogelijkheid om preventief te vaccineren tegen vogelgriep onder bepaalde voorwaarden [12]. Wanneer een EU lidstaat preventief wilt vaccineren moet er een officieel vaccinatieplan worden opgesteld en worden gedeeld met andere EU lidstaten en de Europese commissie. Na het toepassen van vaccinatie moet er verscherpt toezicht plaatsvinden door wekelijks te testen op de aanwezigheid van HPAI virus. Daarnaast moet een bedrijf minimaal één keer per maand worden bezocht door een dierenarts waarbij de productie- en gezondheidsgegevens geëvalueerd worden. Bij dit bedrijfsbezoek moeten ook monsters worden afgenomen voor serologisch en virologisch onderzoek. Tot slot moeten de transportbewegingen van gevaccineerde dieren en dierproducten worden geregistreerd [12]. Deze voorwaarden zijn gesteld om vaccinatie binnen de EU mogelijk te maken met behoud van handelsmogelijkheden.

In de EU mogen, m.u.v. noodsituaties, alleen vaccins aan pluimvee worden toegediend die zijn geregistreerd door de European Medicines Agency (EMA). Deze instantie beoordeelt de humane en veterinaire veiligheid van een vaccin. Op dit moment is er één vaccin tegen HPAI H5 virus geregistreerd in Nederland, namelijk het geïnactiveerde Nobilis Influenza vaccin op basis van een LPAI H5N2 stam uit 1986 [13]. Het virus in dit vaccin en het huidige circulerende HPAI H5N1 virus zijn niet nauw verwant, waardoor wordt verwacht dat het vaccin niet voldoende zal beschermen. In het verleden zijn het Nobilis Influenza H5N6 en Poulvac Flufend H5N3 RG ook geregistreerd door de EMA, maar deze vaccins zijn nu niet meer geregistreerd voor gebruik [14, 15].

Opgestelde voorwaarden voor een vaccin in Nederland
Het onderzoeksconsortium heeft zes voorwaarden opgesteld waaraan een vaccin tegen HPAI H5 vogelgriepvirussen in Nederland aan zou moeten voldoen, waarbij ook rekening wordt gehouden met de voorwaarden vanuit de WOAH en EU:

1. Een vaccin moet een **brede werking** hebben en ook effectief zijn tegen toekomstige HPAI H5 virussen, want het vogelgriepvirus verandert en evolueert snel.

2. Het vaccin moet **transmissie van het virus voldoende tegengaan** (R<1) en beschermen tegen vogelgriepuitbraken in pluimveekoppels.

3. Het moet mogelijk zijn om gevaccineerde dieren, bij voorkeur serologisch, te onderscheiden van geïnfecteerde dieren met specifieke diagnostiek (**DIVA-principe**).

4. Het moet mogelijk zijn om een **monitorings- en surveillanceprogramma** uit te voeren, om te bepalen of koppels voldoende beschermd zijn door vaccinatie en blijven in de tijd, om eventuele uitbraken in een gevaccineerd bedrijf te ontdekken, en om aan te tonen dat een bedrijf vrij is van vogelgriep.

5. Binnen het geadviseerde vaccinatieschema moet het vaccin ook voldoende beschermen tegen een uitbraak binnen en tussen bedrijven onder **praktijkomstandigheden**, wanneer een bepaald percentage van de dieren of koppels onvoldoende of niet gevaccineerd kan zijn.

6. Zowel vaccinatie als monitoring en surveillance moet makkelijk **toepasbaar** en kosteneffectief zijn, en de vaccinatie moet passen in het huidige vaccinatieprogramma van pluimvee, waarbij de koppels gedurende de gehele levensduur beschermd moeten zijn.

In de paragrafen hieronder worden de zes voorwaarden nader toegelicht en beargumenteerd aan de hand van literatuur.

2.1 Brede werking

Wereldwijd zijn er verschillende vogelgriepvirussen, waarvan H5 en H7 virussen hoogpathogeen kunnen zijn. Aviaire influenza (AI) virussen zijn RNA-virussen en kunnen snel muteren door 'antigene shift', wanneer twee virussen zich combineren tot een nieuw virus, en 'antigene drift', mutaties door inserties, deleties en puntmutaties in het genoom van het virus [16]. Het subtype van het virus, bijvoorbeeld H5N1, wordt bepaald door de verschillende haemagglutinine en neuraminidase eiwitten die op de buitenkant van het eiwit worden gepresenteerd. Deze genen kunnen genetisch uitgewisseld worden, waardoor er een ander subtype ontstaat. Echter, binnen een subtype verschillen virussen genetisch ook van elkaar [16]. De verschillende HPAI H5 virussen worden ingedeeld in verschillende groepen, zogenaamde clades, op basis van gelijkheid van het genoom. De HPAI H5 virussen die sinds 2016 in Nederland worden gedetecteerd behoren tot clade 2.3.4.4b [1-3].

Door de hoge mutatiesnelheid van het vogelgriepvirus ontwikkelen er steeds nieuwe virusvarianten. Een geschikt vaccin moet het pluimvee tegen het huidige virus, maar ook tegen nieuwe genetisch verwante virusvarianten kunnen beschermen. In het verleden is al gebleken dat wanneer het virus muteerde, en dus het virus en het vaccin niet voldoende genetische overeenkomst meer vertoonden, de effectiviteit van vaccins verminderde [17, 18]. Deze genetische overeenkomst tussen het vaccin en het virus kan worden uitgedrukt in 'antigene afstand' [19]. De antigene afstand kan worden bepaald met behulp van de haemagglutinatie remmingstest (HAR). In de HAR wordt gebruik gemaakt van de haemagglutinerende eigenschappen, het laten klonteren van rode bloedcellen, van het vogelgriepvirus. Indien de antilichamen in het serum binden aan het virus in de test, dan wordt klontering van de rode bloedcellen voorkomen. Door het serum in een verdunningsreeks te testen kan de hoeveelheid, oftewel de titer, van de HA-specifieke-antilichamen in het bloed worden bepaald. De antigene afstand wordt bepaald door het verschil in HAR-titers te bepalen wanneer het serum wordt getest tegen het vaccinvirus en het veldvirus. Voor traditionele geïnactiveerde vaccins wordt veelal aangenomen: hoe groter de antigene afstand tussen het vaccin en het virus, hoe lager de HAR-titers en hoe lager de bescherming tegen het virus [19, 20]. Dit geeft aan dat het belangrijk is om informatie over de antigene afstand tussen vaccinvirus en veld- of challengevirus (het virus waarmee dieren worden besmet in een proef) mee te nemen bij de opzet en interpretatie van (transmissie)studies en voor het kiezen van de testsera, omdat deze een grote invloed kunnen hebben op de uitkomsten. Wel is uit diverse experimenten met geïnactiveerde vaccins gebleken dat transmissie, ook bij relatief grote antigene afstanden tussen vaccin- en challengevirus, onder experimentele omstandigheden voldoende kon worden gereduceerd. Voor de reductie van transmissie is het belangrijk dat bij voldoende dieren voldoende hoge HAR-titers worden opgewekt, waarbij factoren zoals de toegediende vaccindosis per dier en het aantal succesvol gevaccineerde dieren een belangrijke rol kunnen spelen [19].

De meer traditionele vaccins, de geïnactiveerde vaccins wekken met name een humorale immuunrespons op, waarbij antilichamen worden geproduceerd. Echter, de cellulaire immuunrespons door o.a. cytotoxische T-cellen speelt ook een grote rol in de immuniteit [21]. De moderne vaccins, gebaseerd op nieuwe technologieën (vector-vaccins, mRNA/DNA-vaccins en waarschijnlijk subunit-vaccins) wekken zowel een humorale als een cellulaire immuunrespons op, waardoor ze een bredere werking hebben tegen het vogelgriepvirus dan bijvoorbeeld geïnactiveerde vaccins [22-26]. Een brede werking is essentieel voor het effect van vaccineren op lange termijn, zodat pluimvee ook tegen gemuteerde HPAI H5 virusvarianten uit clade 2.3.4.4.b en het liefst ook uit andere clades, is beschermd.

2.2 Reduceren van virustransmissie en ziekteverschijnselen na vaccinatie

Het belangrijkste doel van vaccinatie tegen vogelgriep in Nederland is het voorkomen dat koppels pluimvee besmet raken. Wanneer virustransmissie tussen dieren voldoende kan worden verminderd zal een infectie van een enkel dier niet leiden tot een uitbraak in het koppel. Een vermindering van virustransmissie kan bereikt worden door een vermindering van de mate van besmettelijkheid (infectiviteit) en/of een vermindering van de vatbaarheid van de individuen in een gevaccineerd koppel. De virusuitscheiding gemeten in keel- en cloaca swabs kan worden gebruikt om de mate van besmettelijkheid te kwantificeren. Gedurende een infectie met HPAI virus worden grote hoeveelheden virus via de luchtwegen en via de cloaca uitgescheiden [27]. Door deze virusuitscheiding kunnen andere dieren ook geïnfecteerd raken wanneer ze direct, of indirect, in contact komen met uitscheidingsproducten waarin het virus aanwezig is, zoals mest. Een effectief vaccin reduceert de virusuitscheiding tussen dieren in een koppel en reduceert de besmettelijkheid en vatbaarheid van dieren voor infectie. Dit kan bepaald worden door middel van transmissiestudies. Door de vaccinatie kan het reproductiegetal onder de 1 ($R<1$) komen en kan de virustransmissie tussen dieren in een koppel uitdoven. Wanneer de virustransmissie binnen een koppel beperkt blijft tot een kleine uitbraak is de kans op verspreiding naar andere stallen en bedrijven minimaal. Dus bij een effectief vaccinatieprogramma wordt het reproductiegetal voor virustransmissie tussen bedrijven ook kleiner dan 1 [28].

Hoogpathogene vogelgriepvirussen zijn zeer ziekmakend, waardoor de sterfte hoog is. Kippen en kalkoenen overlijden zeer snel na infectie met HPAI virus. Ter illustratie: in een dierstudie werd een HPAI H5N6 virus clade 2.3.4.4b, het virus dat in 2017 in Nederland werd gedetecteerd, via de luchtwegen toegediend aan 10 6-weken-oude SPF-opfokleghennen. Alle 10 kippen waren binnen 48 uur overleden [29]. In andere pluimveesoorten, zoals vleeseenden, of andere vogels, kan er ook sterfte optreden door infectie met HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4b, maar deze is minder massaal dan in kippen [29, 30]. Vooral bij vermeerderingseenden valt op dat er geen of nauwelijks verhoogde sterfte is, maar wel een duidelijke eilegdaling en voeropnamedaling [30]. De ziekteverschijnselen die worden geobserveerd variëren per pluimvee/vogelsoort en virus en kunnen, naast de eerdergenoemde sterfte en effecten op voeropname en eiproductie bestaan uit neurologische verschijnselen, luchtwegverschijnselen, oedeem, cyanose (blauwverkleuringen) en bloeduitstortingen van huid en inwendige organen [31]. Of ziekteverschijnselen zullen optreden en hoe ernstig deze zijn is weliswaar diersoortafhankelijk, maar houdt in veel gevallen verband met de mate waarin het virus in de dieren kan aanslaan en vermeerderen. Wanneer vermeerdering van het virus in het dier en virustransmissie voldoende kunnen worden tegengegaan zullen minder dieren in een koppel ernstig ziek worden. Dit is ook erg belangrijk vanuit het oogpunt van dierenwelzijn. Hierbij moet opgemerkt worden dat anders dan in Nederland, in andere gebieden van de wereld, waar het vogelgriepvirus al gedurende jaren endemisch is, het vaccinatieprogramma juist primair gericht kan zijn op het reduceren van ziekteverschijnselen en de effecten op productie.

2.3 Onderscheid vaccinatie– en virusinfectie (DIVA)

In Nederland wordt pluimvee serologisch gescreend op de afwezigheid van antilichamen tegen vogelgriep. Deze detectie van antilichamen vindt plaats op basis van het haemagglutinine (HA)- en nucleocapsideproteïne (NP)-eiwit. Wanneer er antilichamen tegen vogelgriep worden gevonden wordt het pluimvee direct onderzocht op de aanwezigheid van virus. Op deze manier worden veldinfecties opgespoord die niet door ziekteverschijnselen zijn opgemerkt. Vaccins stimuleren ook de productie van antilichamen, maar deze antilichamen moeten dus serologisch onderscheiden kunnen worden van antilichamen die door infectie zijn

gestimuleerd. Dit principe wordt 'differentiating infected from vaccinated animals' (DIVA) genoemd [10]. In geïnactiveerde vaccins is een volledig virus verwerkt en daardoor worden antilichamen gemaakt die bestaan uit alle viruseiwitten, dus ook tegen HA en NP. Hierdoor is een geïnfecteerd dier o.b.v. serologische testen niet altijd meer te onderscheiden van een gevaccineerd dier. Alleen wanneer een veldstam een ander NA-type heeft, kan op basis hiervan onderscheid worden gemaakt. Echter, vogelgriepvirussen kunnen snel evolueren en genetische informatie uitwisselen, daarom is dit systeem niet robuust voor DIVA. Wanneer het NA-type tussen het vaccinvirus en veldvirus niet verschilt is DIVA voor geïnactiveerde vaccins alleen nog mogelijk met detectie van het virus middels PCR. Deze strategie is kostbaar en tijdrovend. Daarom gaat de voorkeur uit naar DIVA op basis van serologie. Modernere type vaccins, zoals vector-vaccins, DNA-vaccins en subunit-vaccins, bestaan alleen uit het HA-gen waardoor er op basis van antilichamen tegen het NP-eiwit onderscheid gemaakt kan worden tussen vaccin of infectie [18, 22, 32]. De antilichamen van deze vaccins kunnen dus op basis van serologische testen onderscheiden worden. Dergelijke serologische testen kunnen hierdoor een belangrijk onderdeel zijn van programma's die bedoeld zijn om veldinfecties na vaccinatie nog op te kunnen sporen en om de export van pluimveeproducten mogelijk te maken.

2.4 Monitorings- en surveillanceprogramma's

Het doel van het monitorings- en surveillanceprogramma voor HPAI virus bij gevaccineerd pluimvee is tweeledig. Ten eerste, moet in een gevaccineerd koppel kunnen worden aangetoond dat de vaccinatie voldoende aangeslagen is. Dit kan worden gemeten door het meten van de immuunrespons na vaccinatie. Ten tweede, is het belangrijk om in gevaccineerd pluimvee circulerend vogelgriepvirus snel te kunnen detecteren. Dit kan worden gemeten door de afwezigheid van virus of antilichamen tegen vogelgriep. Op deze twee specifieke doelen wordt hieronder verder ingegaan.

Monitoring van de immuunrespons na vaccinatie

Het is belangrijk om de immuunrespons na vaccinatie in een koppel pluimvee te kunnen meten. De hoeveelheid antilichamen die wordt gestimuleerd door de humorale immuunrespons na vaccinatie kan worden gekwantificeerd in de HAR [10]. Voor geïnactiveerde vaccins is uit onderzoek, zoals [19, 33, 34], gebleken dat de hoogte van de HAR-antilichaamtiters, gecombineerd met de verdeling van deze titers in het koppel, gebruikt kan worden om in te schatten of een vaccin voldoende is aangeslagen om een koppel te kunnen beschermen (en dus goede zogenaamde 'correlates of protection' zijn). Dit is mogelijk minder het geval voor vector-vaccins en mRNA/DNA-vaccins. Deze vaccins wekken zowel een humorale (te meten met antilichamen) als een cellulaire immuunrespons op. De humorale immuunrespons van deze vaccins kan na vaccinatie lager zijn dan na vaccinatie met geïnactiveerde vaccins, maar dan zou het pluimvee beschermt kunnen worden door de opgewekte cellulaire immuunrespons [18, 23, 35]. Voor deze vaccins zou het dus van belang kunnen zijn dat de cellulaire immuunrespons ook gekwantificeerd moet worden, wanneer het meten van antilichamen alleen onvoldoende blijkt te zijn. Dit kan met bijvoorbeeld de IFN-γ ELIspot, waarbij de hoeveelheid IFN-γ wordt gemeten [36, 37]. Echter, deze methode is arbeidsintensief. Een andere mogelijk geschikte methode is een volbloedkleuring (waarbij de activatie van de cellulaire immuunrespons wordt gemeten [38]). Voor het kwantificeren van de immuunrespons na vaccinatie moet een passend en efficiënt monitoringssysteem worden ontwikkeld, waarbij het vaccinatieprogramma zo wordt ingericht dat extra gevaccineerd zal worden bij een te lage immuunrespons. Uit vervolgonderzoek, onder experimentele- en/of veldomstandigheden, in koppels gevolgd over langere tijd kan nader worden bepaald of de HAR-titers voldoende 'correlates of protection' zijn voor vector en mRNA/DNA-vaccins of dat (een combinatie met) andere methoden meer geschikt zijn om (het verloop van) de mate van bescherming door het vaccin te meten.

Surveillance van vogelgriep bij gevaccineerde dieren

Het is belangrijk om circulerende vogelgriepvirussen snel te kunnen detecteren in gevaccineerd pluimvee. Doordat de ziekteverschijnselen en sterfte bij vaccinatie kunnen worden gereduceerd, kan een HPAI infectie niet of minder snel opgemerkt worden. Als een virus niet wordt opgemerkt en sluimert in een koppel pluimvee kan het virus onopgemerkt spreiden tussen pluimveebedrijven. Dit heeft in diverse landen waar wordt gevaccineerd, zoals China en Indonesië, geleid tot uitbraken die niet snel werden gedetecteerd, waardoor het virus zich heeft kunnen verspreiden tussen bedrijven [17, 39]. Dit proces wordt ook wel 'silent spread' genoemd. In goed gevaccineerde koppels en met goede monitorings- en surveillanceprogramma's is de kans op 'silent spread' klein. Echter, 'silent spread' kan zelfs in ongevaccineerde koppels voorkomen [40]. Een

langdurige viruscirculatie in een gevaccineerde populatie kan resulteren in nieuwe virusvarianten, zoals is aangetoond in verschillende landen in het Midden-Oosten en Azië en in Mexico met de H5Nx (Gs/GD), H7N3, H7N9 of H9N2 virussen [10, 18]. Met name door het risico op 'silent spread' zijn landen behoedzaam voor het gebruik van vaccinatie en import van gevaccineerd pluimvee. Om deze 'silent spread' te voorkomen en export doorgang te kunnen laten vinden is het dus belangrijk dat vaccinatie gepaard gaat met een passend surveillancesysteem.

Antilichamen tegen het vogelgriepvirus kunnen worden aangetoond in bloedmonsters met een ELISA. De NP-ELISA richt zich op één van de elf virale eiwitten namelijk het nucleocapsideproteïne (NP) van vogelgriep. Daarom zou de NP-ELISA, die op dit moment wordt gebruikt voor de screening op vogelgriep antilichamen, nog kunnen worden gebruikt wanneer er wordt gevaccineerd met vaccins die enkel bestaan uit het virale HA-eiwit. Echter, op dit moment worden positieve resultaten van de NP-ELISA bevestigd met de Haemagglutinine remmingstest (HAR) gericht op het H5 eiwit. Doordat alle typen vaccins het H5 eiwit bevatten zal de HAR-test dus geen onderscheid meer kunnen maken tussen gevaccineerde en geïnfecteerde dieren. De NP-ELISA kan dus niet meer worden bevestigd met de HAR en dus zal er voor bevestiging direct moeten worden overgegaan naar de detectie van het virus in keel- en cloaca swabs. Deze swabs worden onderzocht met de PCR-test gericht op het Matrix-eiwit. De PCR-test kan zowel bij gevaccineerde als ongevaccineerde dieren worden ingezet om geïnfecteerde dieren te detecteren. De PCR-methode is duurder dan de HAR-test en kent beperkingen na vaccinatie, omdat vaccinatie virusuitscheiding en ziekteverschijnselen na infectie zal verminderen. Het is dan minder eenvoudig om zieke dieren die op dat moment virus uitscheiden te selecteren voor de test, dat maakt dat een relatief groot aantal willekeurige dieren bemonsterd zal moeten worden om met een zekere betrouwbaarheid de afwezigheid van een infectie aan te tonen. Echter, met behulp van PCR kan een infectie wel veel sneller aangetoond worden dan op basis van antilichamen, want antilichamen ontstaan pas na een paar weken en virusuitscheiding is een dag na infectie al detecteerbaar. Wanneer er in Nederland gevaccineerd gaat worden zal er een effectief surveillancesysteem, gebaseerd op verschillende principes (serologie en PCR), moeten worden ingericht passend bij het vaccinatieprogramma. Hierbij zouden ook andere soorten monsters dan swabs kunnen worden genomen. Gedacht kan worden aan het testen van alle gestorven dieren (bucket-sampling), het bemonsteren van de omgeving, bijvoorbeeld van het strooisel door middel van overschoentjes of het nemen van stof- of swabmonsters uit de stal- of stalinventaris, of het testen van watermonsters. De gevoeligheid van deze andere typen bemonstering moet echter nog onderzocht worden.

2.5 Vaccineffectiviteit onder praktijkomstandigheden

In het verleden is gebleken dat vaccins minder werkzaam zijn in het veld dan in de geconditioneerde omgeving tijdens een dierstudie [41, 42]. Tijdens dierexperimenten worden kippen niet blootgesteld aan infecties met andere ziekteverwekkers en ontvangen zij niet de vaccinaties uit het reguliere vaccinatieprogramma van pluimvee. Aangezien co-infecties en vaccinaties invloed kunnen hebben op de immuunrespons na vaccinatie kan de effectiviteit in het veld minder goed zijn dan onder proefomstandigheden. Ook zal de kwaliteit van de massavaccinatie onder praktijkomstandigheden afwijken van de individuele toediening in een dierexperiment. Daarom moet een vaccin dat effectief lijkt onder experimentele omstandigheden ook worden getest onder praktijkomstandigheden [22]. Daarnaast kan de immuniteit na vaccinatie in de loop van de tijd afnemen [41]. Deze afname in immuniteit kan er mogelijk toe leiden dat het gevaccineerde koppel niet meer voldoende beschermd is tegen virustransmissie.

2.6 Toepasbaarheid

Vaccineffectiviteit in verschillende pluimveesoorten

Niet alle vaccins kunnen bescherming bieden tegen ziekteverschijnselen en virusuitscheiding verminderen in alle pluimveesoorten. Een voorbeeld hiervan zijn de vector-vaccins waarbij de vector bestaat uit een *Meleagrid herpesvirus* dat afkomstig is van kalkoenen (Turkey herpesvirus (HVT)). HVT is het derde serotype binnen de Marek's disease virussen. Kalkoenen en kippen behoren tot de hoenderachtigen (*Galliformes)* en het HVT-vaccin is in beide pluimveesoorten werkzaam. Vleeseenden behoren tot de eendachtigen (*Anseriformes*) waarin HVT-vaccins niet effectief zijn. Dit wordt o.a. aangetoond in de studie van Pantin-Jackwood, *et al.* (2016), waar een HVT-vaccin (Vectormune, Ceva Sante Animale (Ceva)), alleen of in combinatie met een geïnactiveerd

H5N1 vaccin, is toegediend aan vleeseenden [43]. Vervolgens zijn de eenden gechallenged met 2 verschillende HPAI H5N1 virussen (clade 1.1.2 en 2.3.2.1c). Virustransmissie is niet onderzocht, maar slechts 30% van de gevaccineerde eenden overleefde de infectie en er was slechts een kleine vermindering van de virusuitscheiding. Dit HVT-vaccin was in vleeseenden dus onvoldoende effectief in het reduceren van ziekteverschijnselen en virusuitscheiding [43]. Voor andere vectoren zijn er ook beperkingen in het gebruik bij bepaalde diersoorten. De Fowlpox (*Poxviridae*) vector kan in principe alleen aan kippen worden toegediend, al zijn er aanwijzingen dat deze vector ook bescherming biedt aan ganzen [22]. Een Duck Enteritis Virus (DEV) vector is bestemd voor eenden, maar Liu, *et al.* (2013) toonden aan dat hun rDVE-H5 vaccin ook kippen beschermde tegen een HPAI H5N1 virus (GD/322) wanneer de dosis hoog genoeg was [44]. Kortom, niet alle vector-vaccins kunnen zonder onderzoek worden toegediend aan alle pluimveesoorten. Andere type vaccins, zoals geïnactiveerde vaccins en mRNA/DNA-vaccins zijn minder gastheerspecifiek. Bij de keuze van een vaccinprogramma moet rekening worden gehouden met welke vaccins voor welke diersoort worden gebruikt.

De aanwezigheid van maternale antilichamen

Maternale antilichamen (maternal derived antibody (MDA's)) zijn antilichamen die een kuiken via de eidooier meekrijgt van het moederdier en zijn 3 tot 4 weken in het lichaam aanwezig [45]. Deze antilichamen kunnen het gevolg zijn van een infectie met vogelgriep, maar ook antilichamen geproduceerd na vaccinatie worden doorgegeven van moederdier naar kuiken. Hoge MDA titers kunnen de nakomelingen beschermen tegen ziekteverschijnselen en virusuitscheiding. Echter, lage MDA titers tegen HPAI kunnen interfereren met geïnactiveerde vaccins [46]. Dit is bijvoorbeeld aangetoond bij geïnactiveerde vaccins, zoals in de studie van Maas, *et al*. (2011) en mogelijk is dit ook zo voor subunit-vaccins. In de dierstudie van Reemers, *et al.* (2021) is het effect van MDA's aangetoond in vleeskuikens na vaccinatie met een recombinant HVT (HVT) vector-vaccin (MSD). Op 2 en 3 weken werden de kuikens geïnfecteerd met een HPAI H5N1 virus uit clade 2.2.1 (dit virus lijkt op het virus dat is verwerkt in het vaccin). Bij infectie 2 weken na vaccinatie overleefden 20/20 SPF-kuikens zonder maternale antilichamen (MDA-) de challenge, terwijl er van de vleeskuikens met MDA (MDA+) slechts 2/20 overleefde. Bij infectie 3 weken na vaccinatie waren alle kuikens beschermd tegen sterfte en was de virusuitscheiding verminderd in zowel de MDA+ als MDA- dieren. De gemiddelde HAR-titers van de MDA+ vleeskuikens waren wel lager dan de titers van de MDA- vleeskuikens: 4,3 log2 versus 8,6 log2 [23]. In 2 andere dierstudies is het HVT-H5 (Vectormune AI, Ceva) vaccin getest in MDA+ vleeskuikens, maar dan op een leeftijd van 4 weken. In deze studies werd geïnfecteerd met HPAI H5N1 virussen van clade 2.1.3 en 2.2.1, die minder leken op het virus in het vaccin. Er bleek dat 70-100% van de vleeskuikens met maternale antilichamen overleefde en de virusuitscheiding was verminderd ten opzichte van de controlegroep [25, 47]. Kortom, uit bovenstaande studies met verschillende HVT-H5 vaccins blijkt dat het interfereren van de MDA's afneemt op week 3 en 4, waarschijnlijk door de afname van de concentratie MDA's. De MDA's zorgen dus voor een vertraging in de opbouw van de immuunrespons. Daarnaast tonen de studies aan dat het interfereren van de MDA's bij deze HVT-H5 vaccins geen effect had op de afweerreactie op latere leeftijd (>4 weken). Het interfereren van MDA's met vector-vaccins is wel afhankelijk van de vector. Dit wordt geïllustreerd in de studie van Bertran, *et al.* (2018). In deze studie was er geen effect van de MDA's aangetoond bij vaccinatie met een HVT-H5 vaccin (BIAH), maar de MDA's remden wel de ontwikkeling van een afweerreactie op de primaire of het booster vaccin van een NDV-H5 vaccin [48]. Mogelijk komt dit doordat de vector HVT, wat een herpesvirus is, levenslang aanwezig blijft in het dier en een NDV-vector niet. Daarnaast kan het toedienen van meerdere vector-vaccins van hetzelfde type in hetzelfde dier, maar mogelijk ook in de moederdieren, de werking van deze vaccins verminderen of vertragen, omdat al antilichamen tegen deze vector aanwezig zijn in het dier die het vaccin kunnen inactiveren [49]. Het is dus noodzakelijk om het effect van MDA's op het vaccin goed te onderzoeken, zodat duidelijk is of het vaccin aan zowel de ouderdieren als de nakomelingen kan worden toegediend.

Ontwikkelen van een vaccinatieprogramma

In Nederland is de vaccinatie tegen het Newcastle Disease Virus (NDV) verplicht. Daarnaast wordt pluimvee, afhankelijk van de pluimveesoort- en type, het type huisvesting en specifieke bedrijfsproblemen gevaccineerd tegen diverse virale ziektes: de ziekte van Marek (Marek's disease), Infectieuze Laryngotracheïtis (ILT), de ziekte van Gumboro (Infectious Bursal Disease, IBD), Infectieuze Bronchitis (IB), Chicken Anaemia ('blauwe vleugeltjes'-ziekte, CAV), Trilziekte (Avian Encephalomyelitis, AE) en Pokkendifterie (Fowlpox, FP). Daarnaast zijn er nog verschillende vaccins voor de bescherming van pluimvee tegen bacteriële agentia zoals *E. coli*, *Avibacterium paragallinarum* (Coryza), *Salmonella* Enterititis en Typhymurium en *Mycoplasma gallisepticum*

en synoviae, en de parasitaire ziekte Coccidiose [50]. Al deze vaccins moeten worden toegediend op de door de fabrikant vastgestelde leeftijden en sommige vaccinaties moeten herhaaldelijk worden toegediend, of worden gevolgd door een andere type vaccin, om de bescherming te verbeteren. Voor een effectieve immuunrespons is het belangrijk dat er niet teveel vaccins op hetzelfde moment, of kort na elkaar, worden toegediend aan een dier, want anders kunnen de verschillende vaccins met elkaar interfereren wat een negatieve invloed kan hebben op de immuunrespons [51]. Van diverse vaccins is bekend dat ze kunnen worden gecombineerd met andere vaccins, bijvoorbeeld de combinatie van het Vectormune AI vaccin en het Rispens vaccin [33]. Daarom is het zaak om te kijken of de vaccins die effectief zijn tegen de bescherming van HPAI H5 vogelgriepvirussen ook in de huidige vaccinatieschema's kunnen worden opgenomen. Sommige vaccins, zoals de HVT-vaccins, kunnen ook *in ovo* (in het ei) worden toegediend.

Naast de uitdaging dat er niet teveel vaccins mogen worden toegediend aan een dier in dezelfde periode en het interfereren van maternale antilichamen, bestaat er nog een andere uitdaging. Een vector-vaccin van hetzelfde type kan slechts eenmaal worden toegediend in hetzelfde dier, omdat er anders al antilichamen en cellulaire afweer aanwezig zijn in het dier die het vaccin kunnen neutraliseren [52]. Wanneer er eerder werd gevaccineerd met een H5 vaccin dan kunnen ook de antilichamen gericht tegen het H5 eiwit de effectiviteit van een vaccin verminderen. In Nederland zijn al diverse vector-vaccins voor andere ziekteverwekkers geregistreerd: INNOVAX HVT (ND-IBD, ILT, ND-ILT), VAXXITEK HVT (IBD), Vectormune ND, Vectormune FP (ILT-AE, ILT) en PREVEXXION RN HVT + IBD [50]. Een vector-vaccin tegen HPAI H5 virus kan dus niet in combinatie worden gegeven met dezelfde vector van bovenstaande HVT, NDV of FPV vector-vaccins. Echter, voor de vaccins Vectormune AI en Vectormune ND is literatuur aanwezig dat deze vaccins wel gelijktijdig kunnen worden toegediend [53, 54]. Het is dus belangrijk dat er een vaccinatieprogramma wordt ontwikkeld waarbij het vaccin voor vogelgriep past in het vaccinatieprogramma voor andere ziektes waarbij er eventueel voor andere agens ook kan worden uitgeweken naar andere type vaccins. Voor de verschillende pluimveesoorten en -typen kunnen verschillende vaccinatieprogramma's gekozen worden op basis van levensduur van het dier in verhouding tot het moment dat het vaccin beschermd en de duur van de bescherming, de rol van het dier binnen de sector, de gevoeligheid voor andere ziekteverwekkers en effectiviteit van het vaccin.

Bij langlevend pluimvee, dus fok-, vermeerderings- en leghennen, moet er ook een keuze worden gemaakt over het toedienen van een booster. Een booster kan de effectiviteit van vaccinatie aanzienlijk vergroten en verlengen. Kilany, *et al.* (2015) heeft het effect van een booster na vaccinatie met het HVT-H5 vaccin (Vectormune AI, Ceva) in ééndagskuikens met MDA onderzocht [55]. Het HVT-H5 vaccin werd toegediend op dag 1 en op dag 8 werd een geïnactiveerd vaccin (RE-5 H5N1, BIAH, Lyon, France) toegediend. Vervolgens zijn de kuikens op dag 28 of 35 geïnfecteerd met een HPAI H5N1 virus (A/Chicken/Egypt/ 128S/2012; clade 2.2.1). Bij infectie op dag 28 nam de overleving in de groep met booster met 10% toe (van 80% naar 90%) en het aantal dieren met ziekteverschijnselen nam af van 80% naar 20%. Bij infectie op dag 35 was de overleving in beide groepen, met en zonder booster, 90%, maar in de groep met booster waren er slechts 10% van de kippen ziek, terwijl dit 90% was in de groep zonder booster [55]. In de studie van Hussein, *et al.* (2016) gaf het experimentele DNA-vaccin na toediening in eendagskuikens geen bescherming tegen sterfte en konden er geen HAR-titers worden gemeten. Echter, wanneer op 10 dagen leeftijd het Volvac AI KV geïnactiveerd LPAI H5N2 vaccin (BIAH) werd toegediend aan de kippen overleefde 80% van de kippen en waren er beschermende HAR-titers te meten na vaccinatie [56]. Kortom, de effectiviteit van een vaccin kan na het toedienen van een booster worden verhoogd en kan dus, met name voor langlevend pluimvee, een extra bescherming bieden. Een vaccin dat al bij een eenmalig toediening volledig bescherming biedt heeft de voorkeur boven een vaccin waarbij later nog een booster nodig is voor een optimale levenslange bescherming.

Tot slot is de toedieningsroute van het vaccin nog bepalend voor het vaccinatieprogramma. Een efficiënte methode voor massavaccinatie in de pluimveesector heeft de voorkeur, zoals toediening via een spray of via drinkwater, indien hiermee voldoende dieren in het koppel een voldoende hoge dosis krijgen, of machinale toediening *in ovo* (in het ei). Echter, op dit moment moeten alle vaccins voor de bescherming tegen vogelgriep nog worden toegediend via een injectie. Veel vaccins kunnen al worden toegediend in de broederij en vector-vaccins kunnen eventueel al *in ovo* worden toegediend. Vaccineren op de broederij is efficiënter dan vaccineren op het pluimveebedrijf.

3 Literatuurstudie

3.1 Introductie literatuurstudie

Voor een overzicht van de typen vaccins die momenteel in ontwikkeling of commercieel beschikbaar zijn tegen de huidige HPAI H5 virussen is de literatuur bestudeerd. In de literatuur is veel data beschikbaar over de effectiviteit van experimentele en commerciële vaccins tegen verschillende typen HPAI H5 virussen. HPAI H5 virussen zijn op basis van genetische verwantschap van H5 ingedeeld in zogenaamde 'clades' [57]. Nieuwe clades ontstaan door evolutie van het virus. De HPAI H5 virussen die sinds 2016 in Nederland worden gedetecteerd behoren tot clade 2.3.4.4b [1-3]. Deze virussen zijn geëvolueerd uit het HPAI H5 virus dat in 2014 in Nederland circuleerde en behoorde tot clade 2.3.4.4A[1]. Een groot deel van de in de literatuur beschreven vaccins is niet getest tegen een HPAI H5 clade 2.3.4.4b virus, maar tegen H5 virussen van andere clades. In deze literatuurstudie is er hoofdzakelijk gezocht naar resultaten van studies die zijn uitgevoerd met HPAI H5 clade 2.3.4.4b virussen, omdat deze resultaten het meest informatief zijn bij het inschatten van de te verwachten effectiviteit voor de huidige circulerende HPAI H5 vogelgriepvirussen in Nederland. De literatuur bevat weinig transmissiestudies (studies waarin virustransmissie van infectiedieren naar contactdieren wordt bestudeerd). Er zijn voornamelijk resultaten van infectiestudies waarbij een kunstmatige infectie ('challenge') aan kippen is gegeven, waarbij vervolgens virusuitscheiding, ziekte en sterfte zijn bestudeerd. Wanneer er geen transmissiestudies beschikbaar waren zijn de uitkomsten van infectiestudies gebruikt ten aanzien van parameters die de mate van besmettelijkheid en ziekteverschijnselen beschrijven samengevat.

3.2 Typen vaccins

Er zijn verschillende typen vaccins ontwikkeld voor de bescherming van pluimvee tegen HPAI H5 virussen. Naast traditionele geïnactiveerde vaccins zijn er verschillende technologieën, waarbij een algemene backbone of vector wordt gebruikt om specifieke eiwitten van het HPAI H5 virus te maken [60, 61]. In onderstaande paragrafen wordt het principe van de verschillende typen vaccins die relevant zijn voor vogelgriep kort uitgelegd. Per type vaccin worden de resultaten van de studies die de vaccineffectiviteit na infectie met HPAI H5 virussen hebben onderzocht samengevat. Er is zoveel mogelijk gezocht naar studies met clade 2.3.4.4b en transmissiestudies, maar indien niet beschikbaar is informatie over andere clades en infectiestudies samengevat. Per vaccin zullen de voor- en nadelen per type vaccin worden belicht.

3.2.1 Geïnactiveerde vaccins

Voor geïnactiveerde vaccins wordt een oorspronkelijk vogelgriepvirus gebruikt dat onschadelijk is gemaakt. Dit onschadelijk gemaakte virus zorgt, samen met een adjuvans, voor een immuunreactie tegen genetisch verwante vogelgriepvirussen [52]. Adjuvantia zijn chemische, microbiële componenten of eiwitten die nodig zijn om het afweersysteem te activeren [52]. In dit type vaccins wordt het genoom van het vaccinvirus vaak aangepast om het HPAI virus te veranderen naar een laag pathogeen aviaire influenza (LPAI) virus. Dit wordt gedaan door de splitsingsplaats van het HA-eiwit aan te passen. Ook kunnen in deze recombinante virussen NA eiwitten worden vervangen om de antilichamen na vaccinatie te kunnen onderscheiden van de antilichamen die door infectie zijn gestimuleerd na een veldinfectie (DIVA) [22].

Van oudsher zijn de geïnactiveerde vaccins het type vaccins dat wereldwijd het meest wordt toegepast. Van 2002-2010 werd 25,2% van het pluimvee in de wereld gevaccineerd tegen HPAI vogelgriep en 95,5% van deze vaccins waren geïnactiveerde vaccins (4,5% waren vector-vaccins) [62]. Ondanks dat dit type vaccin veel wordt toegepast, zijn er in de literatuur geen transmissiestudies en slechts enkele infectiestudies beschreven die de effectiviteit van geïnactiveerde vaccins tegen HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4b, hebben getest. In de studie van Kandeil, *et al.* (2018) werden zeven commerciële geïnactiveerde vaccins, Nobilis Influenza H5N2

[1] Voor de HPAI H5 virussen van H5 clade 2.3.4.4A werd een nieuwe classificatie voorgesteld 58. WHO, *Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza A viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness*. March 2021., waarin deze werden hernoemd tot clade 2.3.4.4c. In dit rapport houden wij echter de oude naamgeving aan 59. Lee, E.-K., et al. *Characterization of a novel reassortant H5N6 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.4.4 in Korea, 2017.* Emerging microbes & infections, 2018. **7**, 103 DOI: 10.1038/s41426-018-0104-3., omdat deze nog met name wordt gebruikt in de (oudere) literatuur. De HPAI H5 clade 2.3.4.4B virussen blijven behoren tot clade 2.3.4.4b in de nieuwe classificatie.

(Intervet, The Netherlands), CEVac Flukem (Ceva, Mexico), Zoetis H5N3 (Zoetis, USA), EgyFlu (Harbin Veterinary Research Institute, China), Mefluvac (ME-VAC, Egypt), SERA-VAC (Veterinary Serum and Vaccine Institute, Egypt), Reassortant AIV Re-5 (Merial, China), en één experimenteel LPAI H5N8 vaccin, getest in commerciële Lohmann White opfokleghennen met maternale antilichamen (met maternally derived antibodies, MDA+) [63]. Op 6 weken leeftijd, 4 weken na intramusculaire vaccinatie, werden de kippen geïnfecteerd met HPAI H5N8 virus (A/duck/Egypt/F13666A/2017; clade 2.3.4.4b). Alle kippen gevaccineerd met Re-5 Merial, Zoetis H5N3 en het experimentele LPAI H5N8 vaccin overleefden de infectie zonder ziekteverschijnselen. In de groepen met de andere vaccins waren de sterftepercentages 60% (Nobilis, ME Flu VAC, SER-VAC) en 80% (CEVac Flukem, EgyFlu). Alleen het vaccin RE-5 Merial en het experimentele LPAI H5N8 vaccin waren in staat om de virusuitscheiding significant te verminderen [63].

Drie van deze commerciële vaccins, H5N1 (Re-5, Merial), H5N2 (CEVac Flukem, Ceva) en H5N3 (Zoetis H5N3, Zoetis), zijn ook getest in de dierstudie van El Moeid, *et al.* (2021). Eén van de challengevirussen was gelijk aan het HPAI H5N8 virus dat is gebruikt in de studie van Kandeil, *et al.* (2018), maar daarnaast zijn de vaccins ook getest tegen een andere HPAI H5N8 virus clade 2.3.4.4b (A/chicken/Egypt/18FL6/2018). In deze studie werden SPF-kippen (Specific Pathogen Free) op 10 dagen leeftijd subcutaan gevaccineerd en vervolgens 2 óf 3 weken na vaccinatie geïnfecteerd. Geen van de vaccins kon de kippen beschermen tegen het virus bij een infectie 2 weken na vaccinatie. Bij infectie 3 weken na vaccinatie beschermde het H5N1 en het H5N3 vaccin wel tegen sterfte veroorzaakt door de H5N8 virussen (in beide groepen stierf 1/13 kippen), maar in de H5N2 vaccin groep overleden bij één van de H5N8 virussen 9/13 (70%) van de kippen. Daarnaast was er in alle studiegroepen virusuitscheiding [64]. In de studie van Ali, *et al.* (2019) bleek een experimenteel geïnactiveerd vaccin wel succesvol [65]. Het experimentele vaccin bestond uit 3 H5N1 virussen, afkomstig van clade 2.2.1, 2.2.1.1 en 2.2.1.2, en Newcastle Disease virus (NDV). Op 2 weken leeftijd werden de SPF-kippen subcutaan gevaccineerd en 4 weken later werden ze geïnfecteerd. Het vaccin beschermde na infectie met een HPAI H5N8 virus (A/common-coot/EG/CA285/2016; clade 2.3.4.4b) 14/15 kippen tegen sterfte en de virusuitscheiding was significant verminderd ten opzichte van de ongevaccineerde controlegroep [65].

Voor- en nadelen geïnactiveerde vaccins

Uit de literatuur blijkt dus dat er diverse vaccins zijn getest tegen HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4b, maar dat er geen transmissiestudies zijn uitgevoerd. Van de meeste geteste vaccins was de bescherming tegen ziekteverschijnselen en de virusvermindering onvoldoende, waardoor de kans op virustransmissie aanwezig blijft. Waarschijnlijk is bij de meeste vaccins de antigene afstand tussen de geïnactiveerde vaccinstammen en de HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4b te groot. Wanneer de antigene afstand toeneemt tussen een geïnactiveerd vaccin en het circulerende virus neemt de bescherming snel af [19, 20]. Doordat volledige geïnactiveerde virussen worden gebruikt als vaccin, wordt niet voldaan aan het DIVA principe. Wanneer een veldstam een ander NA-type heeft, kan op basis hiervan serologisch onderscheid worden gemaakt. Echter, vogelgriepvirussen kunnen snel evolueren en genetische informatie uitwisselen, daarom is dit systeem niet robuust voor DIVA. Het voordeel van dit type vaccin is dat het aan meerdere pluimveesoorten toegediend kan worden wanneer de vaccins daarvoor geregistreerd zijn. Nadelen zijn dat het vaccin per injectie moet worden toegepast [22] aan oudere kuikens en dus minder geschikt is voor toepassing in de broederij. Hierdoor is het moeilijker om grote aantallen dieren (massa-applicatie) in korte tijd te kunnen vaccineren. Voor een optimale immuunrespons kunnen boostervaccinaties nodig zijn [66]. Tot slot is bij dit type vaccin een veelvoorkomend probleem dat maternale antilichamen (maternally derived antibodies, MDA's) kunnen interfereren met de immuniteitsopbouw na vaccinatie [46]. Momenteel is het enige in Nederland geregistreerde vaccin het geïnactiveerde Nobilis H5N2 vaccin van MSD. Het vaccin is gebaseerd op een LPAI H5N2 virus uit 1986, dus het vaccinvirus staat genetisch ver af van het huidige HPAI H5N1 virus. Hierdoor is de bescherming van dit vaccin tegen ziekte en virustransmissie na infectie met HPAI H5N1 virus naar verwachting niet voldoende.

3.2.2 Eiwit-vaccins (subunit-vaccins)

Een eiwit-vaccin bevat slechts één of enkele van de virale eiwitten, het HA-, NA- of matrix eiwit, dat de immuunrespons activeert [67, 68]. Het eiwit wordt tot expressie gebracht in cellen, bijvoorbeeld door middel van het Baculovirus-expressie systeem, en vervolgens opgezuiverd. Er zijn ook andere typen vaccins waarin de eiwitten worden verpakt in structuren die op virusdeeltjes lijken, de zogenaamde Virus-like-particles (VLP) vaccins [69].

Volvac® B.E.S.T. AI+ND (Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH)) is een commercieel verkrijgbaar subunit-vaccin tegen HPAI H5 virussen. Het H5 gen in het vaccin is afkomstig van een H5N1 virus uit clade 2.3.2 (A/DK/China/E319-2/03). Er zijn voor dit type vaccin geen transmissiestudies uitgevoerd met een infectie van het H5 clade 2.3.4.4b virus. Wel zijn er infectiestudies uitgevoerd, waarbij is gekeken naar de vaccineffectiviteit in het verminderen van virusuitscheiding, dus de besmettelijkheid, en de vaccineffectiviteit ten aanzien van het verminderen van ziekteverschijnselen. In de studie van Kandeil, *et al.* (2018) werd, naast de zeven commerciële geïnactiveerde vaccins (zie 3.2.1), ook het Volvac B.E.S.T. vaccin getest in commerciële Lohmann White opfokleghennen (MDA+) [63]. Op 6 weken leeftijd, 4 weken na vaccinatie, werden de kippen geïnfecteerd met HPAI H5N8 virus (A/duck/Egypt/F13666A/2017; clade 2.3.4.4b). Na infectie stierf 80% van de kippen en was er virusuitscheiding aanwezig [63]. Het vaccin bleek meer effectief in de studie van Sultan, *et al.* (2019). Zij onderzochten de effectiviteit van dit vaccin tegen een HPAI H5N8 virus van clade 2.3.4.4b (A/Common-coot/Egypt/CA285/2016) in Muscovy- en Pekingeenden [70]. De vleeseenden, MDA+, werden eenmalig (10 dagen leeftijd) of dubbel (10 en 28 dagen leeftijd) subcutaan gevaccineerd en werden respectievelijk geïnfecteerd op dag 31 of 49. De controle eenden, 10 per soort, werden niet gevaccineerd en 4/10 Muscovy-eenden en 6/10 Pekingeenden overleefde de infectie. Van de eenmalig gevaccineerde eenden overleefde 9/10 Muscovy-eenden en 10/10 Pekingeenden. De dubbel gevaccineerde vleeseenden overleefden de infectie allemaal. Zowel na eenmalige als dubbele vaccinatie werd er geen virus uitgescheiden door de Pekingeenden. De Muscovy-eenden scheidden na een eenmalige vaccinatie nog virus uit t/m 5 dagen na infectie, maar dit was een lagere concentratie virus dan de controlegroep (die nog t/m 7 dagen na infectie virus uitscheidden). Na een dubbele vaccinatie scheidden ook de Muscovy-eenden geen virus meer uit [70].

In de literatuur zijn verschillende dierstudies aanwezig waarin diverse experimentele VLP vaccins tegen HPAI H5 virussen uit clade 2.3.4.4(b) zijn getest. Tatár kis, *et al.* (2018) heeft een transmissiestudie in vleeseenden, zowel Pekingeenden als Muscovy-eenden, uitgevoerd met een experimenteel VLP vaccin, dat is gemaakt met het HA-gen dat afkomstig is van het HPAI H5N8 A/duck/France/161108h/2016 virus [71]. De vleeseenden (MDA-) werden op de dag van uitkomst en 3 weken later, of enkel op 3 weken leeftijd, subcutaan gevaccineerd. Op een leeftijd van 6 weken werden ze geïnfecteerd met een HPAI H5N8 virus (A/Mulard_duck/Hungary/59163/2016; clade 2.3.4.4b). In de controlegroep was er virustransmissie tussen de infectie- en contactdieren, maar er is geen reproductiegetal berekend voor de gevaccineerde groep. In de gevaccineerde vleeseenden werd na infectie echter geen virusuitscheiding gedetecteerd of ziekteverschijnselen geobserveerd (i.t.t. alle ongevaccineerde vleeseenden) [71]. Andere studies hebben de effectiviteit voor het verminderen van de virusuitscheiding en ziekteverschijnselen van experimentele VLP vaccins getest na infectie met HPAI H5 virussen uit andere 2.3.4.4 clades. Kang *et al.* (2021) testte een experimentele VLP vaccin in SPF-kippen met een infectie met HPAI H5N8 (clade 2.3.4.4A) en H5N6 (clade 2.3.4.4c) [68]. Het vaccin, dat op 5 weken leeftijd intramusculair werd toegediend, beschermde bij infectie 3 weken na vaccinatie 100% van de kippen tegen sterfte en virusuitscheiding leek te verminderen (controledieren waren al overleden, dus dit kon niet goed vergeleken worden) [68]. Pushko, *et al.* (2018) testte een experimenteel VLP met H5, H7, H9 en N1 eiwitten [72]. SPF-kippen werden gevaccineerd op de dag van uitkomst en 21 dagen oud. De kippen werden geïnfecteerd met H5N2 (A/turkey/Minnesota/7172-1/2015; clade 2.3.4.4), of een HPAI H7N3 of LPAI H9N2. Alle kippen overleefden infectie met HPAI H5N2 en H7N3 virus. Echter, met name in de groep die was geïnfecteerd met HPAI H5N2 virus was wel virusuitscheiding waarneembaar [72]. Kapczynski, *et al*. (2016) ontwikkelde een experimenteel VLP met HA-eiwitten van 3 verschillende HPAI H5N1 virussen (waaronder een clade 2.3.4.4 virus) [73]. SPF-kippen werden op 1 dag en 21 dagen leeftijd subcutaan gevaccineerd en vervolgens op 5 weken leeftijd geïnfecteerd met o.a. het HPAI H5N8 virus (A/Gryfalcon/Washington/2014; clade 2.3.4.4A). Alle kippen overleefden de infectie en de virusuitscheiding was significant verminderd t.o.v. de controlegroep [73].

Voor- en nadelen subunit-vaccins

Eiwit-vaccins stimuleren met name de humorale immuunrespons [52], maar er zijn ook aanwijzingen dat de cellulaire immuunrespons wordt gestimuleerd [26]. Eiwit-vaccins bieden de mogelijkheid om meerdere virale eiwitten te combineren in een vaccin waardoor een brede immuunrespons geactiveerd kan worden [69, 74]. De uitgevoerde dierstudies laten zien dat eiwit-vaccins bescherming tegen ziekteverschijnselen kunnen bieden en virusuitscheiding kan worden verminderd. In de transmissiestudie van Tatár kis, *et al.* (2018) is aangetoond dat virustransmissie naar de contactdieren in vleeseenden voorkomen kan worden met dit type vaccins. Doordat er slechts een deel van het virus aanwezig is kunnen antilichamen gestimuleerd door het vaccin

serologisch worden onderscheiden van de antilichamen van een veldinfectie (DIVA). De vaccins die nu voor pluimvee zijn ontworpen worden per injectie toegediend. Daardoor is massa-applicatie praktisch alleen mogelijk wanneer de vaccins op de dag van uitkomst op de broederij of aan het einde van de opfok kunnen worden toegediend per injectie. In bovenstaande dierstudies zijn de kippen of vleeseenden niet alleen op de dag van uitkomst gevaccineerd, maar ook op een latere leeftijd (geboosterd). Mogelijk kunnen dit type vaccins in de toekomst worden toegediend als spray of via het drinkwater. Orale toediening van een influenza vaccin (recombinant baculovirus) is in een studie bij muizen mogelijk gebleken in een studie van Basak, *et al.,* (2020) [75]. Eiwit-vaccins kunnen aan meerdere pluimveesoorten worden toegediend. Het eiwit-vaccin kan relatief eenvoudig worden aangepast door het HA-gen te veranderen dat in het laboratorium wordt gebruikt om de eiwitten te produceren [52]. In de studie van Kandeil, *et al.* (2018) en Sultan, *et al.* (2019) waren de vaccins werkzaam in kippen en eenden met maternale antilichamen. Dit geeft aanwijzingen dat de maternale antilichamen mogelijk niet sterk interfereren met dit type vaccin.

3.2.3 Recombinante vector-vaccins

Een vector-vaccin bestaat uit een vector, een niet ziekmakend virus of bacterie anders dan het vogelgriepvirus. In deze vector wordt met recombinante DNA technologie een 'insert' geplaatst. In geval van een vaccin tegen vogelgriep wordt het HA-gen gebruikt, waarbij voor de veiligheid van het vaccin de splitsingsplaats van het HPAI HA-gen is gemodificeerd tot een LPAI splitsingsplaats. Na inspuiten van het vector-vaccin kan het lichaam antilichamen tegen het HA-gen maken [22]. Er kunnen verschillende virussen worden gebruikt als vector, bijvoorbeeld HVT, NDV, FPV en het herpesvirus van eenden 'Duck Enteritis Virus (DEV) [22]. In een vector kunnen meerdere inserts worden geplaatst. Dit is bijvoorbeeld gedaan bij het INNOVAX HVT ND-IBD vaccin van MSD Animal Health (MSD). Dit vaccin beschermt tegen de ziekte van Marek door de HVT-vector en tegen NDV en IBD door de twee inserts [50]. Er zijn nog geen commerciële vector-vaccins met hierin het vogelgriepvirus beschikbaar met meer dan twee inserts. Wel zijn zowel bivalente (tegen twee typen ziekteverwekkers) als trivalente (tegen 3 typen) vaccins op de markt voor combinaties van andere virussen, zoals Marek, NDV, ILT en IBD [61, 76].

In de literatuur worden diverse vectoren beschreven die zijn gebruikt voor een vaccin tegen HPAI H5 virussen. De meest beschreven vectoren zijn recombinante HVT-vaccins, NDV-vaccins en FPV-vaccins. Hieronder worden de studies per type vector-vaccin beschreven.

HVT-vaccins

HVT is een niet-ziekmakend herpesvirus in kalkoenen, dat is geclassificeerd als het derde serotype binnen het virus die de ziekte van Marek kan veroorzaken. HVT veroorzaakt in kippen ook geen ziekte, maar zorgt wel voor een activatie van het immuunsysteem tegen de ziekte van Marek. Herpesvirussen blijven levenslang in een lichaam aanwezig. Dit betekent dat vaccins met een HVT of DEV vector en een AIV insert levenslang aanwezig blijven en daardoor langdurig bescherming kunnen bieden tegen het vogelgriepvirus [77, 78].

Er zijn meerdere farmaceuten met een HVT vector-vaccin met een HP H5 insert. Ten eerste, produceert en verkoopt Ceva het HVT-vaccin 'Vectormune AI' al diverse jaren in diverse landen. Het insert bestaat uit het HP H5N1 virus A/mute swan/Hungary/4999/2006 (clade 2.2) waarbij de splitsingsplaats is aangepast naar LPAI [79, 80]. Het vaccin is o.a. geregistreerd in de USA, Egypte, Mexico en Bangladesh. De review van Gardin, *et al.* (2016) toont aan dat de effectiviteit van dit vaccin al veelvuldig is onderzocht met verschillende HP H5 virussen in zowel SPF als commerciële leghennen en vleeskuikens [32]. Echter, de studies die zijn opgenomen in deze review hebben niet de effectiviteit van het 'Vectormune AI' vaccin tegen clade 2.3.4.4b onderzocht, want deze review is gepubliceerd voordat de clade 2.3.4.4b virussen waren ontstaan. Er zijn meer recente studies die wel onderzoek hebben gedaan naar de vaccineffectiviteit tegen clade 2.3.4.4b virussen. Zo bestudeerde Palya, *et al.* (2018) de effectiviteit van het 'Vectormune AI' vaccin op het reduceren van virustransmissie in zowel commerciële opfokleghennen als vleeskuikens (MDA-) na infectie met het HPAI H5N8 virus (A/goose/Hungary/1030/2017; clade 2.3.4.4b) [80]. In deze transmissiestudie werden per groep 20 dieren geïnfecteerd en 20 contactdieren bijgeplaatst (8 uur na infectie). Infectie vond plaats op 5 weken (vleeskuikens) en 7 weken (commerciële opfokleghennen). Het vaccin, dat subcutaan was toegediend op de dag van uitkomst, gaf een goede bescherming tegen ziekteverschijnselen, want 100% van de opfokleghennen en 90% van de vleeskuikens overleefde de infectie (eigenlijk 100%, want de 2 overleden kippen bleken door trauma te zijn gestorven en waren niet AI-positief). Daarnaast was er, i.t.t. de controlegroepen, bij de

gevaccineerde opfokleghennen en vleeskuikens nauwelijks tot geen cloacale virusuitscheiding en was er geen virustransmissie van de infectiedieren naar de contactdieren. Doordat er in de contactdieren geen besmetting kon worden vastgesteld werd het reproductiegetal (R) ingeschat als 0. Echter, de R van de ongevaccineerde opfokleghennen was 0,69 met een betrouwbaarheidsinterval van 0,33-1,44. Doordat het betrouwbaarheidsinterval 1 bevat kan niet worden bepaald of de R in werkelijk <1 of >1 was in de controlegroep, en daardoor was ook niet vast te stellen of er een significant verschil was in het reproductiegetal tussen de controlegroep en de vaccingroep [80]. In een andere studie testte El-Shall, *et al.* (2021) de vaccineffectiviteit bij een infectie met HPAI H5N8 virus (A/chicken/Egypt/Alex-2/2017; clade 2.3.4.4b) in commerciële vleeskuikens (MDA+) van 28 of 35 dagen oud ten tijde van infectie [79]. Zowel het HVT-vaccin alleen, als i.c.m. het geïnactiveerde vaccin Mefluvac (ME-VAC, Egypt), werd onderzocht. Het HVT-vaccin werd op 1 dag leeftijd subcutaan toegediend en het vaccin Mefluvac intramusculair op dag 8. Bij infectie op 28 dagen beschermde het HVT-vaccin 50% van de commerciële vleeskuikens tegen sterfte en de kuikens gevaccineerd met HVT+Mefluvac werden voor 40% beschermd tegens sterfte. Op 35 dagen leeftijd was dit respectievelijk 80% en 100% en was de virusuitscheiding significant verminderd t.o.v. de controlegroep [79]. Hoewel de studie van Kandeil, *et al.* (2018) geen goede bescherming tegen de huidige HPAI H5 virussen met Mefluvac aantoonde (zie 3.2.1), versterkte het vaccin de bescherming van het HVT 'Vectormune AI'. In een andere studie, de studie van Kapczynski, *et al.* (2017), is het Vectormune vaccin getest tegen 2 HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4A: A/gyrfalcon/Washington/40188-6/2014 (H5N8) en A/northern pintail/Washington/40964/2014 (H5N2) [81]. Op 1 dag leeftijd werden de SPF-opfokleghennen subcutaan gevaccineerd en vervolgens werden de kippen 4 weken na vaccinatie geïnfecteerd. Slechts 60% van de kippen overleefde de infectie met het H5N8 en het H5N2 virus. Daarnaast was de virusuitscheiding niet significant verminderd ten opzichte van de controlegroepen [81].

Ten tweede, zijn in de literatuur resultaten te vinden van infectiestudies met verschillende experimentele HVT-vaccins ontwikkeld door Boehringer Ingelheim Animal Health (BIAH) [82-84]. In de studie van Balzli, *et al.* (2018) zijn 3 experimentele vaccins met verschillende inserts die allen zijn gebaseerd op H5N2 (A/chicken/Washington/61-9/2014; clade 2.3.4.4A) getest voor de effectiviteit in het verminderen van virusuitscheiding en ziekte tegen een HPAI H5N2 virus (A/turkey/Minnesota/12582/2015 clade 2.3.4.4A). Deze 3 vaccins, allen subcutaan toegediend op de dag van uitkomst, hadden een wisselend succes, want de bescherming tegen sterfte bij de SPF-opfokleghennen varieerde van 15% tot 100% [82]. Eén van de 3 bovenstaande experimentele HVT-vaccins, het vaccin dat 100% beschermde, werd opnieuw getest in de studie van Bertran, *et al.* (2018) in commerciële vleeskuikens. Het HVT-vaccin, wederom subcutaan toegediend op de dag van uitkomst, beschermde wederom 100% tegen sterfte bij een homologe HPAI virusinfectie 5 weken na vaccinatie, ongeacht de aan/afwezigheid van maternale antilichamen tegen NDV en/of AIV [48]. In de studie van Bertran, *et al.* (2021) is de effectiviteit in het verminderen van virusuitscheiding en ziekte van hetzelfde HVT-vaccin vergeleken met de effectiviteit van 3 verschillende HVT-H5 vaccins met H5 inserts die met computermodellen (COBRA genaamd) werden geoptimaliseerd voor een brede werking tegen verschillende HPAI H5N1 virussen. In deze dierstudie zijn SPF-opfokleghennen wederom geïnfecteerd met het HPAI H5N2 virus uit Minnesota en een HPAI H5N1 virus A/Egypt/N04915/2014 (clade 2.2.1). Alle vaccins, die op de dag van uitkomst subcutaan waren toegediend, beschermden bij de infectie, 4 weken na vaccinatie, 100% van de opfokleghennen tegen ziekteverschijnselen en gaven een significante vermindering van de virusuitscheiding. De 3 COBRA vaccins gaven een hogere antilichaamtiter na vaccinatie en de opfokleghennen scheidden minder virus uit na infectie met het HPAI H5N1 virus dan wanneer het HVT-vaccin was toegepast [83]. Er zijn tot op heden geen studies gepubliceerd waarin COBRA vaccins werden getest op bescherming tegen HPAI H5 clade 2.3.4.4b virussen.

Tot slot, heeft MSD een HVT-vaccin met een insert dat 99% homoloog is aan het HPAI H5N1 virus A/turkey/Turkey/01/05 (clade 2.2). Het vaccin is geregistreerd in o.a. de USA. Tot op heden, zijn er nog geen resultaten gepubliceerd van de effectiviteit van het vaccin tegen een clade 2.3.4.4b virus. Reemers, *et al.* (2021) heeft wel de vaccineffectiviteit in het reduceren van virusuitscheiding en ziekteverschijnselen getest tegen 4 HPAI H5N1 virussen afkomstig uit een andere clade, namelijk 2.2.1, en 2.2.1.1. Het vaccin is per injectie toegediend aan SPF-kippen of kippen met maternale antilichamen. Het vaccin beschermde 3 weken na vaccinatie 100% tegen sterfte en de virusuitscheiding werd verminderd [23].

NDV vaccins

NDV behoort tot de *Paramyxoviridae* virussen. NDV kunnen verschillen in pathogeniciteit. Lentogene stammen veroorzaken milde tot asymptomatische luchtweginfecties in pluimvee, terwijl velogene stammen systemische infecties met veel sterfte veroorzaken. De lentogene stammen, zoals LaSota, worden veel gebruikt als levende verzwakte vaccines in de bestrijding van NDV in pluimvee. Deze lentogene stammen kunnen ook als vector worden gebruikt [24]. Het voordeel van het gebruik van een NDV-vector is dat NDV, net zoals AIV, via de respiratoire route het dier infecteert. Een NDV-vector-vaccin stimuleert dus zowel lokaal in de luchtwegen als systemisch de immuunrespons. Daarnaast kan het vaccin mogelijk worden toegediend als spray of in drinkwater, omdat NDV zich vermeerdert in de slijmvliezen [24].

Er zijn diverse (experimentele) NDV vaccins met een HPAI H5 virus insert [24, 85], maar er is geen literatuur beschikbaar waar een NDV vaccin is getest voor de bescherming van een HPAI H5 virus die hoort tot clade 2.3.4.4b. Echter, de effectiviteit in het verminderen van besmettelijkheid en ziekte van experimentele NDV-H5 vaccins tegen HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4 zijn wel beschreven. In de studie van Cho*, et al.* (2018) is een experimenteel NDV-H5 vaccin (met en zonder booster) intranasaal toegediend op de dag van uitkomst aan SPF-kippen en commerciële vleeskuikens (MDA-). Twee weken na vaccinatie werden de kippen geïnfecteerd met een HPAI virus van clade 2.3.4.4A. Het vaccin beschermde tegen sterfte en de virusuitscheiding werd verminderd t.o.v. de ongevaccineerde controledieren [86, 87]. In de studie van Ma, *et al.* (2017) werden een levend en geïnactiveerd experimenteel NDV-H5 vaccin intramusculair, met 2 weken tussentijd, toegediend aan 2 weken oude SPF-opfokleghennen. Twee weken na vaccinatie werden de kippen geïnfecteerd met een HPAI H5 virus van clade 2.3.4.4. In beide vaccingroepen was de hoeveelheid en duur van de virusuitscheiding verminderd t.o.v. de controlegroep. In deze studie is het NDV-H5 vaccin ook eenmalig toegediend als spray. De infectie met het HPAI H5N2 virus werd door 18/20 kippen overleefd en virusuitscheiding werd verminderd. Dit geeft aan dat een NDV-H5 vector-vaccin ook potentieel geschikt is om toe te dienen via massa-applicatie door middel van spray [87].

FPV-vaccins

Het FPV-vaccin TROVAC AI H5™ (BIAH) is ingezet bij de HPAI en LPAI H5N2 infecties in Mexico [22, 88]. Het insert van dit vaccin is het HA van A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8) [61]. De effectiviteit van dit vaccin tegen andere HPAI H5 virussen is bestudeerd [89], wat aangeeft dat dit type vector-vaccin mogelijk een brede werking heeft. Er zijn geen studies gevonden waarbij de effectiviteit van het vaccin tegen H5 virussen van clade 2.3.4.4b is onderzocht. In de studie van Kapczynski, *et al.* (2017), waar ook het Vectormune vaccin is getest, is het TROVAC vaccin getest tegen 2 HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4A. Het vaccin werd subcutaan toegediend aan SPF-kippen op de dag van uitkomst en vervolgens werden de kippen 4 weken na vaccinatie geïnfecteerd met een HPAI H5N8 virus of H5N2 virus van clade 2.3.4.4. Na infectie met het HPAI H5N8 virus overleefde 40% van de kippen en 70% van de kippen overleefde na infectie met HPAI H5N2 virus. De virusuitscheiding was alleen op 2 dagen na infectie significant verminderd ten opzichte van de controlegroep [81].

Voor- en nadelen vector-vaccins

Vector-vaccins hebben een bredere werking dan traditionele geïnactiveerde vaccins. Dit komt doordat vector-vaccins zowel de humorale als cellulaire immuunrespons stimuleren. De cellulaire immuunrespons is de immuunrespons door o.a. cytotoxische T-cellen die ook een grote rol spelen in de immuniteit. Door de brede werking zal de HA-insert in de vector minder vaak aangepast hoeven te worden aan de veldstam dan het geval is bij geïnactiveerde vaccins. Mocht aanpassing nodig zijn, dan gaat het aanpassen van de insert relatief gemakkelijk [24, 85]. In de studie van Palya, *et al.* (2018) wordt aangetoond dat er geen virustransmissie naar contactdieren is na toediening van het HVT-vaccin Vectormune [80]. Daarnaast is er in diverse studies aangetoond dat diverse vector-vaccins ziekteverschijnselen en virusuitscheiding kunnen verminderen bij een infectie van HPAI H5 virussen van clade 2.3.4.4b. Doordat de vaccins alleen het HA-gen bevatten zijn de antilichamen na vaccinatie te onderscheiden van de antilichamen ontstaan door een veldinfectie. NDV kan worden toegediend via sprays, omdat ze kunnen repliceren in de slijmvliezen. Vaccins die bestaan uit een HVT, DVE en FPV vector moeten op de broederij per injectie subcutaan of *in ovo* (in het ei) worden toegediend [22, 61]. Massa-applicatie is dus mogelijk met vector-vaccins, maar het vaccin moet individueel worden toegediend. Echter, dit type vaccins heeft ook nadelen. In de literatuur wordt beschreven dat maternale antilichamen kunnen interfereren met vector-vaccins [61]. Het interfereren in jonge dieren wordt bevestigd in de studie van

El-Shall, *et al.* (2021) in vleeskuikens. Echter, deze studie laat ook zien dat op een latere leeftijd, 35 dagen, de immuunrespons wel voldoende is om te beschermen tegen infectie. Daarnaast kunnen HVT- en FPV-vector-vaccins niet aan alle pluimveesoorten worden toegediend. Daarnaast kan het toedienen van meerdere vector-vaccins van hetzelfde type in hetzelfde dier, maar mogelijk ook in de moederdieren door de aanwezigheid van maternale antilichamen, de werking van deze vaccins verminderen of vertragen, omdat al antilichamen tegen deze vector aanwezig zijn in het dier [52]. Tegen andere pluimvee ziektes, zoals de ziekte van Marek, IBD, ILT en ND worden al HVT vector-vaccins gebruikt in Nederland. Sinds 2020 is er ook een FP-vector-vaccin met een ILT insert (Vectormune FP ILT, Ceva) op de Nederlandse markt [90]. Er zijn ook andere typen vaccins beschikbaar voor deze ziekten, maar dat betekent wel dat bestaande vaccinatieprogramma's moeten worden aangepast om een HVT-H5 vaccin te kunnen toepassen in de praktijk. Door de voorgeschreven toediening *in ovo* of op de dag van uitkomst kan het HVT-vaccin niet gebruikt worden om al het bestaande pluimvee in Nederland te vaccineren. Ook is te verwachten dat bij het starten van het vaccineren met een vector-vaccin een deel van de ouderdieren al gevaccineerd is met een vaccin met hetzelfde type vector, wat de effectiviteit van het vaccin in de nakomelingen mogelijk nadelig kan beïnvloeden [49].

3.2.4 mRNA- en DNA-vaccins

mRNA- en DNA- vaccins behoren tot de groep van 'op nucleïnezuur gebaseerde vaccins'. mRNA-vaccins kunnen bijvoorbeeld het HA-eiwit direct tot expressie brengen wanneer deze de cel wordt binnengebracht. Er zijn op dit moment nog geen studies gepubliceerd waarin mRNA-vaccins tegen infecties met HPAI H5 virussen werden getest in pluimvee. Recentelijk werd wel de effectiviteit van mRNA-vaccins tegen zoönotische influenza virussen in fretten (humaan diermodel) en de immuunrespons in mensen getest [91, 92]. Beide mRNA-vaccins wekten een goede immunologische respons op. Een nieuwe ontwikkeling in het vaccinveld zijn de self-amplifying mRNA vaccins. Deze maken gebruik van een replicon-systeem op basis van een ander virus [93]. Dit virus is niet meer in staat om infectieuze virusdeeltjes te vormen doordat een deel van het genoom is verwijderd. Dit is vervangen door het mRNA van interesse, dus bijvoorbeeld het HA-gen van het vogelgriepvirus. Een recente studie met een self-amplifying mRNA-vaccin op basis van het NP-eiwit laat zien dat een cellulaire respons wordt opgewekt in muizen en dat deze specifieke respons ook afhankelijk is van de route van toediening [94]. Er zijn in de literatuur nog geen studies beschreven waarin een self-amplifying mRNA-vaccin is getest in pluimvee tegen recente HPAI H5 virussen. Echter, er wordt op dit moment in Frankrijk een studie uitgevoerd met een self-amplifying vaccin (Ceva) in eenden [95]. De resultaten zullen op korte termijn beschikbaar komen.

DNA-vaccins maken gebruik van DNA expressie plasmiden om mRNA te produceren in de cellen van het dier, waardoor uiteindelijk het HA-eiwit geproduceerd wordt. Het HA-gen kan origineel of gemodificeerd zijn [52]. Vanuit de literatuur is er geen data beschikbaar waarbij de effectiviteit van een DNA-vaccin wordt getest tegen een HPAI H5 virus van clade 2.3.4.4b of een ander clade 2.3.4.4 virus. De potentie van dit type vaccin werd al in 2007 aangetoond door Jiang, *et al.* (2007). SPF-kippen werden intramusculair gevaccineerd met verschillende plasmiden met het H5 HA-gen op 3 weken leeftijd. Vier weken na vaccinatie werden de kippen geïnfecteerd met HPAI H5N1 virus (A/goose/Guangdong/1/96). Twee van de plasmiden beschermden 100% van de kippen tegen ziekteverschijnselen en virusuitscheiding. In deze studie werd ook een langdurige bescherming door het DNA-vaccin aangetoond. Wanneer kippen werden geïnfecteerd met het HPAI H5N1 virus (A/goose/Guangdong/1/96) op 50 weken na de vaccinatie overleefde 8/8 kippen de infectie en werd er geen virusuitscheiding gedetecteerd. Bij infectie met een ander HPAI H5N1 virus (A/duck/Shanghai/16/04) heeft 1/8 kippen virus uitgescheiden en is gestorven. De andere 7 kippen hebben geen virus uitgescheiden en overleefden de infectie [96]. In 2008 hebben Rao, *et al.* de effectiviteit van monovalente en trivalente experimentele H5 DNA-vaccins getest in SPF-opfokleghennen [97]. De kippen werden op de dag van uitkomst, 3 en/of 6 weken gevaccineerd via intramusculaire toediening, subcutane toediening of intradermale toediening (met een druk injectie systeem). Vervolgens werden de kippen één week na de laatste vaccinatie geïnfecteerd met H5N1 virus (A/Vietnam/1203/04). Alle kippen, onafhankelijk van de toedieningsroute of frequentie overleefden na toediening van het trivalente vaccin de infectie en er werd geen virale uitscheiding aangetoond. Wanneer het vaccin een lagere dosering plasmiden bevatte werd er tot een concentratie van 5 µg geen virus uitgescheiden. Bij de dosis van 5 µg bleek intradermale toediening wel effectiever dan intramusculaire toediening, want bij 5 µg overleefde 8/8 kippen bij intradermale toediening, terwijl na intramusculaire toediening 6/8 kippen overleefde. In hogere doseringen van de plasmiden was er geen verschil in overleving tussen de verschillende toedieningsroutes [97].

Voor- en nadelen mRNA- en DNA-vaccins

mRNA- en DNA-vaccins stimuleren zowel de humorale als de cellulaire immuunrespons [22, 98] en kunnen als multivalent ontworpen worden, zodat er naast een immuunrespons tegen HA ook een immuunrespons tegen andere virale eiwitten kan worden opgewekt [97]. Daardoor kunnen ze een brede werking hebben. De bescherming tegen ziekteverschijnselen, de vermindering van virusuitscheiding, het voorkomen van virustransmissie naar contactdieren en het effect in de aanwezigheid van maternale antilichamen van deze typen vaccins is in de literatuur nog niet in pluimvee aangetoond tegen een HPAI H5 virus van clade 2.3.4.4, maar de vaccins hebben potentie. De vaccins bestaan niet uit een volledig virus, dus DIVA is mogelijk. Daarnaast kunnen mRNA- en DNA-vaccins relatief eenvoudig worden aangepast aan een nieuw virus [99] en kan het vaccin worden toegepast in alle pluimveesoorten. In diverse dierstudies wordt aangetoond dat een booster na het toedienen van een DNA-vaccin een betere immuunrespons activeert [56, 100, 101]. Echter, dat een booster na een DNA-vaccin niet altijd nodig is om relatief jonge dieren te beschermen wordt geïllustreerd door de studie van Jiang, *et al.* (2007), want ziekteverschijnselen en virusuitscheiding werden voorkomen in 100% van de geïnfecteerde SPF-kippen van 6 weken oud. Bij lagere doseringen van het vaccin is een booster wel essentieel om de benodigde bescherming te geven [96]. mRNA- en DNA-vaccins zijn relatief duur en een booster maakt dit type vaccin relatief nog duurder [22], dus wanneer een booster nodig zou zijn is dat nadelig. mRNA-vaccins, self-amplyfing mRNA-vaccins en DNA-vaccins worden hoofdzakelijk per injectie toegediend. Echter, intradermale toediening (zoals in Roa, *et al.* (2008)[97]) en orale toediening [102] van DNA-vaccins zijn ook beschreven. Er is wel aanvullend onderzoek nodig of deze toedieningsroutes even effectief zijn als toediening via injectie. Wanneer het vaccin eenmalig op de dag van uitkomst of aan het einde van de opfok kan worden toegediend per injectie of via bijvoorbeeld orale toediening is massa-applicatie mogelijk.

3.2.5 Levend verzwakte vaccins

Deze vaccins bevatten, zoals de naam al zegt, levende afgezwakte LPAI virussen. De virusstammen kunnen mogelijk muteren, waardoor er hoogpathogene vogelgriepvirussen ontstaan [22]. Levende verzwakte vaccins worden in pluimvee voor andere ziektes gebruikt, maar worden door de World Organisation for Animal Health (WOAH) afgeraden voor de bestrijding van hoogpathogene vogelgriep [10]. Op dit moment is de Europese Commissie bezig met een wetwijziging om het mogelijk te maken om te vaccineren tegen onder andere hoogpathogene vogelgriep. In annex XIII staat dat het gebruik van levend verzwakte vaccins niet is toegestaan [12].

3.3 Conclusie literatuurstudie

De literatuur bevat meerdere dierstudies die de vaccineffectiviteit van diverse vaccins heeft getest tegen HPAI H5 clade 2.3.4.4b virussen. Er zijn slechts enkele transmissiestudies waarin de vaccineffectiviteit op het verminderen van virustransmissie is bestudeerd. De meeste dierstudies die zijn uitgevoerd zijn infectiestudies waar de vaccineffectiviteit in het verminderen van virusuitscheiding, dus de besmettelijkheid, en de vermindering in ziekteverschijnselen is getoetst. Om de vaccineffectiviteit in het reduceren van virustransmissie te onderzoeken na een infectie met HPAI H5 clade 2.3.4.4b virus is het uitvoeren van een transmissiestudie essentieel. Daarnaast is het van belang om nader onderzoek te doen in hoeverre (de hoogte en verdeling van HAR-titers of andere immuunparameters in een groep dieren) goede maten voor bescherming zijn, niet alleen voor individuele dieren, maar vooral voor de bescherming van een gevaccineerd koppel tegen virustransmissie. Dit was de basis voor het ontwerp van de dierstudie die in het volgende hoofdstuk wordt beschreven.

4 Dierstudie

4.1 Inleiding

Op basis van de voorwaarden gesteld in hoofdstuk 2 en de literatuurstudie in hoofdstuk 3 zijn de meest geschikte typen vaccins geïdentificeerd. Vervolgens is contact opgenomen met farmaceuten van diergeneesmiddelen in Europa en Noord-Amerika, die mogelijk geschikte vaccins met een betrouwbare kwaliteit ontwikkeld hebben. Tijdens de gesprekken is er gevraagd of er additionele (transmissie)studies zijn uitgevoerd die nog niet zijn beschreven in de literatuur. Daarnaast is verkend of er nieuwe vaccinkandidaten in een ver stadium van ontwikkeling zijn, maar nog niet zijn gepubliceerd in de literatuur. De farmaceuten is gevraagd om ongepubliceerde testresultaten van de kandidaatvaccins te tonen in videobelgesprekken, waarbij meerdere onderzoekers aanwezig waren. Tot slot is er geïnformeerd naar de bereidheid van de farmaceuten tot deelname aan deze vaccinstudie en of het vaccin op tijd kon worden geleverd voor de studie.

Op basis van de literatuur en de gesprekken met farmaceuten zijn drie vaccins gekozen die mogelijk werkzaam zijn tegen het huidige HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus en die geschikt zouden kunnen zijn om pluimvee in Nederland te beschermen. Bij het maken van deze keuze is een afweging gemaakt op basis van onderstaande punten:

- Er zijn aanwijzingen voor vermindering van virusuitscheiding en transmissie tegen de huidige HPAI H5 virussen (clade 2.3.4.4b), op basis van de literatuur of de gesprekken (en getoonde testresultaten) met de farmaceut.
- Het vaccin is elders op de wereld al op de markt, of in een ver stadium van ontwikkeling, zodat een geschikt vaccin snel ingezet kan worden in de Nederlandse pluimveesector.
- Er moet tenminste een veiligheidsstudie voor het vaccin zijn uitgevoerd.
- Het vaccin voldoet aan het DIVA-principe.
- Het is een pré als naast kippen ook ander pluimvee beschermd kan worden met het vaccin en als de werkzaamheid in aanwezigheid van maternale antilichamen al is getest.
- Bij voorkeur wilden we verschillende typen vaccins onderzoeken

Onderstaande tabel, Tabel 1, geeft een overzicht van de drie geselecteerde vaccins en hun kenmerken. Het betreft twee vector-vaccins, de HVT-H5 vaccins van Ceva Sante Animale (Ceva) en Boehringer Ingelheim (BIAH), en een DNA H5 vaccin van Huvepharma (HP). Over het DNA H5 vaccin is nog geen literatuur gepubliceerd, maar de studies die zijn uitgevoerd door de fabrikant zijn veelbelovend. Daarnaast kan dit vaccin ook aan eenden worden toegediend. Als vierde werd het Nobilis H5N2 vaccin van MSD Animal Health (MSD) getest, omdat dit op het moment het enige in Nederland geregistreerde vaccin is. In totaal zijn dus vier vaccins getest in deze studie.

Tabel 1 *Overzicht van de geselecteerde vaccins in de dierstudie*

Farmaceut	Type vaccin	Pluimvee soorten	Toe-diening	Vaccin virus	HPAI H5 clade	Antigene afstand tot huidige HPAI H5N1 virus[a]
Ceva	HVT-H5 (Vectormune®)	Kip, kalkoen	*In ovo,* injectie	A/mute_swan/Hungary/4999/2006_ H5N1	2.2	5,75
Boehringer Ingelheim (BIAH)	HVT-H5 (COBRA)	Kip, kalkoen	*In ovo*, injectie	Met computermodellen geoptimaliseerd_H5N1	2.3.2	4,97
Huvepharma (HP)	DNA H5	Pluimvee	Injectie	A/gyrfalcon/Washington/41088-6/2014_H5N8	2.3.4.4A	2,68
MSD Animal Health (MSD)	Geïnactiveerd virus (Nobilis® AI H5N2)	Pluimvee[b]	Injectie	A/duck/Potsdam/1402-6/1986_H5N2	LPAI H5	5,71

[a]De antigene afstand is bepaald volgens de 27 AA methode gepubliceerd door Peeters, et al. (2017) [20].
[b]Geregistreerd voor kip, maar geïnactiveerde vaccins zouden ook in andere pluimveesoorten werkzaam moeten zijn.

De antigene afstanden tussen de vaccins en het huidige HPAI H5N1 virus zijn bepaald op basis van de 27 AA methode gepubliceerd door Peeters, *et al.* (2017) [20] en staan weergegeven in Tabel 1. Volgens deze methode heeft het Nobilis vaccin, dat is gebaseerd op een geïnactiveerd LPAI H5N2 virus uit 1986, een antigene afstand van 5,71 tot het huidige HPAI H5N1 virus. Een eerdere studie liet zien dat na toediening van een geïnactiveerd vaccin een HAR-titer van minimaal 3 (8 HAU) vereist is om virustransmissie te voorkomen [19]. In theorie zou dit betekenen dat met een antigene afstand van 5,71 tot het virus, er in het dier een titer van minimaal 8,71 opgewekt moet worden door het Nobilis vaccin. Dit is een hoge titer die bij gebruik van het vaccin in het veld waarschijnlijk niet bij voldoende dieren in een koppel behaald zal worden. Hoewel in veel gevallen geldt dat de effectiviteit van een vaccin verband houdt met de genetische overeenkomst tussen het vaccinvirus en het veldvirus, zijn er wel uitzonderingen. Uit eerder onderzoek is gebleken dat genetische en antigene afstanden niet altijd met elkaar correleren [20]. Daarom is het van waarde om dit vaccin mee te nemen in deze dierstudie. Het Nobilis vaccin is op dit moment geregistreerd voor kippen, maar geïnactiveerde vaccins zouden ook in andere pluimveesoorten werkzaam moeten zijn. Een groot nadeel van het Nobilis vaccin is dat het niet voldoet aan het DIVA-principe. De geselecteerde HVT-H5 vaccins van Ceva en BIAH hebben ook een relatief grote antigene afstand tot het huidige HPAI H5N1 virus, namelijk respectievelijk 5,75 en 4,97. Echter, voor deze "moderne" typen vaccins wordt verwacht dat deze ook een cellulaire immuunrespons opwekken en dat antilichamen mogelijk minder belangrijk zijn voor de bescherming van het dier. Het HVT-vaccin van BIAH bevat een met computermodellen geoptimaliseerd H5 gen (COBRA), waardoor het vaccin een brede werking zou moeten hebben tegen verschillende HPAI H5-stammen. De antigene afstand tussen het huidige HPAI H5N1 virus en het DNA-vaccin van HP is het kleinste van de drie vaccins, namelijk 2,68. Daarnaast wekken DNA-vaccins, net als HVT-H5 vaccins, een cellulaire immuunrespons op. De drie geselecteerde moderne vaccins, de HVT-H5 en DNA-vaccins, bevatten alleen het H5 gen van het vogelgriepvirus, waardoor zij dus voldoen aan het DIVA-principe. De toediening van alle vaccins is door middel van individuele injectie van de dieren, de HVT-vaccins kunnen worden toegediend aan eendagskuikens of *in ovo*. De HVT-H5 vaccins kunnen worden toegepast in kippen en kalkoenen, maar zijn niet geschikt voor gebruik in andere pluimveesoorten, zoals eenden of ganzen. Het DNA-vaccin kan worden toegepast in alle pluimveesoorten.

4.2 Materiaal en Methode

4.2.1 Vergunningen

De dierstudie werd uitgevoerd volgens de richtlijnen van 2010/63/EU. De dierstudie werd goedgekeurd door de Centrale Commissie Dierproeven (CCD) (vergunningaanvraag AVD2210020173706; experiment AVI-22-50-018). De HVT-vaccins zijn Genetisch Gemodificeerde Organismen (GGO). Daarom zijn er bij 'Bureau GGO' vergunningen aangevraagd voor het uitvoeren van de dierstudie en voor de analyse van de monsters in het laboratorium (IG 22-080, IG 22-081, IG 22-097).

4.2.2 Locatie en huisvesting

De dierstudie werd uitgevoerd in de dierfaciliteiten van WBVR in Lelystad. De eerste 7 weken werden de kippen onder BSL2 condities gehuisvest. Op 7 weken leeftijd verhuisden de kippen naar andere stallen waar ze één week konden acclimatiseren onder BSL2 condities. Vanaf het moment van infectie, op 8 weken leeftijd, werden de kippen in deze stallen gehuisvest onder BSL3 condities. De verschillende groepen kippen werden ten tijde van infectie gehuisvest in twee identieke stallen, waarbij de groepen werden gescheiden in verschillende hokken met dichte wanden zodat de kippen van de verschillende groepen geen direct contact konden hebben. De hokken hadden een bodemoppervlakte van circa 2,3 m^2 en de bodem was bedekt met zaagsel. In de stallen werd door kunstmatige verlichting een natuurlijk dag-nachtritme nagebootst (13 uur licht; 11 uur donker). De huisvesting en verzorging van de kippen was afgestemd op de specifieke behoeften van de leeftijd. De staltemperatuur werd geleidelijk afgebouwd en in de eerste weken hadden de kuikens een warmtelamp ter beschikking. Gedurende de volledige studie hadden de kuikens een zitstok en een stuk jute ter beschikking als kooiverrijking. De kippen hadden onbeperkt beschikking over opfokleghennenvoer en water. In deze dierstudie is getracht om de contactstructuur zo vergelijkbaar mogelijk te maken met de praktijk. Echter, door de krachtige luchtafzuiging, de huisvesting in onderdruk, de kleine groepen per hok en de relatief lage dichtheid van het aantal kippen per vierkante meter zal dit niet helemaal vergelijkbaar zijn.

4.2.3 Dieren en groepen

Deze studie is uitgevoerd in 185 Lohmann Brown Classic opfokleghennen die op de dag van uitkomst werden geleverd aan WBVR. In de broederij hebben de kuikens geen vaccinaties ontvangen. De moederdieren van de kuikens waren 38 weken oud en hebben op de dag van uitkomst de standaardvaccinaties tegen de ziekte van Marek gehad, waaronder een vaccinatie met een HVT-vaccin. Naast diverse overige standaardvaccinaties in de opfokperiode zijn de moederdieren in de productieperiode alleen nog herhaaldelijk gevaccineerd tegen Infectieuze Bronchitis en Newcastle Disease virus (geen van allen vector-vaccins).

In deze transmissiestudie waren er 6 groepen die in duplo (tweevoud) zijn onderzocht. Dus van elke groep was er een groep A en een groep B (Tabel 2). Deze strategie is gekozen om een significant verschil aan te kunnen tonen met het minste aantal dieren [103]. Elke groep bestond uit 10 kippen. Per groep zijn 5 kippen geïnfecteerd met virus (infectiedieren) en 5 kippen werden 8 uur na infectie bij de infectiedieren geplaatst zonder vooraf geïnfecteerd te worden (contactdieren). Met behulp van het infectiemoment en de infectiestatus van de contactdieren, samen met de infectiestatus van de infectiedieren, kon de virustransmissie worden berekend.

Tabel 2 *De transmissiestudie is uitgevoerd met 6 groepen. Elke groep bestond uit 10 kippen: 5 infectiedieren en 5 contactdieren. De groepen zijn* ***in duplo*** *getest (groep A en B). Per groep is de dag van toediening van het vaccin, de toedieningsroute en de dosis van het vaccin zoals voorgeschreven door de farmaceut weergegeven.*

Groep	Infectiedieren	Contactdieren	Dag toediening	Toedienings-Route	Dosis
1 Controle A en B	5 ongevaccineerd	5 ongevaccineerd	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
2 HVT-H5 Ceva A en B	5 gevaccineerd	5 gevaccineerd	0	Subcutaan	100%
3 HVT-H5 BIAH A en B	5 gevaccineerd	5 gevaccineerd	0	Subcutaan	100%
4 DNA HP A en B	5 gevaccineerd	5 gevaccineerd	14	Intramusculair	100%
5 Nobilis MSD A en B	5 gevaccineerd	5 gevaccineerd	8	Subcutaan	100%
6 Nobilis MSD titergroep A en B	5 gevaccineerd	5 ongevaccineerd	8	Subcutaan	19 kippen 75% 19 kippen 50%

In de controlegroep zijn de kippen niet gevaccineerd, zodat het effect van de vaccins kon worden vergeleken met ongevaccineerde kippen. In de groepen 2 t/m 5 werden zowel de infectiedieren als de contactdieren gevaccineerd met de te onderzoeken vaccins: groep 2 HVT-H5 vaccin Vectormune® van Ceva, groep 3 HVT-H5 COBRA vaccin van BI, groep 4 het DNA-vaccin van HP en groep 5 het geïnactiveerde Nobilis® AI H5N2 vaccin van MSD. Voor de groepen 1 t/m 5 waren 5 reservedieren per groep opgenomen mocht er vóór infectie uitval optreden.

De kippen van groep 6 werden net zoals groep 5 gevaccineerd met het Nobilis vaccin, maar met een lagere vaccin dosis. Oorspronkelijk is groep 6 toegevoegd als een extra controlegroep, want uit recente studies bij WBVR bleek dat de virustransmissie van H5 clade 2.3.4.4b virussen niet eenvoudig te meten is. WBVR deed transmissie-experimenten met 6-weken oude SPF kippen met HPAI H5N8 en H5N6 virussen van de index-cases in pluimvee uit 2014, 2016 en 2017 in Nederland [29]. Hieruit bleek dat de kippen heel snel dood gingen na inoculatie met een doses van 10^6 EID_{50} (binnen 24-72 uur) van het challengevirus, waardoor er nauwelijks transmissie optrad. Bij een virusdosis van 10^4 EID_{50} raakte slechts 4% van de infectiedieren besmet en bij een dosis van 10^5 EID_{50} raakte 50% van de infectiedieren besmet. Het bepalen van de juiste virusdosis is dus een uitdaging voor de nieuwe HPAI clade 2.3.4.4b virussen en kan daarbij ook nog afhankelijk zijn van de leeftijd en het type kippen. In de ongevaccineerde controlegroep zouden dus alle geïnoculeerde dieren kunnen sterven voordat transmissie kan zijn opgetreden. Om dit te ondervangen werd er een extra controlegroep gevaccineerd met een lage dosis van het geïnactiveerde vaccin en zijn er alleen kuikens met een antilichaamtiter $<2^3$ (zoals eerder beschreven in Sitaris, *et al*., (2016) [19]) geselecteerd voor de transmissiestudie. De verwachting was dat deze dieren langer zouden blijven leven, omdat ze deels beschermd zouden zijn tegen virustransmissie. Daarmee zou deze groep als controlegroep kunnen fungeren om de reductie in transmissie in de vaccingroepen te kunnen vergelijken in het geval dat er geen transmissie in de controlegroep kon worden gemeten. Om op het moment van challenge in duplo 5+5 kippen met een een HAR-titer $<2^3$ beschikbaar te hebben zijn 19 kippen gevaccineerd met 50% van de voorgeschreven en 19 kippen gevaccineerd met 75% van de voorgeschreven dosis van het Nobilis vaccin. Vervolgens werd de antilichaamtiter van deze kippen tegen het

vaccin virus (homoloog) en het challengevirus (heteroloog) op dag 42 van de studie bepaald. Tien kippen (2x5) met een titer van 0 (maar met hoge homologe titer), 1 of 2 tegen het challengevirus zijn geselecteerd en ingezet als infectiedieren in de dierstudie. De tien contactdieren, plus 2 reservedieren, in deze groep waren niet gevaccineerd. Op basis van eerdere studies werd namelijk verwacht dat de reductie in virustransmissie in gevaccineerde koppels voornamelijk komt door verminderde virusuitscheiding van geïnfecteerde dieren. Echter, tijdens de studie bleek dat er wel virustransmissie in de controlegroep te meten was, terwijl in de extra controlegroep, ondanks de selectie van infectiedieren op lage titers, toch bescherming tegen zowel virustransmissie als ziekteverschijnselen werd waargenomen. Daarom is de data van deze groep nu aan het rapport toegevoegd als groep waarin is geselecteerd op titers; de 'Nobilis MSD titergroep'. Met de data uit deze groep kan een eerste indruk worden verkregen hoe de hoogte en de verdeling van de HAR-titers samenhangt met virustransmissie. Daarmee kan voor het geïnactiveerde vaccin Nobilis worden onderzocht of (de hoogte en verdeling van) HAR-titers ook een goede 'correlates of protection' is op het gebied van het tegengaan van virustransmissie. Dit kan informatie opleveren die bruikbaar is voor de opzet van vervolgstudies, maar dan ook met de andere type vaccins.

Voor het verkrijgen van bloed vóór de start van het experiment, dus op het moment van binnenkomst, waren er 10 kuikens in de studie opgenomen. Met behulp van dit bloed kon de afwezigheid van maternale antilichamen tegen AIV worden bevestigd.

4.2.4 Challengevirus

Het challengevirus, het virus waarmee de kippen op 8 weken zijn geïnfecteerd, is een HPAI H5N1 clade 2.3.4.4b virus dat in 2021 is gedetecteerd op een leghennenbedrijf in Nederland. De volledige genoomsequentie is bepaald ten tijde van detectie en is te vinden in de GISAID Database onder het nummer EPI_ISL_6101848. Het betreft A/chicken/Netherlands/21038165-006010/2021_H5N1_PB2_2021-11-07_LUTJEGAST. Dit virus is gekozen, omdat dit virus een representant is voor de virussen die sinds 2020 circuleren in Nederland en Europa. Het challengevirus is verkregen door het virus in twee passages op te kweken in 9-11 dagen oude 'specific pathogen free' (SPF) geëmbryoneerde eieren. Vervolgens is de volledige genoomsequentie opnieuw bepaald om mutaties door passage uit te sluiten. Het virus is vervolgens in drievoud getitreerd om de gemiddelde egg infectious dose (EID_{50}) te bepalen. Het virus is verdund in steriele Tryptose Fosfaat Buffer 95% tot een verdunning van 10^7/ml inoculum. Na challenge is de virustiter van het inoculum gecontroleerd en het was daadwerkelijk 10^7/ml.

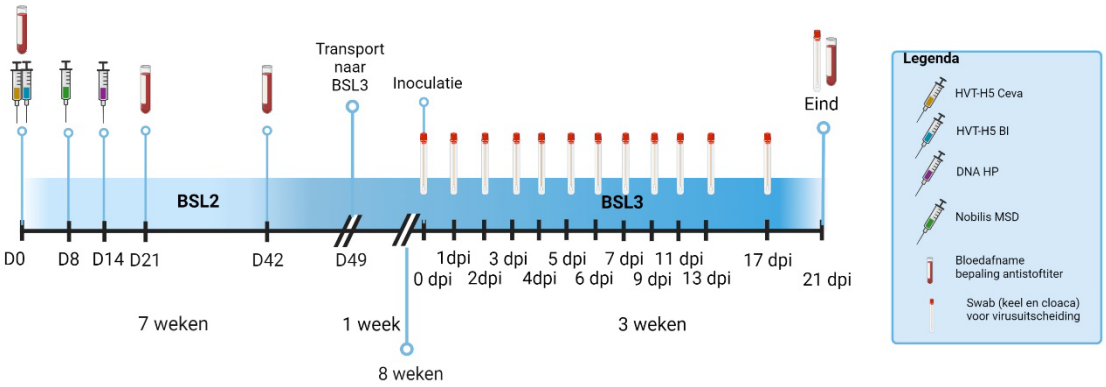
4.2.5 Vaccins

De vaccins werden toegediend zoals voorgeschreven door de farmaceut. Een vaccin werd slechts eenmalig toegediend. Tabel 2 geeft per vaccin de dag van toediening, de toedieningsroute en de dosis van de te onderzoeken vaccins. In bijlage 2 staan meer details van de vaccins vermeld zoals de bewaarcondities, batch gegevens, etc.

4.2.6 Proefopzet

De proefopzet van de transmissiestudie is schematisch weergegeven in Figuur 1. Op de dag van uitkomst werden de kuikens geleverd aan het WBVR. De kuikens zijn random verdeeld over de 6 groepen en kregen per groep een kleur op de rug met een merkstift. Tien kuikens werden onder sedatie verbloed. Dit bloed is getest in de NP-ELISA om de afwezigheid van maternale antilichamen tegen AIV te bevestigen. Vervolgens werden de HVT-vaccins subcutaan toegediend aan de groepen 'HVT-H5 Ceva' en 'HVT-H5 BI'. Op dag 8 is het geïnactiveerde vaccin Nobilis in verschillende doses subcutaan toegediend aan de groepen 'Nobilis MSD' en 'Nobilis MSD titergroep', met uitzondering van de contactdieren van de titergroep. Op dag 14 is het DNA-vaccin intramusculair toegediend aan de groep 'DNA HP'. Op dag 21 kregen alle dieren een vleugelnummer voor identificatie. Daarnaast werd op dag 21 bloed afgenomen om de antilichaamtiter (humorale immuunrespons) te bepalen met de HAR. Dit werd herhaald op dag 42. Op basis van de gemeten antilichaamtiter van dag 42 werden de infectiedieren in de 'Nobilis MSD titergroep' geselecteerd. De ongeselecteerde dieren zijn geëuthanaseerd. Op dag 49 werden alle kippen verplaatst naar de nieuwe stal en random opgedeeld in groep A en B. Er volgde één week acclimatisatie. Op dag 56, de dag van infectie, oftewel 0 dagen post infectie (dpi), zijn de reservedieren geëuthanaseerd. Daarna werden de contactdieren tijdelijk gescheiden van de infectiedieren zodat de contactdieren niet door contact met het inoculum werden geïnfecteerd met het virus. De infectiedieren zijn intra-choanaal geïnfecteerd met 0,1 ml van het virus, dus elk dier kreeg 10^6 EID_{50} HPAI H5N1 virus. Na 8 uur werden de contactdieren weer bij de infectiedieren geplaatst. De eerste week zijn

dagelijks keel- en cloaca swabs van alle dieren afgenomen om virusuitscheiding te bepalen. In de tweede week werden om de dag (9, 11, 13 dpi) swabs afgenomen en in de derde week om de vier dagen (17 en 21 dpi). Aan het einde van de transmissiestudie zijn alle dieren onder sedatie verbloed en werd het bloed verzameld.



Figuur 1 *Proefopzet transmissiestudie*

BSL: Biosecurity level; D: dag; Dpi: dagen post infectie.

Gedurende de volledige studie vond er dagelijkse inspectie en verzorging van de dieren plaats. Indien er tijdens een inspectie milde tot ernstige ziekteverschijnselen als gevolg van infectie werden waargenomen dan werd er dezelfde dag een extra inspectie uitgevoerd. Alle ziekteverschijnselen zijn genoteerd. De kippen werden geëuthanaseerd wanneer zij het humane eindpunt bereikten, zoals vooraf gedefinieerd.

De effectiviteit van de verschillende vaccins in het beschermen tegen virustransmissie was de belangrijkste uitleesparameter van de studie. Voor alle groepen is de antilichaamrespons na vaccinatie en challenge bepaald. Daarnaast is de vaccineffectiviteit ten aanzien van het reduceren van ziekte en sterfte beoordeeld. Tot slot, is er met behulp van de data onderzocht of de HAR-titers goede 'correlates of protection' zijn ten aanzien van virustransmissie voor de groepen die het Nobilis vaccin toegediend hebben gekregen.

4.2.7 NP-ELISA

De NP-ELISA is een in-house ELISA van WBVR die de antilichamen van vogelgriepvirussen aantoont in serum. Serum is de vloeistof die overblijft als bloed stolt en het stolsel wordt verwijderd. De NP-ELISA richt zich op één van de elf virale eiwitten namelijk het Nucleocapside Proteïne (NP) van het vogelgriepvirus en de methode is eerder beschreven [104]. De NP-ELISA wordt in deze studie twee keer gebruikt. Ten eerste, wordt het bloed dat wordt verzameld van de 10 kuikens voor de start van de studie gecontroleerd op de afwezigheid van maternale antilichamen tegen AI. Ten tweede, wordt het bloed dat op de laatste dag van de studie wordt verzameld getest in de NP-ELISA. Indien er met de NP-ELISA antilichamen worden aangetoond dan is dit het gevolg van infectie met het HPAI H5N1 virus, want de drie moderne vaccins bevatten alleen het HA-gen. Dit geldt niet voor het Nobilis vaccin, want dit geïnactiveerde virus bevat ook het NP-gen, en er zullen dus antilichamen tegen het NP-eiwit aanwezig zijn na vaccinatie. Na vaccinatie met Nobilis kan er dus geen onderscheid meer worden gemaakt tussen gevaccineerde en geïnfecteerde dieren op basis van de NP-ELISA (geen DIVA-principe). De contactdieren in de 'Nobilis MSD titergroep' zijn niet gevaccineerd, dus bij deze dieren betekent een positief resultaat in de NP-ELISA wel een doorgemaakte infectie.

4.2.8 HAR

De hoeveelheid antilichamen die wordt gestimuleerd door de humorale immuunrespons na vaccinatie kan worden gekwantificeerd in de haemagglutinatie remmingstest (HAR). In de HAR wordt gebruik gemaakt van de haemaglutinerende eigenschappen van het vogelgriepvirus dat ervoor zorgt dat rode bloedcellen klonteren. Indien de antilichamen in het serum binden aan het virus in de test, dan wordt klontering van de rode bloedcellen voorkomen. Door het serum in een verdunningsreeks te testen, kan de hoeveelheid van de HA-specifieke-antilichamen (de titer) in het bloed worden bepaald. De methode van de HAR is beschreven in de 'terrestrial manual' van de WOAH [105]. Alle sera van voor infectie (dag 21 en 42) en na infectie (dag 77) worden getest in de HAR. De HAR wordt uitgevoerd met verschillende antigenen (virussen). Ten eerste zijn de

sera van de vaccingroepen getest met een antigeen dat nauw verwant is aan het H5 van het vaccin (homoloog antigeen). Voor de Nobilis groep werd de vaccinstam als antigeen gebruikt, terwijl voor de andere vaccingroep virussen werden gebruikt die zeer verwant waren aan de vaccinstam (bijna homoloog). Daarnaast zijn alle sera getest tegen het HPAI H5N1 virus (heteroloog antigeen) dat wordt gebruikt voor infectie. Alle testen zijn in duplo uitgevoerd en vervolgens zijn de resultaten van de twee testen gemiddeld voor analyse.

4.2.9 M-PCR

Voor het bepalen van de virusuitscheiding worden er keel- en cloaca swabs afgenomen. Bij afname worden de swabs direct in 2 ml Tryptosefosfaatbuffer gedaan en ingevroren in de -80°C tot aan opwerken. Na ontdooien wordt het RNA geïsoleerd met de MagNA Pure 96 en wordt het RNA getest in de PCR die het M-gen van influenza detecteert (M-PCR), zoals eerder beschreven [106]. In elke PCR-run wordt een ijklijn meegenomen om de hoeveelheid virus te kunnen kwantificeren en op deze wijze de titer van het uitgescheiden virus te kunnen bepalen. Doordat de detectiegrens van de PCR rond titer 1,7 ligt worden waarden <1,7 beschouwd als negatief.

4.2.10 Statistische analyses

Virustransmissie: berekenen van het reproductiegetal

Voor het bepalen van de vaccineffectiviteit is de virustransmissie van de infectiedieren naar de contactdieren onderzocht. De virustransmissie in het koppel wordt uitgedrukt met het reproductiegetal (R). Het reproductiegetal is berekend volgens de 'final size' methode zoals eerder beschreven in De Jong en Kimman (1994) [107] en de 'interval data analyse' zoals beschreven in Velthuis, *et al.* (2007) [108]. De subgroepen A en B zijn voor deze analyses als aparte groepen meegenomen. Bij de 'final size' methode (FS) wordt de R berekend gebaseerd op het aantal kippen die geïnfecteerd zijn (geweest) aan het einde van het experiment gegeven het totale aantal kippen in de startsituatie, het aantal contactdieren en het aantal infectiedieren. Deze methode is van minder aannames afhankelijk dan de 'interval data analyse' [108]. Echter, doordat er bij de FS methode geen rekening wordt gehouden met de infectieduur kan de R_0 worden onderschat [108] en wordt de FS-methode in deze studie alleen gebruikt om de 'interval data analyse' te ondersteunen. Met de 'interval data analyse' wordt R berekend met behulp van de transmissiesnelheid per dag (transmissie rate parameter, β). De β staat voor het aantal nieuwe infecties dat één dier veroorzaakt in de volledig vatbare populatie in één dag. Door de R met behulp van β te berekenen (R = β x gemiddelde infectieuze periode) wordt er bij de 'interval data analyse' dus rekening gehouden met de duur van de infectieuze periode van een geïnfecteerde kip. Dit is belangrijk, want de infectieuze periode van gevaccineerde kippen is langer, omdat deze niet dood gaan door de infectie. De 'interval data analyse' wordt uitgevoerd met een GLM waarbij het aantal cases (C)/aantal contactdieren (S) als afhankelijke variabele is genomen en het aantal infectieuze dieren (I)/totaal aantal dieren (N) als offset [108]. Dat geeft een schatting en de variantie van Ln(β). Daarnaast wordt voor elke apart type geïnfecteerd individu (hoge of lage titer) de duur van de infectieuze periode bepaald (T) en daaruit de verwachting en de variantie van ln(T). De schatting van R wordt dan bepaald uit de vergelijking ln(R)=ln(β)+ln(T) en de variantie van ln(R) is var(ln(β))+var(ln(T)) voor de berekening van het betrouwbaarheidsinterval [19].

Virusuitscheiding

Naast het bepalen van de virustransmissie zijn andere parameters voor de vaccineffectiviteit onderzocht, waaronder de virusuitscheiding die is gemeten in de keel- en cloaca swabs. De virusuitscheiding geeft informatie over de mogelijke besmettelijkheid van het geïnfecteerde dier en hangt daarmee ook samen met virustransmissie en kan een relatie hebben met de ernst van ziekteverschijnselen. De virusuitscheiding is geanalyseerd met R (Software pakket R versie 4.2.2). Eerst is de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding (wel uitscheiding/geen uitscheiding) uitgerekend met een logistisch regressiemodel. Met behulp van de Fisher exact test is de significantie t.o.v. de controlegroep bepaald. De 'exact method' is gebruikt om het 95% betrouwbaarheidsinterval (BI) voor de controlegroep te berekenen. Het gebruik van de 'exact method' was nodig, omdat alle controledieren virus hadden uitgescheiden. Vervolgens is met een lineair model uitgerekend hoeveel virus er totaal in de verschillende groepen is uitgescheiden, de zogenaamde gemiddelde 'Area under the curve' (AUC in log 10). Daarnaast is de duur van virusuitscheiding vergeleken tussen de verschillende groepen met behulp van het 'Cox proportional hazard model'.

Correlates of protection
Hoewel voor geïnactiveerde vaccinvirussen HAR-titers goede 'correlates of protection' zijn, is dit mogelijk minder het geval voor vector-vaccins en mRNA/DNA-vaccins, omdat deze vaccins zowel een humorale als een cellulaire immuunrespons opwekken. De humorale immuunrespons van deze vaccins kan na vaccinatie lager zijn dan na vaccinatie met geïnactiveerde vaccins, maar kan het pluimvee beschermen door de opgewekte cellulaire immuunrespons. In eenvoudige modellen voor het berekenen van de vaccineffectiviteit wordt aangenomen dat alle gevaccineerde kippen in dezelfde mate beschermd zijn. In de methode van Sitaras, *et al.* (2016) wordt rekening gehouden met het antigene verschil tussen vaccin- en veldvirus en met een verschil in immuunrespons door de verschillende kippen binnen een experimentele groep [19]. Uit het artikel van Sitaras, *et al.* bleek dat voor het onderzochte HPAI H5N1 virus (A/turkey/Turkey/1/2005) 83,5% van de kippen een HAR-titer ≥3 tegen het veldvirus moet hebben zodat R<1.

Om te onderzoeken of de (verdeling van) de HAR-titers in deze studie goede 'correlates of protection' waren voor het geïnactiveerde Nobilis vaccin is een analyse uitgevoerd. In deze dierstudie is het effect van de immuunrespons berekend aan de hand van drie groepen: de controlegroep, de 'Nobilis MSD groep' en de 'Nobilis MSD titergroep'. De homologe HAR-titers van deze groepen werden in de analyse op basis van verschillende afkapwaarden hoog of laag genoemd (≤0, ≤1, ≤4, ≤4,5 en ≤5). Voor al deze afkapwaarden zijn de β's en de duur van de infectieuze periode voor de kippen met lage en hoge HAR-titers berekend. Er zijn vier β's voor deze twee type individuen, gedefinieerd door de vier mogelijke transmissie routes: $\beta_{hh}\frac{S_h I_h}{N}, \beta_{hl}\frac{S_l I_h}{N}, \beta_{lh}\frac{S_h I_l}{N}, \beta_{ll}\frac{S_l I_l}{N}$. Deze vier verschillende parameters kunnen alle vier worden geschat door de GLM met de cloglog [19].

Daaruit is dan vervolgens voor beide groepen (hoog/laag) een R berekend. Vervolgens is het percentage kippen dat een titer hoger dan de afkapwaarde moet hebben om R<1 binnen een groep te krijgen berekend. Dit percentage is tot slot per groep getoetst, omdat uit de observaties duidelijk was of er wel of niet virustransmissie plaatsvond. Ter controle is een sensitiviteitsanalyse uitgevoerd met GLM met een 'cloglog' link en een compensatie voor het aantal besmettelijke individuen [19].

4.3 Resultaten

4.3.1 Virustransmissie: berekenen van het reproductiegetal

Het voornaamste doel van deze transmissiestudie was het onderzoeken van de vaccineffectiviteit in het verminderen of voorkomen van de virustransmissie, dus of in de gevaccineerde groepen de R<1 was. Voor alle groepen, met uitzondering van de 'Nobilis MSD titergroepen', is met behulp van de FS-methode en de 'interval data methode' het reproductiegetal berekend (Tabel 3). In de ongevaccineerde controlegroep was er effectieve virustransmissie tussen de infectiedieren en de contactdieren, want de R, bepaald met de 'interval data methode', was 3,64 (95% BI 1,89-6,99). De HVT-H5 vaccins van Ceva en van BIAH reduceren de virustransmissie significant t.o.v. de ongevaccineerde controlegroep waarbij voor beide groepen het geschatte reproductiegetal 0 (95% BI 0-0,70) is met de FS-methode. Voor het DNA-vaccin en het Nobilis vaccin is er geen significante reductie van virustransmissie ten opzichte van de controlegroep aangetoond. Het reproductiegetal voor het DNA-vaccin is volgens de FS-methode 1,89 (95% BI 0,55-5,22) en voor het Nobilis vaccin 1,48 (95% BI 0,30-3,44). Voor het Nobilis vaccin is de transmissiesnelheid per dag (transmissie rate parameter, β) wel significant lager dan in de controlegroep, wat betekent dat het vaccin de virustransmissie wel remt, maar niet voldoende om R<1 te bereiken. Dat R<1 niet significant is blijkt ook uit de resultaten, want in één van de Nobilis groepen, de 'Nobilis MSD groep B', werd geen virustransmissie gezien, terwijl de virustransmissie in de 'Nobilis MSD groep A' wel werd voorkomen. Voor de 'Nobilis MSD titergroep' is de R niet berekend, omdat de contactdieren van deze groep niet gevaccineerd waren en je dus niet kunt spreken van R voor een homogene groep en deze groep niet vergelijkbaar is met de andere groepen.

De resultaten laten zien dat beide HVT-H5 vaccins de R reduceren tot significant onder de 1 en dat virustransmissie tussen kippen dus kon worden voorkomen in dit dierexperiment. Voor zowel het DNA-vaccin als het Nobilis vaccin ligt het berekende reproductiegetal niet significant onder de 1 (zie Tabel 3). Virustransmissie werd voorkomen in één van de twee Nobilis groepen, maar niet in de 'DNA HP' groepen.

Tabel 3 *De transmissiesnelheid per dag (transmissie rate parameter, β) en het reproductiegetal (R) volgens de FS-methode en de interval data methode van de verschillende groepen.*

Groep	Transmissie rate parameter β (dag^{-1}) gemiddelde (95% BI)	Reproductiegetal (R)	
		'Interval data methode' gemiddelde (95% BI)	'FS-methode' gemiddelde (95% BI)
1 Controle A en B	1,13 (0,60-2,13)	3,64 (1,89-6,99)	NA
2 HVT-H5 Ceva A en B	0 (0-NA)[a]	0 (0-NA)	0 (0-0,70)[a]
3 HVT-H5 BIAH A en B	0 (0-NA)[a]	0 (0-NA)	0 (0-0,70)[a]
4 DNA HP A en B	0,47 (0,24-0,95)	2,15 (1,03-4,50)	1,89 (0,55-5,22)
5 Nobilis MSD A en B	0,21 (0,09-0,50)[a]	0,92 (0,37-2,27)	1,48 (0,30-3,44)
6 Nobilis MSD titergroep A en B	NA[b]	NA[b]	NA[b]

[a]*Significant t.o.v. controlegroep.*

[b]*Voor deze groep zijn er geen reproductiegetal en β bepaald, omdat in deze groep de contactdieren niet gevaccineerd zijn en je dus niet kunt spreken van R voor een homogene groep.*

NA: 'not applicable' (niet toepasbaar); BI: betrouwbaarheidsinterval

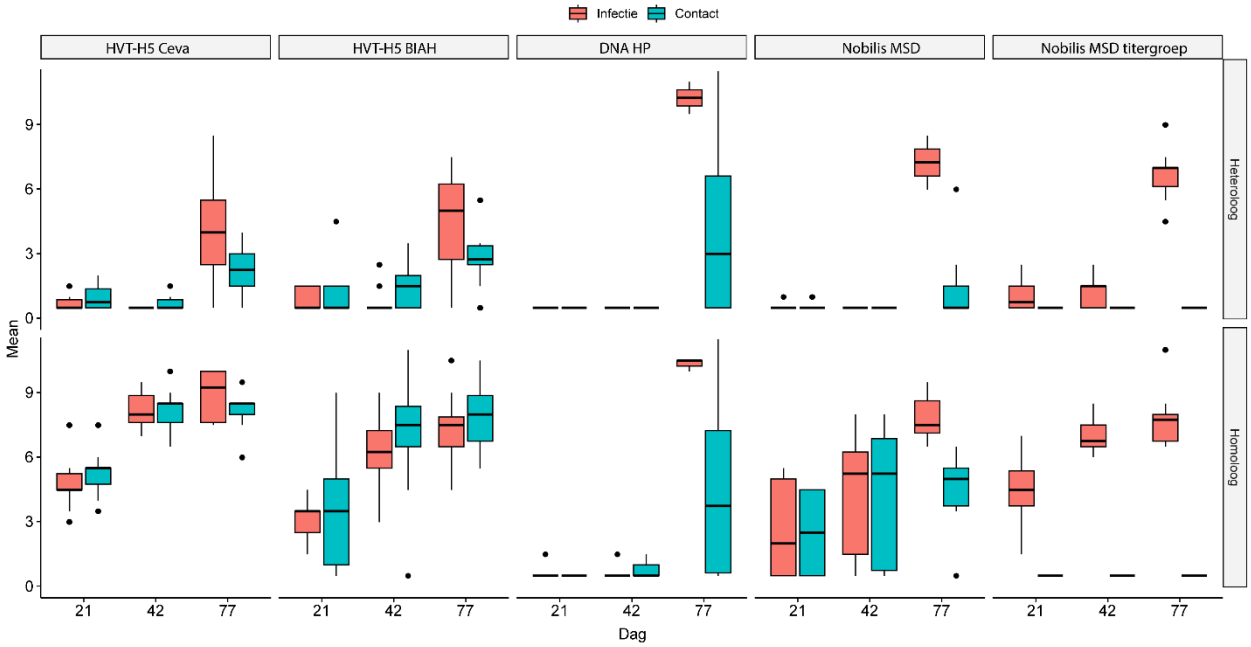
4.3.2 Immuunrespons na vaccinatie

Uit het bloed dat is verzameld van de 10 kuikens voor de start van de studie is met de NP-ELISA aangetoond dat de kippen geen maternale antilichamen tegen AIV hadden. Het bloed dat is afgenomen op dag 21 en 42, dus voor infectie, is getest in de HAR om de antilichaamtiter na vaccinatie te bepalen. De resultaten van de HAR staan weergegeven in Figuur 2. In figuur 2 zijn de HAR-titers apart berekend voor de infectie- en contactdieren en zijn de reservedieren niet meegenomen. In de tekst worden de gevaccineerde infectie-, contact en reservedieren per groep samen genomen.

Op dag 21 zijn er in alle groepen al meerdere kippen met homologe en heterologe titers, met uitzondering van de groep 'DNA HP' waar slechts één kip is met een homologe titer en geen van de kippen een heterologe titer heeft. Alle 25 kippen gevaccineerd met de HVT-H5 vaccinatie van Ceva hebben homologe titers (gemiddelde titer 4,53 (95% BI 2,23-6,82)). Van de kippen gevaccineerd met het HVT-H5 vaccin van BIAH hebben 22/25 een homologe titer (gemiddelde titer 2,73 (95% BI 0-6,62)). In de 'Nobilis MSD' hebben 13/25 kippen een homologe titer (gemiddelde titer 2,12 (95% BI 0-6,32)). In de 'Nobilis MSD titergroep' hebben 19 van de 37 gevaccineerde kippen een homologe titer (gemiddelde titer 2,16 (95% BI 0-6,59).

Op dag 42 zijn zowel de homologe als de heterologe titers van de vaccingroepen hoger dan op dag 21. In alle groepen, m.u.v. 'DNA HP', zijn de antilichaamtiters tegen het homologe antigeen significant hoger dan in de controlegroep. De kippen in de groep HVT-H5 Ceva hebben alle 25 een homologe titer (gemiddelde titer 7,68 (95% BI 5,91-9,44)) en 6/25 kippen hebben een heterologe titer. Van de kippen die zijn gevaccineerd met het HVT-H5 BIAH vaccin hebben alle 25 kippen, op 1 contactdier na, een homologe titer (gemiddelde titer 6,05 (95% BI 1,36-10,74)) en 11/25 kippen een heterologe titer. Van de kippen die zijn gevaccineerd met het DNA-vaccin van HP hebben 6/25 dieren een homologe titer (gemiddelde titer 0,25 (95% BI 0-1,06)). Van de kippen die de volle dosis van het Nobilis vaccin hebben gekregen, heeft 72% (18/25) kippen een homologe titer (gemiddelde titer 3,80 (95% BI 0-9,50)). In de titerselectiegroep zijn de 12 contactdieren (en reservedieren) niet gevaccineerd en hebben dus geen titer. Van de gevaccineerde kippen hebben 23/35 kippen een homologe titer (gemiddelde titer 3,99 (95% BI 0-10,37)) en 6/35 een heterologe titer. Van de dieren met een heterologe titer van 0 (maar met hoge homologe titer), 1 of 2 zijn tien infectiedieren geselecteerd. In de 'DNA HP' en 'Nobilis MSD' is niet geselecteerd voor titer en dus zijn een relatief groot aantal kippen geïnfecteerd waarvan geen antilichaamtiter in de HAR gemeten kon worden op dag 42. Dit is een mogelijke verklaring waarom er in deze groepen virustransmissie heeft opgetreden van de infectie- naar de contactdieren.

De antilichaamrespons na infectie, op dag 77, wordt verder besproken in paragraaf 4.3.4.

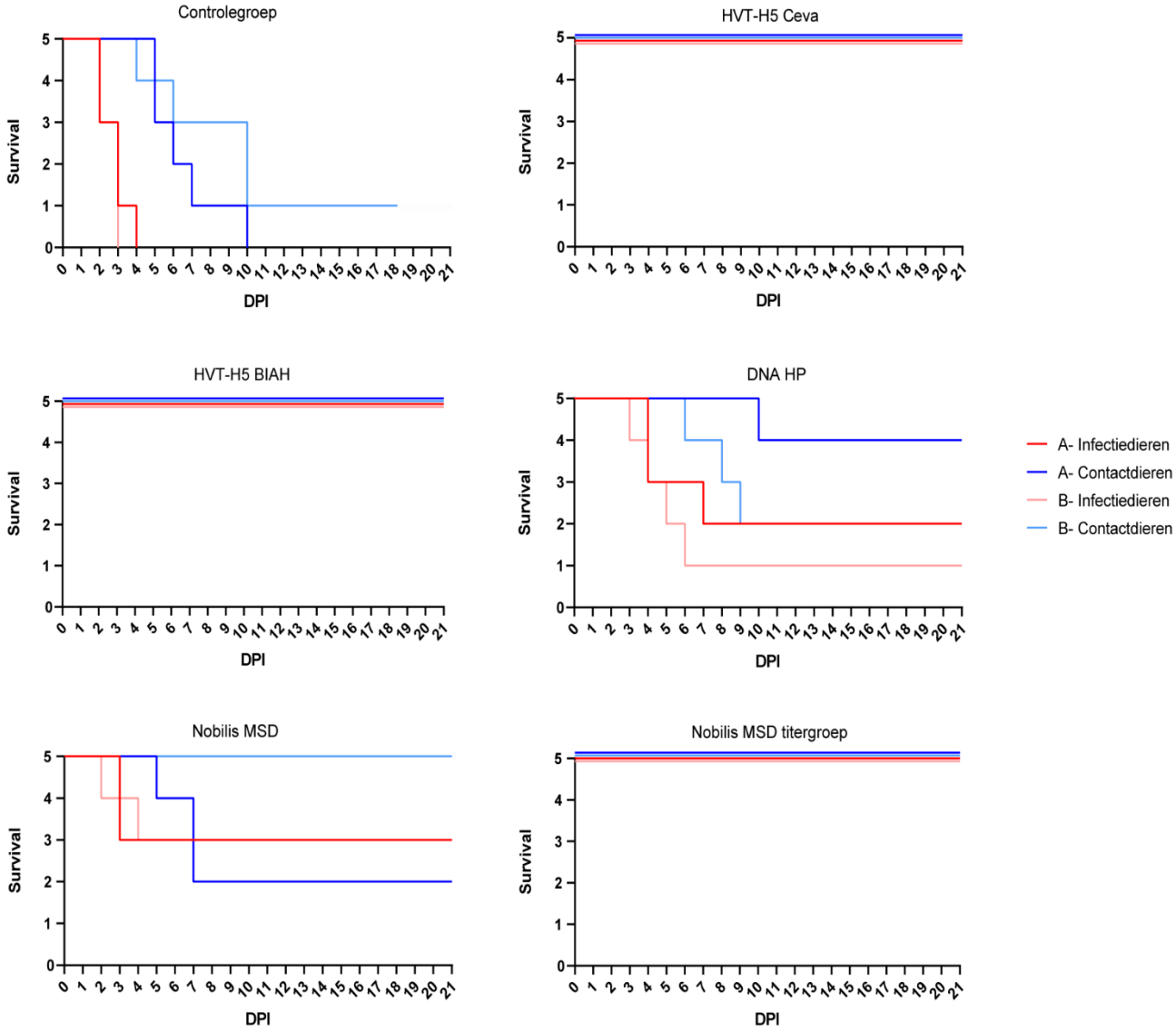


Figuur 2 *De HAR-titer van de infectie- en contactdieren van de verschillende groepen. Het bloed dat is afgenomen vóór infectie (op dag 21 en 42) en na infectie (dag 77) is getest in de HAR tegen een antigeen dat zeer verwant is aan het vaccinvirus (homoloog) en het huidige HPAI H5N1 challengevirus (heteroloog).*

4.3.3 Bescherming tegen ziekteverschijnselen na infectie

Om de effectiviteit van de vaccins in het reduceren tegen ziekteverschijnselen te beoordelen is van elke kip het moment genoteerd dat de kip is overleden of het humane eindpunt heeft bereikt. De sterfte die optrad in de groepen is weergegeven in 'survival curves' (Figuur 3) en de ziekteverschijnselen die zijn waargenomen zijn samengevat in Tabel 4. In de controlegroep zijn alle infectiedieren van zowel de A als de B groep binnen respectievelijk 3 en 4 dagen na infectie overleden. Vanaf dag 4 werd ook sterfte van de contactdieren waargenomen en zijn uiteindelijk alle dieren, m.u.v. één contactdier, overleden. Op 18 dagen na de infectie is het contactdier vanuit ethisch oogpunt geëuthanaseerd, omdat solitaire huisvesting zorgt voor ongerief en het voor de studie niet relevant was om de kip langer te volgen. In 9/10 kippen waren de kippen 1 a 2 dagen traag of zaten bol vóór sterfte of euthanasie. Ten tijde van het bereiken van het humane eindpunt werd er bij 5 kippen ernstige depressie gescoord, waarvan dit bij 2 kippen gepaard ging met rillen. Twee kippen hadden verminderd evenwicht en 1 kip had zenuwtrekken van de kop.

In de controlegroep B waren de ziekteverschijnselen vergelijkbaar. Twee kippen zijn zonder dat er eerst ziekteverschijnselen zijn waargenomen dood gevonden. De andere 7 kippen waren 1 a 2 dagen traag en zaten bol. Ten tijde van euthanasie werd bij 2 kippen ernstige depressie in combinatie met verminderd evenwicht waargenomen. Het contactdier dat op 18 dagen na infectie is geëuthanaseerd heeft 1 dag bol gezeten, maar verder zijn er geen ziekteverschijnselen gezien.



Figuur 3 *Survival curve van de zes groepen. De A en B groepen zijn per groep bij elkaar gevoegd in één figuur. DPI: dagen post infectie.*

Alle kippen die het HVT-H5 van Ceva of BIAH toegediend kregen hebben de infectie overleefd zonder dat zij ziek zijn geworden. Het DNA-vaccin van HP was niet effectief in het verminderen van ziekteverschijnselen en sterfte. In groep A overleden 3 infectiedieren en 1 contactdier. In groep B overleden 4 infectiedieren en 3 contactdieren na infectie. In groep A zijn bij 5 kippen, waarvan 3 contactdieren, geen ziekteverschijnselen waargenomen. Twee kippen zijn zonder eerst ziekteverschijnselen te vertonen dood aangetroffen. Twee andere kippen zaten 1 a 2 dagen bol en waren traag alvorens ze zijn overleden of geëuthanaseerd. Eén infectiedier was 7 dagen na infectie plots traag, zat bol en vertoonde verlammingsverschijnselen. Op 7 dagen na infectie zat 1 van de contactdieren bol, maar de dag daarna werden geen ziekteverschijnselen meer bij deze kip waargenomen.

In groep B van 'DNA HP' zijn 2/10 kippen niet ziek geworden. Zeven kippen zaten een dag bol en waren traag tot zeer traag alvorens ze dood werden gevonden of geëuthanaseerd. Zes kippen lieten bij euthanasie ernstige depressie zien en 1 kip had afwijkende locomotie. Een andere kip had geen eetlust en blauwe poten. Eén infectiedier heeft van 4 t/m 9 dagen na infectie bol gezeten en was traag, maar is niet overleden of vroegtijdig geëuthanaseerd.

Tabel 4 *Het aantal zieke dieren per groep en de duur dat er ziekteverschijnselen werden waargenomen per groep.*

			DPI
Groep	Ziek/ totaal	I/C	0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21
Controle A	10/10	I C	
Controle B	10/10	I C	
HVT-H5 Ceva A	0/10	I C	
HVT-H5 Ceva B	0/10	I C	
HVT-H5 BIAH A	0/10	I C	
HVT-H5 BIAH B	0/10	I C	
DNA HP A	5/10	I C	
DNA HP B	8/10	I C	
Nobilis MSD A	6/10	I C	
Nobilis MSD B	5/10	I C	
Nobilis MSD titergroep A	1/10	I C	
Nobilis MSD titergroep B	0/10	I C	

Rood: ziekteverschijnselen in de infectiedieren, blauw: ziekteverschijnselen in de contactdieren; zwart: alle dieren van de groep zijn overleden. DPI: dagen post inoculatie.

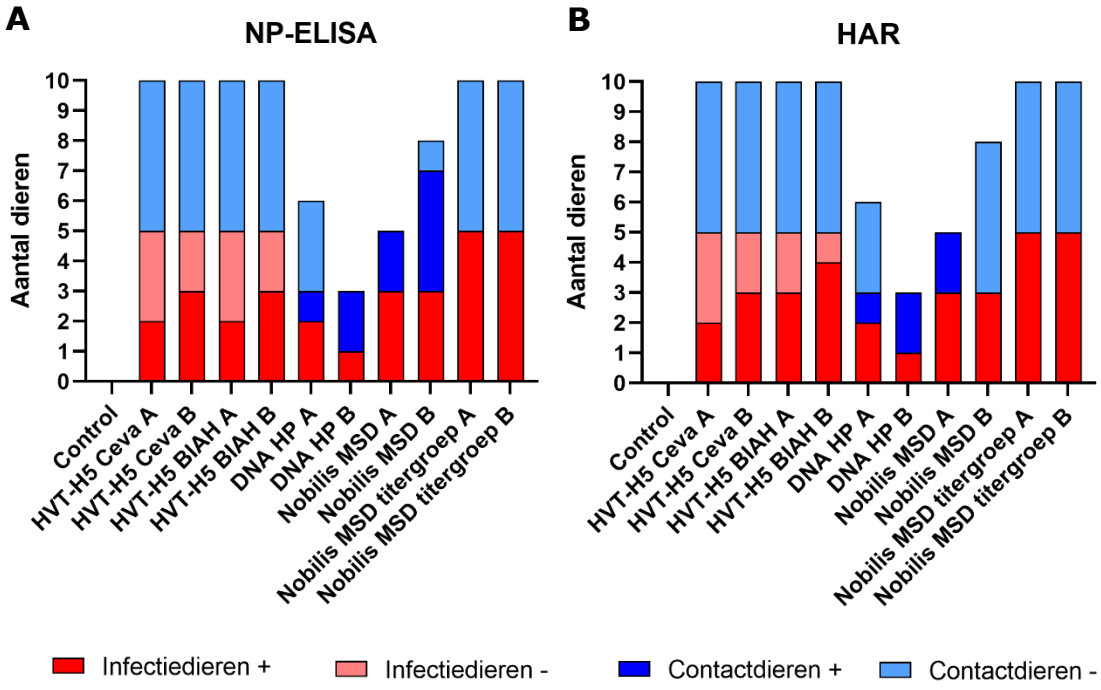
In de groep 'Nobilis MSD' zijn in zowel groep A als B 2 infectiedieren overleden. In groep A zijn er 3 contactdieren overleden, terwijl er in groep B geen contactdieren zijn overleden. In groep A zijn 4 kippen, waarvan 2 contactdieren, niet ziek geworden. Vijf kippen zaten 1 a 2 dagen bol en waren (zeer) traag alvorens ze zijn overleden of geëuthanaseerd. Drie van deze kippen vertoonden ernstige depressie bij euthanasie. Eén kip was traag en zat bol vanaf 6 t/m 10 dagen na infectie, maar daarna zijn er geen ziekteverschijnselen meer waargenomen. In groep B zijn er alleen ziekteverschijnselen waargenomen in de infectiedieren. Eén kip zat bol en was traag alvorens dood te zijn gevonden. Eén andere kip is dood gevonden zonder dat voorafgaand symptomen geobserveerd zijn. Drie kippen waren 1 a 2 dagen traag, maar zijn daarna hersteld. In de Nobilis groep waar is geselecteerd op titer 'Nobilis MSD titergroep' hebben in zowel groep A als B alle infectie- en contactdieren de infectie overleefd. In groep A was er 1 infectiedier op 7 dagen na infectie traag en zat bol, maar verder zijn er geen ziekteverschijnselen waargenomen. In groep B zijn alle dieren gezond gebleven.

Beide HVT-H5 vaccins waren dus zeer effectief in het reduceren van ziekte en sterfte in het dierexperiment, terwijl er na vaccinatie met het DNA-vaccin en het Nobilis vaccin (100% dosis) nog wel ziekte en sterfte werd geobserveerd na challenge met het HPAI H5N1 virus.

4.3.4 Aantal geïnfecteerde kippen in het dierexperiment

Op een leeftijd van 8 weken is het HPAI H5N1 challengevirus toegediend aan de kippen. Drie weken later, op de laatste dag van de studie, dag 77, is bloed afgenomen. Dit bloed is getest in de NP-ELISA en H5 HAR. Deze resultaten geven informatie over het aantal kippen dat is geïnfecteerd en als gevolg daarvan antilichamen heeft aangemaakt (Figuur 4a). De serologische testen geven alleen informatie over de kippen die de laatste dag van de studie nog in leven waren. In de HVT-groepen heeft 50% van de infectiedieren (2 á 3 kippen) als gevolg van infectie antilichamen ontwikkeld, want ze zijn positief in de NP-ELISA. Echter, de contactdieren van de HVT-vaccingroepen zijn allen negatief in de NP-ELISA, dus er heeft geen virustransmissie opgetreden van de infectiedieren naar de contactdieren. In de groepen 'DNA HP' zijn er 3 contactdieren positief in de NP-ELISA (1 in groep A en 2 in groep B). Dit toont aan dat er transmissie heeft plaatsgevonden naar deze contactdieren.

De kippen van 'Nobilis MSD' zijn gevaccineerd met het Nobilis vaccin, die het NP-eiwit bevat. Daarom wordt er verwacht dat alle dieren positief zijn in de NP-ELISA. Eén contactdier uit groep B is negatief in de NP-ELISA. Dit dier was ook negatief in de HAR en heeft dus geen antilichamen aangemaakt na vaccinatie. In de 'Nobilis MSD titergroep' zijn alle infectiedieren, zoals wordt verwacht na vaccinatie, positief in de NP-ELISA. De contactdieren van deze groep zijn niet gevaccineerd en de kippen zijn negatief in de NP-ELISA, wat dus aantoont dat er geen virustransmissie heeft opgetreden van de infectiedieren naar de contactdieren.

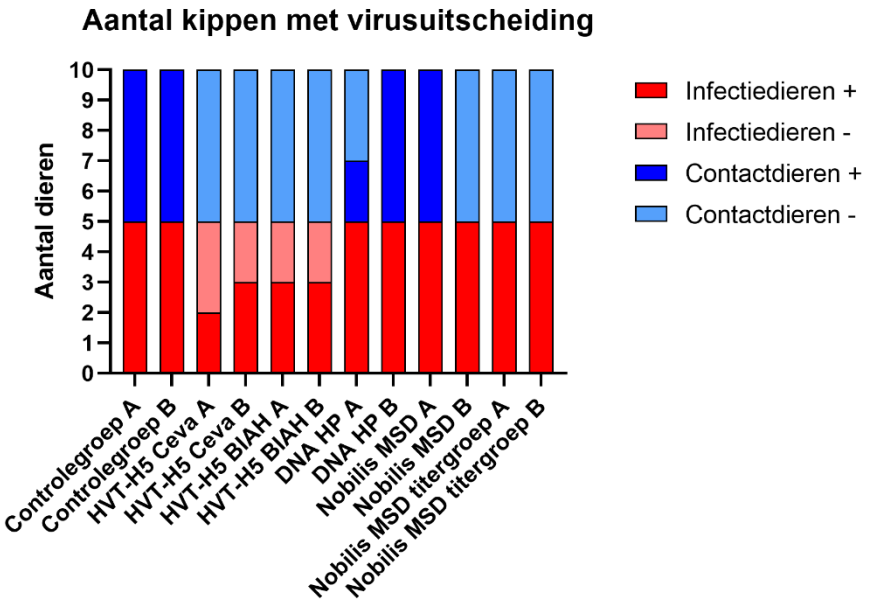


Figuur 4 *Het aantal kippen dat een infectie heeft doorgemaakt o.b.v. de serologie dat is uitgevoerd op het bloed dat is verzameld op de laatste dag van de studie (dag 77).* ***A)*** *De resultaten van de* ***NP-ELISA****. Een positieve uitslag betekent dat de kippen een infectie hebben doorgemaakt, m.u.v. de kippen van 'Nobilis MSD' en de infectiedieren van 'Nobilis MSD titergroep'. Deze kippen zijn gevaccineerd met het Nobilis vaccin, die het NP-eiwit bevat en is er dus geen onderscheid te maken tussen vaccinatie en doorgemaakte infectie.* ***B)*** *De resultaten van de* ***HAR****. De positieve kippen hebben in het bloed van dag 77 een titer-stijging van ≥3 t.o.v. dag 42 tegen het heterologe antigeen (het challengevirus).*

De HAR-titers zijn na infectie (dag 77) hoger dan voor infectie (dag 42), zoals weergegeven in Figuur 2. Op dag 77 heeft groep HVT-H5 Ceva een gemiddelde homologe titer van 8,03 (95% BI 5,92-10,13) en een gemiddelde heterologe titer van 2,65 (95% BI 0-7,10). De kippen die zijn gevaccineerd met het HVT-H5 BIAH vaccin hebben een gemiddelde homologe titer van 7,15 (95% BI 4,08-10,22) en 18/20 kippen een gemiddelde heterologe titer van 3,13 (95% BI 0-7,14). Van de kippen die zijn gevaccineerd met het DNA-vaccin van HP hebben 6/9 dieren een homologe titer (gemiddelde titer 6,00 (95% BI 0-14,76)) en dezelfde dieren hebben ook een heterologe titer (gemiddelde titer 5,83 (95% BI 0-14,86)). De gemiddelde homologe titer is sterk gestegen t.o.v. dag 42. Van de kippen die de volle dosis van het Nobilis vaccin hebben gekregen is de gemiddelde homologe titer 5,46 (95% BI 0,85-10,08) en de heterologe titer 3,69 (95% BI 0-10,13). In de titerselectiegroep hebben de kippen een gemiddelde homologe titer van 7,30 (95% BI 4,76-9,84) en een gemiddelde heterologe titer van 6,20 (95% BI 3,91-8,49). Het aantal dieren met een heterologe HAR titer ≥3 tegen het HPAI H5N1 challengevirus op de laatste dag van de studie t.o.v. dag 42 is weergegeven in Figuur 4b. Alleen in groep DNA HP A, DNA HP B' en 'Nobilis MSD A' hebben de contactdieren een heterologe HAR titer ≥3 stijging.

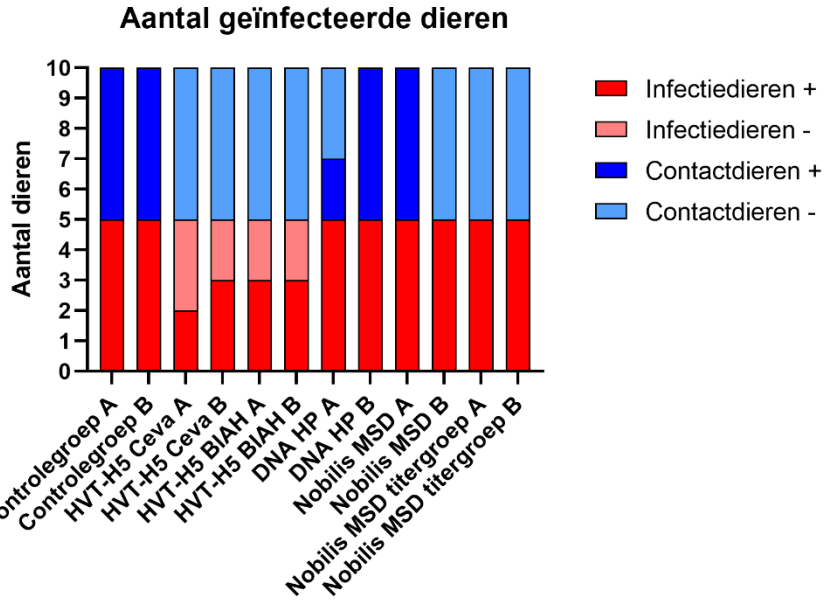
De virusuitscheiding van elke kip is gemeten door het regelmatig afnemen van keel- en cloaca swabs en deze te testen in de M-PCR. Op basis van de virusuitscheiding die is bepaald met de M-PCR kan ook het aantal geïnfecteerde infectie- en contactdieren worden bepaald. Figuur 5 toont het aantal geïnfecteerde kippen op basis van virusuitscheiding uit keel en/of cloaca. Een kip wordt als geïnfecteerd beschouwd wanneer gedurende

2 dagen of langer (≥2 dagen) virus is uitgescheiden met een minimale titer van ≥1,7. In de controlegroepen A en B hebben 20/20 infectie- en contactdieren een infectie doorgemaakt. In de 'HVT-H5 Ceva' groep hebben 5/10 infectiedieren virus uitgescheiden, maar de contactdieren zijn niet geïnfecteerd geraakt. In 'HVT-H5 BI' hebben 6/10 infectiedieren en geen contactdieren virus uitgescheiden. In de groep 'DNA HP' hebben in groep A 5/5 infectiedieren en 2/5 contactdieren virus uitgescheiden, terwijl in groep B 5/5 infectiedieren en 5/5 contactdieren virus hebben uitgescheiden. In de 'Nobilis MSD' groep hebben in groep A alle infectie- en contactdieren virus uitgescheiden. In groep B hebben 5/5 infectiedieren virus uitgescheiden, maar 0/5 contactdieren. Tot slot hebben in de 'Nobilis MSD titergroep' alle infectiedieren (10/10) virus uitgescheiden, maar zijn er geen contactdieren geïnfecteerd geraakt.



Figuur 5 *Het aantal kippen waarvoor* ≥2 dagen virusuitscheiding met een titer van ≥1,7 *werd gemeten tijdens het dierexperiment.*

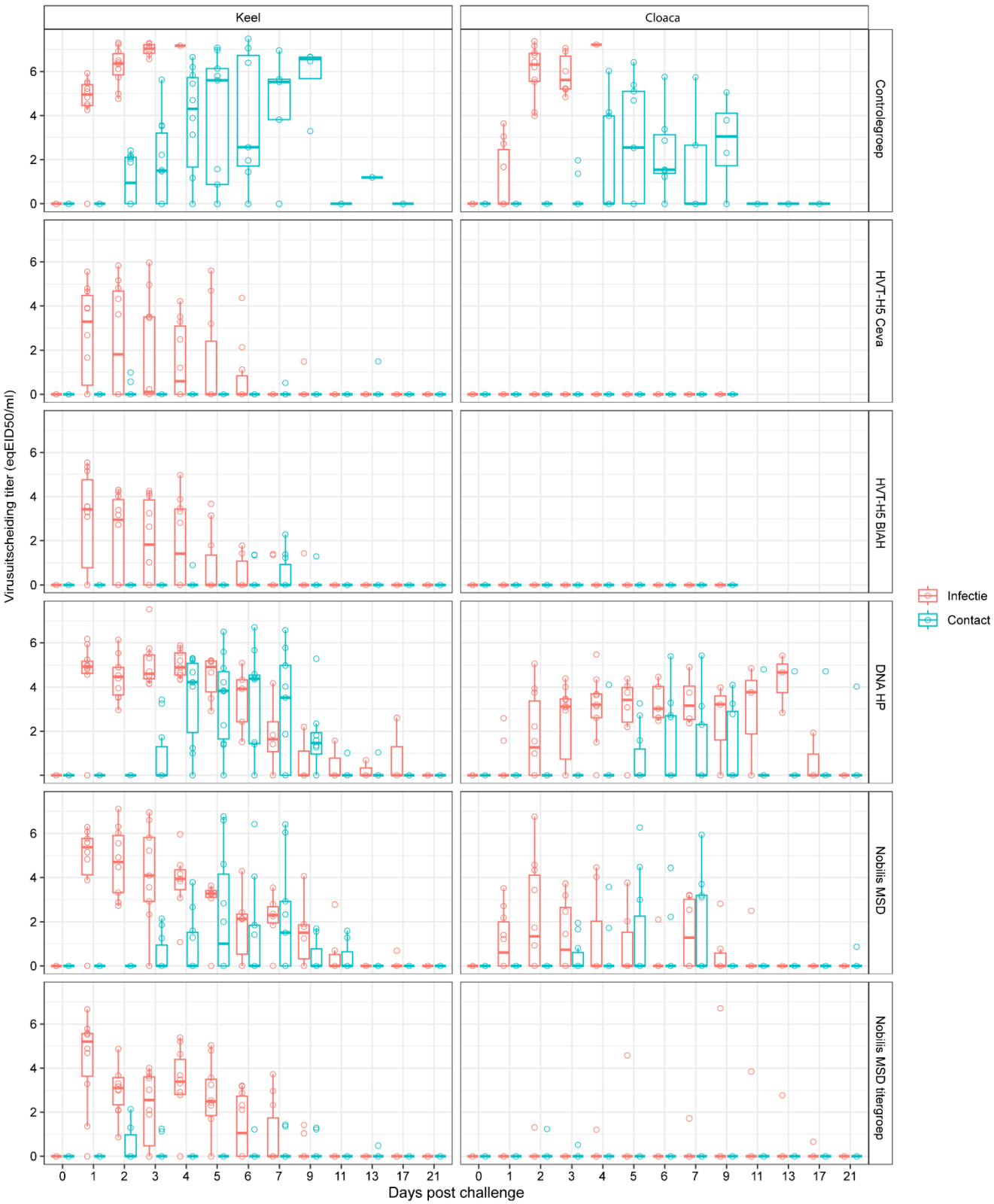
Wanneer de resultaten van de NP-ELISA, HAR test en M-PCR samen worden genomen kan er worden gedefinieerd of kippen geïnfecteerd zijn geraakt. Een kip is geïnfecteerd bij een positieve NP-ELISA uitslag, een toename van ≥3 van de HAR-titer én ≥2 dagen virusuitscheiding (titer ≥1,7). Figuur 6 toont het aantal geïnfecteerde kippen per groep. In de controlegroepen zijn 20/20 kippen geïnfecteerd. Na vaccinatie met het HVT-H5 vaccin van Ceva en BIAH raakten respectievelijk 5/10 en 6/10 infectiedieren geïnfecteerd, maar infectie van de contactdieren werd niet aangetoond. In de groepen 'DNA HP' en 'Nobilis MSD' maakte alle infectiedieren (10/10) een infectie door na toediening van het HPAI H5N1 virus. Ook raakten respectievelijk 7/10 en 5/10 contactdieren geïnfecteerd. In de 'Nobilis MSD titergroep' raakten alle infectiedieren geïnfecteerd, maar in de contactdieren is geen infectie aangetoond.



Figuur 6 *Het aantal kippen dat een infectie heeft doorgemaakt op basis van de NP-ELISA, de HAR en de M-PCR resultaten. Een kip is geïnfecteerd bij een positieve NP-ELISA uitslag, een toename van ≥3 van de HAR-titer en ≥2 dagen virusuitscheiding (titer ≥1,7).*

4.3.5 Kwantificatie van virusuitscheiding na infectie

De virusuitscheiding werd verder gekwantificeerd en de gemeten titers staan weergegeven in Figuur 7. In het figuur is te zien dat virusuitscheiding via de keel hoger is dan via de cloaca. Wanneer contactdieren geïnfecteerd raken en virus gaan uitscheiden is dit enkele dagen na de eerste dag van virusuitscheiding van de infectiedieren. In de controlegroepen A en B was de piek van de virusuitscheiding hoog (maximale titer is 7,3). In de HVT-H5 Ceva groep hebben de infectiedieren virus uitgescheiden via de keel, maar er werd geen virusuitscheiding gemeten voor de contactdieren. Voor zowel de infectie- als de contactdieren werd geen virusuitscheiding via de cloaca gemeten. In de HVT-H5 BIAH groepen is er één of enkele dagen via de keel virus uitgescheiden, maar cloacaal is er geen virus uitgescheiden. Ook voor de contactdieren werd geen virusuitscheiding gemeten, m.u.v. 1 waarneming van een contactdier (titer 2,3 op dag 7) in de keel. In de groep DNA HP werd in zowel infectiedieren als contactdieren virusuitscheiding gemeten via de keel en cloaca. In de groep 'Nobilis MSD' werd virusuitscheiding gemeten in de keel en cloaca van infectiedieren. In subgroep A werd wel virusuitscheiding gemeten voor de contactdieren, maar in subgroep B niet. In de laatste groep, 'Nobilis MSD titergroep', hebben alle infectiedieren virus uitgescheiden via de keel, maar 1 infectiedier in de cloaca. In beide 'Nobilis MSD titergroepen' is virusuitscheiding gemeten in de keel van infectiedieren, maar de contactdieren hebben geen virus uitgescheiden.



Figuur 7 *De titer van de virusuitscheiding (eqEID50/ml) van de infectiedieren (rood) en contactdieren (blauw) gemeten in keel- en cloaca swabs. Per groep zijn de subgroepen A en B samen weergegeven in één figuur. De detectielimiet van de PCR is 1.7, en titers ≤1.7 worden als negatief beschouwd.*

De virusuitscheiding is geanalyseerd waarbij de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding, de totale hoeveelheid uitgescheiden virus (AUC) en de duur van de virusuitscheiding is bepaald voor de verschillende groepen (Tabel 5). Alle kippen van de controlegroep hebben virus uitgescheiden. Daardoor is de waarschijnlijkheid dus 1. De waarschijnlijkheid van virusuitscheiding via de keel is in de 'HVT-H5 Ceva', 'HVT-H5 BI' en 'Nobilis MSD titergroep' significant lager t.o.v. de controlegroep. In de cloaca is de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding voor beide HVT-H5 vaccins 0, omdat er geen virus is uitgescheiden. In alle groepen, m.u.v. 'DNA HP' en voor de keel virusuitscheiding van 'Nobilis MSD', is de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding significant lager dan voor de controlegroep. Wanneer we kijken naar de hoeveelheid virusuitscheiding valt op dat deze in alle vaccingroepen significant lager is dan in de controlegroep, met uitzondering van de cloaca van groep 'Nobilis MSD titergroep'. Bijvoorbeeld in de keel wordt er in de HVT-H5 Ceva groep 5,11 log 10 virus uitgescheiden, terwijl in de controlegroep 7,05 log 10 virus wordt uitgescheiden. Er is geen cloacale virusuitscheiding in de HVT-H5 Ceva en BIAH groepen. Daardoor is de AUC 0 log 10 en is er geen significantie berekend voor deze groepen. De gemiddelde duur van de virusuitscheiding is in de controlegroep 3 dagen. Dit is relatief kort, omdat de kippen snel komen te overlijden. In de andere groepen is dit maximaal 1-2 dagen langer. Alleen in de groep 'Nobilis MSD' is de virusuitscheiding significant langer t.o.v. de controlegroep.

Tabel 5 *De waarschijnlijkheid van virusuitscheiding (wel/geen virusuitscheiding), de totale hoeveelheid uitgescheiden virus (in AUC Log 10) en de gemiddelde duur van virusuitscheiding in keel en cloaca in dagen.*

	Groep	Waarschijnlijkheid virusuitscheiding (95% BI)		Totale virusuitscheiding in AUC Log 10 (95% BI)		Gemiddelde duur
		Keel	Cloaca	Keel	Cloaca	virus-uitscheiding (95% BI) in dagen
1	Controlegroep	1 (0,84-1,00)	0,95 (0,72-0,99)	7,05 (6,52-7,59)	6,02 (5,45-6,59)	3 (3-5)
2	HVT-H5 Ceva A en B	0,30 (0,14-0,53)[a]	0 (0-0,16)[a]	5,11 (4,27-5,96)[a]	0	4 (3-NA)
3	HVT-H5 BIAH A en B	0,40 (0,21-0,62)[a]	0 (0-0,16)[a]	4,59 (3,86-5,33)[a]	0	4 (3-6)
4	DNA HP A en B	0,90 (0,68-0,97)	0,75 (0,52-0,89)	6,02 (5,48-6,57)[a]	4,82 (4,24-5,41)[a]	5 (4-6)
5	Nobilis MSD A en B	0,75 (0,52-0,89)	0,60 (0,38-0,79)[a]	5,82 (5,25-6,38)[a]	4,52 (3,85-5,19)[a]	5 (4-7)[a]
6	Nobilis MSD titergroep A en B	0,60 (0,38-0,79)[a]	0,05 (0,01-0,28)[a]	4,69 (4,09-5,30)[a]	7,02 (4,90-9,14)	4 (3-6)

[a] significant (p<0,05) t.o.v. controlegroep

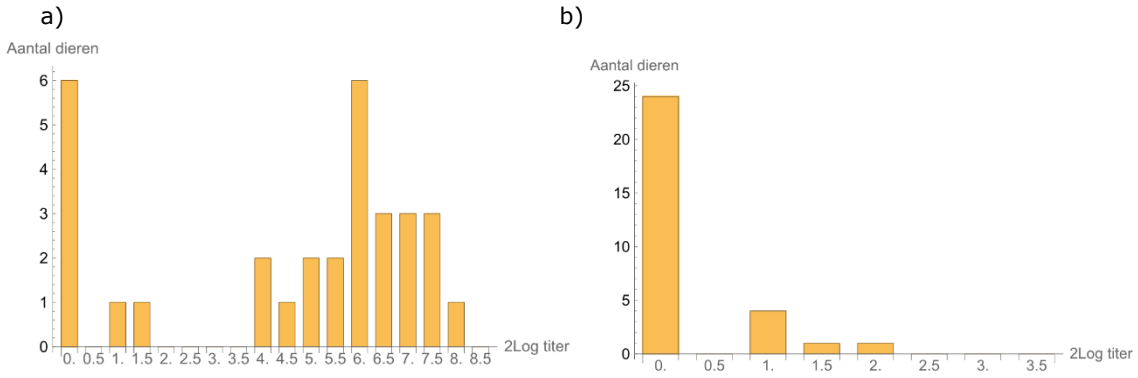
NA: not applicable (niet toepasbaar); BI: 95% betrouwbaarheidsinterval

De resultaten laten zien dat beide HVT-H5 vaccins virusuitscheiding via de cloaca geheel voorkomen en de waarschijnlijkheid en hoeveelheid van virusuitscheiding via de keel ten opzichte van de controlegroep ook significant verminderen. Voor het DNA-vaccin en het Nobilis vaccin wordt echter geen significante vermindering van de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding gemeten, met uitzondering van de uitscheiding via de cloaca voor het Nobilis vaccin. Er is wel een significante vermindering in de hoeveelheid virusuitscheiding voor deze vaccins met uitzondering van de 'Nobilis MSD titergroep'.

4.3.6 Correlates of protection

Om te onderzoeken in hoeverre de hoogte en de verdeling van HAR-titers samenhangt met virustransmissie is voor het Nobilis vaccin onderzocht of HAR-titers ook een goede 'correlates of protection' is op het gebeid van het tegengaan van virustransmissie. Het vaccinatie effect, als functie van de samenstelling van de groep uitgedrukt in HAR-titer, is berekend met behulp van de controlegroep, de 'Nobilis MSD groep' en de 'Nobilis MSD titergroep'. In Figuur 8 is de verdeling van de HAR-titers van dag 42 van de 20 dieren van 'Nobilis MSD groep' en 10 infectiedieren van de 'Nobilis MSD titergroep' weergegeven. De meeste heterologe titers zijn 0, daarom is er voor de analyse gekozen voor de homologe HAR-titers. Op basis van de verdeling van de homologe HAR-titers (Figuur 8) zijn alle mogelijke verschillende afkapwaarden voor de scheiding tussen hoge en lage titers (≤0, ≤1, ≤4, ≤4,5 en ≤5) gekozen. Vervolgens is voor de verschillende afkapwaarden het reproductiegetal berekend (Tabel 6). Hieruit bleek dat er geen groot verschil zit tussen de berekende R als er een andere afkapwaarde wordt gekozen voor de scheiding lage/hoge HAR-titers. Elk dier met een andere titer heeft een eigen R, maar die kunnen op basis van deze experimenten niet geschat worden, omdat we niet voldoende waarnemingen hebben van dieren met één bepaalde titer. In alle schattingen met de verschillende

afkapwaarden is het verschil in R tussen de hoge en lage titer groep uitsluitend het gevolg van een reductie in infectiviteit door virustransmissie. Dit komt uit de statistische analyse van de virustransmissie waar in het volledige 'interval data-model' zowel een effect voor vatbaarheid als ook voor besmettelijkheid zit.



Figuur 8 *Ten behoeve van het berekenen van de vaccineffectiviteit, waarbij rekening wordt gehouden met verschillen in immuunrespons is de verdeling van de a) homologe; b) heterologe HAR-titers van de gevaccineerde dieren van de 'Nobilis MSD groep' en de 'Nobilis MSD titergroep' weergegeven. Op basis van deze verdeling zijn de categorieën voor de analyse gekozen.*

Tabel 6 *De verdeling (%) van het aantal hoge HAR-titers van dag 42 van de infectiedieren per groep bij de verschillende categorieën.*

Groep		Virusverspreiding	≤0		≤1		≤4		≤4,5		≤5	
			Totaal	Infectie dieren	Totaal	Infectie dieren	Totaal	Infectie dieren	Totaal	Infectie dieren	Totaal	Infectie dieren
1	Controle A	Ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1	Controle B	Ja	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	Nobilis MSD A	Ja	60	60	50	60	40	60	30	40	20	20
5	Nobilis MSD B	Nee	80	80	80	80	70	60	70	60	70	60
6	Nobilis MSD titergroep A	Nee	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100
6	Nobilis MSD titergroep B	Nee	50	100	50	100	50	100	50	100	50	100

Zoals eerder vermeld in Tabel 1 is de antigene afstand van het Nobilis vaccin tot het challengevirus 5,71. Daarom is er gekozen voor de afkapwaarde van 5 als uitgangspunt. Voor een hoog/laag verdeling met een afkapwaarde van 5 is vervolgens het percentage kippen dat een HAR-titer >5 moet hebben om R<1 te hebben berekend. Uit berekeningen met afkapwaarden van HAR-titer 5 komt dat 76% van de dieren een homologe HAR-titer >5 moet hebben om R<1 te laten zijn. In de controlegroep A en B en 'Nobilis MSD groep A' was er virustransmissie naar de contactdieren. In deze groepen had slechts 0% of 20% (bij de Nobilis MSD groep A) een HAR-titer >5. Dit verklaart de virustransmissie in deze groepen. In de andere drie groepen 'Nobilis MSD B', 'Nobilis MSD titergroep A' en 'Nobilis MSD titergroep B' was er geen virustransmissie. Het percentage infectiedieren met een HAR-titer >5 was in deze groepen respectievelijk 60%, 100% en 100%. Deze percentages zijn hoger dan in de groepen met virustransmissie, echter voor 1 van de 3 groepen was dit toch lager dan de berekende noodzakelijke 76%. Deze 'Nobilis MSD groep B' heeft een R=1,55 (0,4 x 3,57 + 0,6 x 0,2 = 1,55; zie Tabel 7). Dit betekent dat wanneer één dier wordt geïnoculeerd de kans op geen virustransmissie (een kleine uitbraak) 0,65 is. Echter, in de transmissiestudie zijn 5 kippen geïnoculeerd, daardoor is de kans op geen virustransmissie $(0,65)^5$=0,113, maar dit is niet significant (p>0,05). Daardoor wordt R>1 niet verworpen terwijl er toch geen virustransmissie in deze subgroep geobserveerd werd.

Tabel 7 *Het reproductiegetal (R) voor de lage en hoge HAR-titers berekend bij alle afkapwaarden.*

Cut-off	Laag/hoog HAR-titers	R	Benodigde percentage hoge titer dieren voor R<1 (met 95% betrouwbaarheidsinterval)
≤0	Laag	3,77	83% (68% - 98%)
>0	Hoog	0,44	
≤1	Laag	3,70	83% (68% - 97%)
>1	Hoog	0,43	
≤4	Laag	3,63	81% (67% - 96%)
>4	Hoog	0,40	
≤4,5	Laag	3,84	81% (66% - 96%)
>4,5	Hoog	0,31	
≤5	Laag	3,57	76% (62% - 91%)
>5	Hoog	0,20	

Als sensitiviteitsanalyse werd de analyse herhaald zonder de 'Nobilis MSD titergroep'. Er werden vergelijkbare resultaten verkregen als in bovenstaande analyse (gegevens niet getoond).

Deze analyse laat zien dat de verdeling van het aantal beschermde dieren in een populatie is gecorreleerd aan de virustransmissie. De HAR-titers lijken onder experimentele omstandigheden een goede maat voor bescherming ('correlates of protection') te zijn op het gebied van virustransmissie voor het Nobilis vaccin. Voor de nieuwe typen vaccins, die ook cellulaire immuniteit opwekken, en voor de lange termijn onder veldomstandigheden, kunnen op basis van deze studie geen uitspraken gedaan worden.

Het niet optreden van virustransmissie in de 'Nobilis MSD titergroepen' waarbij alleen de infectiedieren zijn gevaccineerd ondersteunt de transmissie rate parameter β schatting. Het niet optreden van virustransmissie wanneer de contactdieren niet zijn gevaccineerd komt overeen met de conclusie van Sitaras, *et al.* (2016) over een ander HPAI H5N1 virus, namelijk dat de vaccineffectiviteit in het verminderen van virustransmissie door vaccinatie alleen komt door vermindering in besmettelijkheid van de gevaccineerde kippen [19]. In bijlage 3 wordt de analyse weergegeven.

4.4 Conclusie

In deze dierstudie zijn drie geselecteerde vaccins tegen HPAI H5 vogelgriepvirus getest in een transmissiestudie met opfokleghennen. Het betreft het HVT-H5 vaccin (Vectormune) van Ceva, het HVT-H5 COBRA vaccin van Boehringer Ingelheim (BIAH) en het DNA H5 vaccin van Huvepharma (HP). Daarnaast werd het Nobilis H5N2 vaccin van MSD Animal Health (MSD) getest als vierde vaccin in de dierstudie, omdat dit tot op dit moment het enige in Nederland geregistreerde vogelgriepvaccin is. Dit geïnactiveerde vaccin voldoet echter niet aan het DIVA-principe en heeft een grote antigene afstand tot het huidige HPAI H5N1 virus dat nu in Nederland circuleert. Er werden voor elk vaccin 10 opfokleghennen eenmalig gevaccineerd, waarna 5 van deze kippen op 8 weken leeftijd werden geïnfecteerd met het huidige HPAI H5N1 virus (clade 2.3.4.4b). De overige 5 kippen, de contactdieren, werden niet geïnfecteerd, zodat kon worden onderzocht of er virustransmissie is van de infectiedieren naar de contactdieren. Voor elk vaccin werd dit experiment in tweevoud uitgevoerd. Daarnaast werd er een additionele Nobilis titergroep getest, waarin de infectiedieren na vaccinatie werden geselecteerd op de aanwezigheid van antilichamen, terwijl de contactdieren ongevaccineerd waren.

De resultaten laten zien dat beide HVT-H5 vaccins virustransmissie in het experiment voorkwamen. De berekende reproductiegetallen (R) voor beide HVT-H5 vaccingroepen waren in dit experiment 0 (95% betrouwbaarheidsinterval (BI) 0-0,70) en daarmee significant lager dan in de controlegroep waarin wel virustransmissie optrad en het reproductiegetal 3,64 (95% BI 1,89-6,99) was. Virustransmissie werd voorkomen in één van de twee Nobilis groepen, maar in geen van de 'DNA HP' groepen. Voor zowel het DNA-vaccin als het Nobilis vaccin ligt de berekende R niet significant onder de 1, respectievelijk 1,89 (95% BI 0,55-5,22) en 1,48 (95% BI 0,30-3,44), volgens de 'final size' methode. In de Nobilis groep werd voor een deel van de infectiedieren geen antilichaamrespons gemeten. Wanneer er werd geselecteerd voor dieren met een antilichaamtiter in de "Nobilis MSD titergroep" dan werd er geen virustransmissie gezien.

De dierstudie laat verder zien dat beide HVT-H5 vaccins 100% effectief zijn in het reduceren van ziekte en sterfte na infectie met het HPAI H5N1 virus. Na vaccinatie met het DNA-vaccin was er 70% sterfte van de infectiedieren en 40% sterfte van de contactdieren na infectie. Ook zijn er ziekteverschijnselen geobserveerd in overlevende dieren. Na toediening van het Nobilis vaccin werd 40% sterfte van de infectiedieren en 30% sterfte van de contactdieren gezien. De sterfte bij de contactdieren in de Nobilis groep was alleen in de groep waar transmissie optrad en niet in de groep waar geen transmissie optrad. Ook was de waarschijnlijkheid van virusuitscheiding en de hoeveelheid virusuitscheiding door de gevaccineerde infectiedieren met de HVT-H5 vaccins significant minder dan werd gemeten in de ongevaccineerde controlegroep. De waarschijnlijkheid van virusuitscheiding van de kippen die het DNA-vaccin hebben gekregen was niet lager dan voor de controlegroep, maar de hoeveelheid virus die was uitgescheiden was wel significant lager. De waarschijnlijkheid van virusuitscheiding na vaccinatie met het Nobilis vaccin was in de cloaca significant verminderd t.o.v. de controlegroep, maar in de keel was dit verschil niet significant. Na vaccinatie met het Nobilis vaccin van MSD was de hoeveelheid virusuitscheiding significant minder dan die van de ongevaccineerde controlegroep. Dus ondanks dat de antigene afstand van het Nobilis vaccin tot het huidige HPAI H5 clade 2.3.4.4b virus relatief groot is, was het vaccin ook voor dit aspect toch deels effectief.

Tot slot werd in de transmissiestudie geïllustreerd dat de HAR-titers onder experimentele omstandigheden een goede maat voor bescherming (‘ook wel ‘correlates of protection’ genoemd) zijn op het gebied van virustransmissie voor het Nobilis vaccin. Voor de nieuwe typen vaccins, die ook cellulaire immuniteit opwekken, en voor de lange termijn onder veldomstandigheden, kunnen op basis van deze studie geen uitspraken gedaan worden.

4.5 Discussie

In deze dierstudie waren de HVT-H5 vaccins effectief in het voorkomen van virustransmissie. Het DNA-vaccin van HP heeft virustransmissie van infectiedieren naar de contactdieren niet voorkomen. In eerdere, door de farmaceut uitgevoerde, dierstudies was dit vaccin na enkelvoudige toediening in kippen van dezelfde leeftijd effectief in het voorkomen of reduceren van ziekteverschijnselen en in het verminderen van virusuitscheiding (publicatie wordt op dit moment geschreven). Het Nobilis vaccin van MSD heeft bij een volledige dosis in groep B en de titerselectiegroepen de virustransmissie van de infectiedieren naar de contactdieren voorkomen. Onder experimentele omstandigheden waren de HVT-H5 vaccins (en het Nobilis vaccin deels) effectief in het voorkomen van virustransmissie. Om vaccins in de praktijk te kunnen inzetten, moeten vaccins voldoen aan de minimale eisen die worden gesteld door de World Organisation for Animal Health (WOAH). In de Terrestrial manual voor vogelgriep staan de richtlijnen opgenomen waaraan een vaccin moet voldoen voordat dit kan worden goedgekeurd voor gebruik in pluimvee [10]:

(i) Vaccins moeten worden getest door na vaccinatie kippen experimenteel te infecteren (> 3 weken na vaccinatie) met een dosis van 10^6 EID_{50}. Minimaal 80% van de gevaccineerde kippen moet deze infectie overleven. In deze transmissiestudie zijn de kippen minimaal 6 weken na vaccinatie geïnfecteerd met een dosis van 10^6 EID_{50} van het HPAI H5N1 virus. De HVT-H5 vaccins voldoen beiden aan de gestelde WOAH eis, maar het DNA-vaccin en het Nobilis vaccin voldoen hier niet aan. Mogelijk kan dit met een tweede toediening van hetzelfde, of een ander type vaccin (booster) wel bereikt worden. Dit is eerder aangetoond bij andere vaccins, bijvoorbeeld het experimentele DNA-vaccin beschreven door Hussein, *et al.* (2016). Dit vaccin gaf na eenmalige toediening geen HAR-titers en geen bescherming tegen sterfte. Echter, na een booster met het Volvac B.E.S.T vaccin (BIAH) waren de HAR-titers hoger en was er 80% bescherming tegen sterfte [56].

(ii) de HAR-titers in het veld moeten minimaal 5 zijn om tegen sterfte te beschermen en minimaal 7 zijn om virusuitscheiding te reduceren. In deze dierstudie werden de HAR-titers voor infectie bepaald op dag 42. Het HVT-H5 vaccin van Ceva voldoet aan de eis met een gemiddelde homologe titer van 7,68. Het HVT-H5 vaccin van BIAH voldoet net niet aan de eis met een gemiddelde homologe titer van 6,05. Echter, voor dit vaccin kon er niet 100% homoloog getest worden in de HAR, omdat er geen exact homoloog antigeen beschikbaar was. Er werd getest met een veldvirus dat genetisch zeer nauw verwant is, maar mogelijk is er wel een klein antigeen verschil waardoor de homologe titer in werkelijkheid hoger kan liggen. De homologe titers voor het DNA en het Nobilis vaccin waren gemiddeld 3,80 en 0,25 respectievelijk en voldoen daarmee niet aan de

gestelde WOAH eis. Er moet worden opgemerkt dat de HAR-titers zijn bepaald in een dierexperiment en niet in het veld zoals de WOAH voorschrijft. De HAR-titers die bereikt worden bij vaccinatie in het veld zijn mogelijk lager dan de HAR-titers die zijn behaald in deze dierstudie. In de dierstudie werd ook bij lagere HAR-titers al een significante vermindering van transmissie, virusuitscheiding en sterfte gezien. De resultaten van deze dierstudie wijken hiermee af van een eerdere transmissiestudie die werd uitgevoerd [19] en moeten in vervolgstudies nader bestudeerd worden. Naast bovengenoemde eisen vanuit de WOAH, moet het vanuit de EU-richtlijnen mogelijk zijn om een infectie met veldvirus in gevaccineerde dieren aan te kunnen tonen. Een DIVA-principe is dus noodzakelijk om met specifieke diagnostiek dit onderscheid te kunnen maken. Zowel de HVT-vaccins als het DNA-vaccin voldoen aan het DIVA-principe, maar dit geldt niet voor het Nobilis vaccin.

Beide HVT-H5 vaccins voldoen aan de door de onderzoekers gestelde voorwaarden. De vaccins voorkwamen virustransmissie en boden volledige bescherming tegen sterfte en ziekteverschijnselen na infectie met het HPAI H5N1 virus. De vaccins voldoen aan het DIVA-principe en massa-applicatie is mogelijk, want de HVT-H5 vaccins kunnen per injectie of *in ovo* worden toegediend in de broederij. Echter, dit type vector-vaccin is alleen werkzaam in kippen en kalkoenen. Verder onderzoek moet uitwijzen hoe verschillende vaccins enkelvoudig, of eventueel in combinatie met een booster, presteren onder veldomstandigheden en wat de duur van de bescherming is. HVT-H5 vaccins zijn gebaseerd op een herpesvirus, waardoor deze mogelijk levenslang antilichamen opwekken tegen het vogelgriepvirus. Echter, vaccinatieprogramma's waarbij een booster wordt gegeven met een ander type vaccin kunnen worden overwogen, want in de praktijk blijken boosters met een ander type vaccin noodzakelijk om voldoende bescherming te behouden voor langere termijn bij HVT-vector-vaccins tegen andere ziekten.

Om HVT-H5 vaccins te kunnen opnemen in het vaccinatieprogramma moet wel rekening worden gehouden met andere HVT-vector-vaccins die al worden toegediend aan legkippen of de ouderdieren (tegen bijv. Marek, IBD, ILT en NDV). Wanneer twee vaccins op basis van een HVT-vector aan hetzelfde dier worden gegeven, en dit geldt mogelijk ook als het aan de moederdieren is gegeven, kunnen de vaccins met elkaar interfereren waardoor de effectiviteit kan verminderen. Vaccinprogramma's moeten dus zodanig worden opgesteld dat deze slechts eenmalig een HVT-vector-vaccin bevatten. Ook is nader onderzoek naar de (cellulaire) immuunrespons noodzakelijk om voldoende inzicht te krijgen in de correlatie tussen de gemeten immunologische waarden en de bescherming van de koppels van kippen tegen virustransmissie. Met name ook op lange termijn en onder veldomstandigheden. Deze informatie is vanuit de EU-richtlijnen noodzakelijk voor het inrichten van een effectief monitoring- en surveillance programma, welke een voorwaarde zijn voor het implementeren van een vaccinatieprogramma tegen vogelgriep. Kortom, additioneel onderzoek wordt aanbevolen alvorens er gestart kan worden met vaccineren van pluimvee tegen vogelgriep in Nederland. Tot slot, moeten de vaccins door de farmaceuten worden geregistreerd voordat deze kunnen worden toegediend aan pluimvee in Nederland.

Literatuur

1. Bouwstra, R.J.K., G.; Heutink, R.; Harders, F.; van der Spek, A.; Elbers, A.R; Bossers, A. *Phylogenetic analysis of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus outbreak strains provides evidence for four separate introductions and one between-poultry farm transmission in the Netherlands, November 2014*. 2015.
2. Beerens, N., et al., *Multiple Reassorted Viruses as Cause of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Epidemic, the Netherlands, 2016.* Emerging Infectious Disease journal, 2017. **23**(12): p. 1974-1981.
3. Beerens, N., et al., *Genetic relationship between poultry and wild bird viruses during the highly pathogenic avian influenza H5N6 epidemic in the Netherlands, 2017-2018.* Transboundary and Emerging Diseases, 2019.
4. WBVR. *Vogelgriep bij pluimvee in 2020/2021*. Available from: https://www.wur.nl/nl/Onderzoek-Resultaten/Onderzoeksinstituten/Bioveterinary-Research/show-bvr/Vogelgriep-bij-pluimveebedrijven.htm.
5. ISZVE. *Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) in Europe*. 2022; Available from: https://www.izsvenezie.com/reference-laboratories/avian-influenza-newcastle-disease/europe-update/.
6. Agrimate. *Pluimveesector*. 2022; Available from: https://www.agrimatie.nl/SectorResultaat.aspx?subpubID=2232&sectorID=2249&themaID=2286.
7. CBS. *Pluimveesector*. 2022; Available from: https://opendata.cbs.nl/statline/#/CBS/nl/dataset/80780ned/table?dl=2E119.
8. EU. *Gedelegeerde Verordening (EU) 2020/687 van de Commissie van 17 december 2019 tot aanvulling van Verordening (EU) 2016/429 van het Europees Parlement en de Raad wat regels voor de preventie en bestrijding van bepaalde in de lijst opgenomen ziekten betreft*. 2021; Available from: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/nl/TXT/?uri=CELEX%3A32020R0687.
9. Rijksoverheid. *Ophokplicht voor vogelgriep wordt gedeeltelijk ingetrokken*. 2022; Available from: https://www.rijksoverheid.nl/onderwerpen/vogelgriep/nieuws/2022/06/28/ophokplicht-voor-vogelgriep-wordt-gedeeltelijk-ingetrokken.
10. WOAH. *Chapter 3.3.4 Avian Influenza (Including infection with High Pathogenic Avian Influenza Viruses)*. 2021; Available from: https://www.woah.org/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.03.04_AI.pdf.
11. EUR-Lex. *Uivoeringsverordening (EU) 2018/1882*. 2018; Available from: https://eur-lex.europa.eu/legal-content/NL/TXT/?uri=CELEX%3A32018R1882.
12. European Commission. *Veterinary medicines & vaccines - conditions for use*. 2022; Available from: https://ec.europa.eu/info/law/better-regulation/have-your-say/initiatives/12173-Veterinary-medicines-vaccines-conditions-for-use_en.
13. European Medicines Agency. *Nobilis Influenza H5N2*. 2022; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/nobilis-influenza-h5n2.
14. European Medicines Agency. *Poulvac Fluefend H5N3 RG*. 2022; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/poulvac-flufend-h5n3-rg.
15. European Medicines Agency. *Nobilis Influenza H5N6*. 2022; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/EPAR/nobilis-influenza-h5n6.
16. Suarez, D.L., *Influenza A virus*, in *Animal Influenza*, D.E. Swayne, Editor. 2017, John Wiley & Sons, Inc.: Iowa. p. 1-30.
17. Ma, Q.X., et al., *Subclinical highly pathogenic avian influenza virus infection among vaccinated chickens, China.* Emerg Infect Dis, 2014. **20**(12): p. 2152-4.
18. Rauw, F., et al., *Further evidence of antigenic drift and protective efficacy afforded by a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains.* Vaccine, 2011. **29**(14): p. 2590-2600.
19. Sitaras, I., et al., *Role of vaccination-induced immunity and antigenic distance in the transmission dynamics of highly pathogenic avian influenza H5N1.* J R Soc Interface, 2016. **13**(114): p. 20150976.
20. Peeters, B., et al., *Genetic versus antigenic differences among highly pathogenic H5N1 avian influenza A viruses: Consequences for vaccine strain selection.* Virology, 2017. **503**: p. 83-93.
21. Chen, X., et al., *Host Immune Response to Influenza A Virus Infection.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 320.
22. Swayne, D.E. and D.R. Kapczynski, *Vaccines and vaccination for avian influenza in poultry*, in *Animal Influenza*. 2016. p. 378-434.
23. Reemers, S., et al., *A broad spectrum HVT-H5 avian influenza vector vaccine which induces a rapid onset of immunity.* Vaccine, 2021. **39**(7): p. 1072-1079.

24. Kim, S.H. and S.K. Samal, *Innovation in Newcastle Disease Virus Vectored Avian Influenza Vaccines.* Viruses, 2019. **11**(3).
25. Rauw, F., et al., *Efficacy of rHVT-AI vector vaccine in broilers with passive immunity against challenge with two antigenically divergent Egyptian clade 2.2.1 HPAI H5N1 strains.* Avian Dis, 2012. **56**(4 Suppl): p. 913-22.
26. Saczynska, V., et al., *A novel hemagglutinin protein produced in bacteria protects chickens against H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses by inducing H5 subtype-specific neutralizing antibodies.* PLoS ONE, 2017. **12**(2).
27. Germeraad, E.A., et al., *Virus Shedding of Avian Influenza in Poultry: A Systematic Review and Meta-Analysis.* Viruses, 2019. **11**(9).
28. Van Nes, A., et al., *Implications derived from a mathematical model for eradication of pseudorabies virus.* Prev Vet Med, 1998. **33**(1-4): p. 39-58.
29. Beerens, N., et al., *Comparative pathogenicity and environmental transmission of recent highly pathogenic avian influenza H5 viruses.* Emerg Microbes Infect, 2021. **10**(1): p. 97-108.
30. Elbers, A.R.W. and J.L. Gonzales, *Mortality Levels and Production Indicators for Suspicion of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Commercially Farmed Ducks.* Pathogens, 2021. **10**(11): p. 1498.
31. Lean, F.Z.X., et al., *Gross pathology associated with highly pathogenic avian influenza H5N8 and H5N1 in naturally infected birds in the UK (2020–2021).* Veterinary Record, 2022. **190**(1): p. e731.
32. Gardin, Y., et al., *Experimental and Field Results Regarding Immunity Induced by a Recombinant Turkey Herpesvirus H5 Vector Vaccine Against H5N1 and Other H5 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Challenges.* Avian Dis, 2016. **60**(1 Suppl): p. 232-7.
33. Tatár-Kis, T., et al., *A Herpesvirus of Turkey-Based Vector Vaccine Reduces Transmission of Newcastle Disease Virus in Commercial Broiler Chickens with Maternally Derived Antibodies.* Vaccines (Basel), 2020. **8**(4).
34. van Boven, M., et al., *Herd immunity to Newcastle disease virus in poultry by vaccination.* Avian Pathol, 2008. **37**(1): p. 1-5.
35. Kwon, J.-H., et al., *Efficacy of two vaccines against recent emergent antigenic variants of clade 2.3.2.1a highly pathogenic avian influenza viruses in Bangladesh.* Vaccine, 2021. **39**(21): p. 2824-2832.
36. Reemers, S.S., et al., *Identification of novel avian influenza virus derived CD8+ T-cell epitopes.* PLoS One, 2012. **7**(2): p. e31953.
37. Ariaans, M.P., et al., *ELISPOT and intracellular cytokine staining: Novel assays for quantifying T cell responses in the chicken.* Developmental & Comparative Immunology, 2008. **32**(11): p. 1398-1404.
38. Seliger, C., et al., *A rapid high-precision flow cytometry based technique for total white blood cell counting in chickens.* Vet Immunol Immunopathol, 2012. **145**(1-2): p. 86-99.
39. Poetri, O.N., et al., *Silent spread of highly pathogenic Avian Influenza H5N1 virus amongst vaccinated commercial layers.* Res Vet Sci, 2014. **97**(3): p. 637-41.
40. Gobbo, F., et al., *Silent Infection of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1) Clade 2.3.4.4b in a Commercial Chicken Broiler Flock in Italy.* Viruses, 2022. **14**(8).
41. Tarigan, S., et al., *Field effectiveness of highly pathogenic avian influenza H5N1 vaccination in commercial layers in Indonesia.* PLOS ONE, 2018. **13**(1): p. e0190947.
42. Bouma, A., et al., *Estimation of transmission parameters of H5N1 avian influenza virus in chickens.* PLoS Pathog, 2009. **5**(1): p. e1000281.
43. Pantin-Jackwood, M.J., et al., *Efficacy of a Recombinant Turkey Herpesvirus H5 Vaccine Against Challenge With H5N1 Clades 1.1.2 and 2.3.2.1 Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Domestic Ducks (Anas platyrhynchos domesticus).* Avian Diseases, 2016. **60**(1): p. 22-32.
44. Liu, J., et al., *Recombinant duck enteritis virus works as a single-dose vaccine in broilers providing rapid protection against H5N1 influenza infection.* Antiviral Res, 2013. **97**(3): p. 329-33.
45. Schat, K.A.B., Kaspers, *Practical Aspects of Poultry Vacccination*, in *Avian Immunology*. 2014, Elsevier Science & Technology. p. 345-362.
46. Maas, R., et al., *Maternal immunity against avian influenza H5N1 in chickens: limited protection and interference with vaccine efficacy.* Avian Pathol, 2011. **40**(1): p. 87-92.
47. Soejoedono, R.D., et al., *Efficacy of a recombinant HVT-H5 vaccine against challenge with two genetically divergent Indonesian HPAI H5N1 strains.* Avian Dis, 2012. **56**(4 Suppl): p. 923-7.
48. Bertran, K., et al., *Maternal antibody inhibition of recombinant Newcastle disease virus vectored vaccine in a primary or booster avian influenza vaccination program of broiler chickens.* Vaccine, 2018. **36**(43): p. 6361-6372.
49. Rauw, F., et al., *Effectiveness of a Simultaneous rHVT-F(ND) and rHVT-H5(AI) Vaccination of Day-Old Chickens and the Influence of NDV- and AIV-Specific MDA on Immune Response and Conferred Protection.* Vaccines (Basel), 2020. **8**(3).

50. CBG-MEB. *Diergeneesmiddeleninformatiebank*. 2022; Available from: https://www.cbg-meb.nl/.
51. Nigist Birhane, H.F., *Vaccine Failure in Poultry Production and its Control Methods: A Review.* Biomedical Journal of Scientific & Technical Research, 2020. **29 (4)**: p. 22588-22596.
52. Entrican, G. and M.J. Francis, *Applications of platform technologies in veterinary vaccinology and the benefits for one health.* Vaccine, 2022. **40**(20): p. 2833-2840.
53. Rauw, F., et al., *Effectiveness of a Simultaneous rHVT-F(ND) and rHVT-H5(AI) Vaccination of Day-Old Chickens and the Influence of NDV- and AIV-Specific MDA on Immune Response and Conferred Protection.* Vaccines, 2020. **8**(3): p. 536.
54. Abd El-Hamid, H., et al., *The Combined Use of rHVT-H5 and rHVT-F Vector Vaccines in the Hatchery Enhances Immunity against Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 and Velogenic Newcastle Disease Viral Infections in Commercial Chickens.* Poultry Science Journal, 2018. **6**(2): p. 165-171.
55. Kilany, W.H., et al., *Comparison of the effectiveness of rHVT-H5, inactivated H5 and rHVT-H5 with inactivated H5 prime/boost vaccination regimes in commercial broiler chickens carrying MDAs against HPAI H5N1 clade 2.2.1 virus.* Avian Pathology, 2015. **44**(5): p. 333-341.
56. Hussein, H.A., et al., *Protective efficacy of a prime-boost protocol using H5-DNA plasmid as prime and inactivated H5N2 vaccine as the booster against the Egyptian avian influenza challenge virus.* Acta Virologica, 2016. **60**(3): p. 307-315.
57. Smith, G.J. and R.O. Donis, *Nomenclature updates resulting from the evolution of avian influenza A(H5) virus clades 2.1.3.2a, 2.2.1, and 2.3.4 during 2013-2014.* Influenza Other Respir Viruses, 2015. **9**(5): p. 271-6.
58. WHO, *Antigenic and genetic characteristics of zoonotic influenza A viruses and development of candidate vaccine viruses for pandemic preparedness*. March 2021.
59. Lee, E.-K., et al. *Characterization of a novel reassortant H5N6 highly pathogenic avian influenza virus clade 2.3.4.4 in Korea, 2017*. Emerging microbes & infections, 2018. **7**, 103 DOI: 10.1038/s41426-018-0104-3.
60. EMA. *Guideline on data requirements for vaccine platform technology master files (vPTMF)*. 2022; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/documents/scientific-guideline/guideline-data-requirements-vaccine-platform-technology-master-files-vptmf_en.pdf.
61. Ravikumar, R., J. Chan, and M. Prabakaran, *Vaccines against Major Poultry Viral Diseases: Strategies to Improve the Breadth and Protective Efficacy.* Viruses, 2022. **14**(6).
62. Swayne, D.E., et al., *Assessment of national strategies for control of high-pathogenicity avian influenza and low-pathogenicity notifiable avian influenza in poultry, with emphasis on vaccines and vaccination.* Rev Sci Tech, 2011. **30**(3): p. 839-70.
63. Kandeil, A., et al., *Efficacy of commercial vaccines against newly emerging avian influenza H5N8 virus in Egypt.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 9697.
64. El-Moeid, A.A., et al., *Discrepancies in the efficacy of H5 inactivated avian influenza vaccines in specific-pathogen-free chickens against challenge with the Egyptian H5N8 clade 2.3.4.4 Group B virus isolated in 2018.* Vet World, 2021. **14**(8): p. 2131-2141.
65. Ali, A., et al., *Combined H5ND inactivated vaccine protects chickens against challenge by different clades of highly pathogenic avian influenza viruses subtype H5 and virulent Newcastle disease virus.* Vet World, 2019. **12**(1): p. 97-105.
66. Hegazy, A.M.E., et al., *The potency of newly development H5N8 and H9N2 avian influenza vaccines against the isolated strains in laying hens from Egypt during 2019.* Saudi J Biol Sci, 2021. **28**(9): p. 5310-5316.
67. El-Husseiny, M.H., et al., *Evaluation of Protective Efficacy of Influenza Virus Like Particles Prepared from H5N1 Virus of Clade 2.2.1.2 in Chickens.* Vaccines (Basel), 2021. **9**(7).
68. Kang, Y.M., et al., *Single dose of multi-clade virus-like particle vaccine protects chickens against clade 2.3.2.1 and clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses.* Sci Rep, 2021. **11**(1): p. 13786.
69. Fuenmayor, J., F. Gòdia, and L. Cervera, *Production of virus-like particles for vaccines.* New Biotechnology, 2017. **39**: p. 174-180.
70. Sultan, H.A., et al., *Efficacy of Clade 2.3.2 H5-Recombinant Baculovirus Vaccine in Protecting Muscovy and Pekin Ducks from Clade 2.3.4.4 H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Infection.* Avian Dis, 2019. **63**(sp1): p. 219-229.
71. Tatár-Kis, T., et al., *Virus-Like Particle Based Vaccine Provides High Level of Protection Against Homologous H5N8 HPAIV Challenge in Mule and Pekin Duck, Including Prevention of Transmission.* Avian Diseases, 2018. **63**(sp1): p. 193-202, 10.
72. Pushko, P., et al., *Virus-like particles displaying H5, H7, H9 hemagglutinins and N1 neuraminidase elicit protective immunity to heterologous avian influenza viruses in chickens.* Virology, 2017. **501**: p. 176-182.
73. Kapczynski, D.R., et al., *Vaccination with virus-like particles containing H5 antigens from three H5N1 clades protects chickens from H5N1 and H5N8 influenza viruses.* Vaccine, 2016. **34**(13): p. 1575-81.

74. Wu, P., et al., *Single Dose of Consensus Hemagglutinin-Based Virus-Like Particles Vaccine Protects Chickens against Divergent H5 Subtype Influenza Viruses.* Front Immunol, 2017. **8**: p. 1649.
75. Basak, S., et al., *Influenza vaccine efficacy induced by orally administered recombinant baculoviruses.* PLoS One, 2020. **15**(5): p. e0233520.
76. van Hulten, M.C.W., et al., *Efficacy of a turkey herpesvirus double construct vaccine (HVT-ND-IBD) against challenge with different strains of Newcastle disease, infectious bursal disease and Marek's disease viruses.* Avian Pathol, 2021. **50**(1): p. 18-30.
77. Palya, V., et al., *Onset and long-term duration of immunity provided by a single vaccination with a turkey herpesvirus vector ND vaccine in commercial layers.* Vet Immunol Immunopathol, 2014. **158**(1-2): p. 105-15.
78. Reddy, S.K., et al., *Protective efficacy of a recombinant herpesvirus of turkeys as an in ovo vaccine against Newcastle and Marek's diseases in specific-pathogen-free chickens.* Vaccine, 1996. **14**(6): p. 469-77.
79. El-Shall, N.A., A.M. Awad, and M.E. Sedeik, *Examination of the protective efficacy of two avian influenza H5 vaccines against clade 2.3.4.4b H5N8 highly pathogenic avian influenza virus in commercial broilers.* Res Vet Sci, 2021. **140**: p. 125-133.
80. Palya, V., et al., *Efficacy of a Recombinant Turkey Herpesvirus AI (H5) Vaccine in Preventing Transmission of Heterologous Highly Pathogenic H5N8 Clade 2.3.4.4b Challenge Virus in Commercial Broilers and Layer Pullets.* J Immunol Res, 2018. **2018**: p. 3143189.
81. Kapczynski, D.R., et al., *Homologous and heterologous antigenic matched vaccines containing different H5 hemagglutinins provide variable protection of chickens from the 2014 U.S. H5N8 and H5N2 clade 2.3.4.4 highly pathogenic avian influenza viruses.* Vaccine, 2017. **35**(46): p. 6345-6353.
82. Balzli, C.L., et al., *The efficacy of recombinant turkey herpesvirus vaccines targeting the H5 of highly pathogenic avian influenza virus from the 2014–2015 North American outbreak.* Vaccine, 2018. **36**(1): p. 84-90.
83. Bertran, K., et al., *Efficacy of recombinant Marek's disease virus vectored vaccines with computationally optimized broadly reactive antigen (COBRA) hemagglutinin insert against genetically diverse H5 high pathogenicity avian influenza viruses.* Vaccine, 2021. **39**(14): p. 1933-1942.
84. Bertran, K., et al., *Maternal antibody inhibition of recombinant Newcastle disease virus vectored vaccine in a primary or booster avian influenza vaccination program of broiler chickens.* Vaccine, 2018. **36**(43): p. 6361-6372.
85. Fulber, J.P.C. and A.A. Kamen, *Development and Scalable Production of Newcastle Disease Virus-Vectored Vaccines for Human and Veterinary Use.* Viruses, 2022. **14**(5).
86. Cho, Y., et al., *Co-expression of the Hemagglutinin and Neuraminidase by Heterologous Newcastle Disease Virus Vectors Protected Chickens against H5 Clade 2.3.4.4 HPAI Viruses.* Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 16854.
87. Ma, J., et al., *Newcastle disease virus-based H5 influenza vaccine protects chickens from lethal challenge with a highly pathogenic H5N2 avian influenza virus.* NPJ Vaccines, 2017. **2**: p. 33.
88. Bertran, K., et al., *Protection of White Leghorn chickens by recombinant fowlpox vector vaccine with an updated H5 insert against Mexican H5N2 avian influenza viruses.* Vaccine, 2020. **38**(6): p. 1526-1534.
89. Bublot, M., et al., *Development and use of fowlpox vectored vaccines for avian influenza.* Ann N Y Acad Sci, 2006. **1081**: p. 193-201.
90. European Medicines Agency. *Vectormune FP ILT*. 2023; Available from: https://www.ema.europa.eu/en/medicines/veterinary/summaries-opinion/vectormune-fp-ilt.
91. van de Ven, K., et al., *A universal influenza mRNA vaccine candidate boosts T-cell responses and reduces zoonotic influenza virus disease in ferrets*. 2022, bioRxiv.
92. Feldman, R.A., et al., *mRNA vaccines against H10N8 and H7N9 influenza viruses of pandemic potential are immunogenic and well tolerated in healthy adults in phase 1 randomized clinical trials.* Vaccine, 2019. **37**(25): p. 3326-3334.
93. Brito, L.A., et al., *Self-amplifying mRNA vaccines.* Adv Genet, 2015. **89**: p. 179-233.
94. Künzli, M., et al., *Route of self-amplifying mRNA vaccination modulates the establishment of pulmonary resident memory CD8 and CD4 T cells.* Science Immunology, 2022. **7**(78): p. eadd3075.
95. Ministerie van Landbouw Natuur en Voedselkwaliteit. *Frankrijk test vaccins tegen vogelgriep op eenden*. 2022; Available from: https://www.agroberichtenbuitenland.nl/actueel/nieuws/2022/10/06/frankrijk-test-vaccins-tegen-vogelgriep-op-eenden.
96. Jiang, Y., et al., *Enhanced protective efficacy of H5 subtype avian influenza DNA vaccine with codon optimized HA gene in a pCAGGS plasmid vector.* Antiviral Research, 2007. **75**(3): p. 234-241.
97. Rao, S., et al., *Multivalent HA DNA Vaccination Protects against Highly Pathogenic H5N1 Avian Influenza Infection in Chickens and Mice.* PLOS ONE, 2008. **3**(6): p. e2432.
98. Khan, K.H., *DNA vaccines: roles against diseases.* Germs, 2013. **3**(1): p. 26-35.
99. Rahn, J., et al., *Vaccines against influenza A viruses in poultry and swine: Status and future developments.* Vaccine, 2015. **33**(21): p. 2414-2424.

100. Rao, U.R., et al., *The effect of p-aminobenzoic acid and folic acid on the development of infective larvae of Brugia malayi in Aedes aegypti.* Acta Trop, 1984. **41**(1): p. 61-7.
101. Stachyra, A., et al., *Highly immunogenic prime–boost DNA vaccination protects chickens against challenge with homologous and heterologous H5N1 virus.* Trials in Vaccinology, 2014. **3**: p. 40-46.
102. Jazayeri, S.D., et al., *Improved immune responses against avian influenza virus following oral vaccination of chickens with HA DNA vaccine using attenuated Salmonella typhimurium as carrier.* Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 2012. **35**(5): p. 417-27.
103. Velthuis, A G J., et al., *Design and analysis of small-scale transmission experiments with animals.* Epidemiology and Infection, 2007. **135**(2): p. 202-217.
104. Germeraad, E.A., et al., *Detection of Low Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H10N7 in Poultry and Environmental Water Samples During a Clinical Outbreak in Commercial Free-Range Layers, Netherlands 2017.* Frontiers in Veterinary Science, 2020. **7**(237).
105. World Organisation for Animal Health (OIE). *Chapter 2.3.4. Avian Influenza (infection with avian influenza viruses)*. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals 2009 [cited 1; Available from: http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/.
106. Bouwstra, R., et al., *Full-Genome Sequence of Influenza A(H5N8) Virus in Poultry Linked to Sequences of Strains from Asia, the Netherlands, 2014.* Emerg Infect Dis, 2015. **21**(5): p. 872-4.
107. De Jong, M.C. and T.G. Kimman, *Experimental quantification of vaccine-induced reduction in virus transmission.* Vaccine, 1994. **12**(8): p. 761-6.
108. Velthuis, A.G.J., M.C.M. De Jong, and J. De Bree, *Comparing methods to quantify experimental transmission of infectious agents.* Mathematical Biosciences, 2007. **210**(1): p. 157-176.

Bijlage 1: verantwoording auteurschap[2]

Eerste voorbereidende overleggen en conceptstukken:
N. Beerens, M.C.M. de Jong, J.A. Stegeman, F.C. Velkers, J.J. de Wit

Uitvoering literatuurstudie:
E.A. Germeraad

Opzet dierstudie:
N. Beerens, E.A. Germeraad, J.L. Gonzales, M.C.M. de Jong, J.A. Stegeman, F.C. Velkers, J.J. de Wit

Voorbereiden dierstudie:
N. Beerens, E.A. Germeraad, F.C. Velkers

Uitvoeren dierstudie:
N. Beerens, E.A. Germeraad

Analyses:
M.C.M. de Jong (virustransmissie en relatie antilichaamtiters), J.L. Gonzales (virusuitscheiding)

Beschrijven uitkomsten dierstudie:
E.A. Germeraad, J.L. Gonzales, M.C.M. de Jong, F.C. Velkers

Review literatuur- en dierstudie:
N. Beerens, J.L. Gonzales, M.C.M. de Jong, J.A. Stegeman, F.C. Velkers, J.J. de Wit

Acknowledgements:
Deze dierstudie kon niet uitgevoerd worden zonder alle goede zorgen van de dierverzorgers van WBVR en al het laboratoriumwerk van de analisten van WBaVR. Daarnaast bedanken wij de collega's van Erasmus MC, de farmaceutische bedrijven, de pluimveesector en het Ministerie van LNV, die in de aanloop van dit traject aandacht hebben gevraagd voor dit onderwerp en hebben meegedacht over dit project.

[2] In alfabetische volgorde per categorie

Bijlage 2: vaccingegevens

HVT-vaccin Ceva

Productnaam:	Vectormune-AI
Fabrikant:	Ceva Sante Animale
Vaccin batch:	395-117
Vaccin exp:	03Mar2023
Oplosmiddel batch:	21060741
Oplosmiddel exp:	12-2023
Blue dye V9030 batch:	91066B
Blue dye V9030 exp:	2023-08-05
Opslag condities:	vaccin <-140°C; oplosmiddel en blue dye op kamertemperatuur
Bereiding:	volgens protocol Ceva: in schone omgeving wordt 0,5-1ml blue dye toegevoegd aan het oplosmiddel. De blue dye en oplosmiddel wordt gemengd door te zwenken en vervolgens wordt het 30 minuten met rust gelaten. Eén ampul van het vaccin wordt ontdooid in een waterbad met steriel water (26-28°C) voor 60-90 seconden. Er wordt 5 ml oplosmiddel opgezogen met een 20 ml spuit en 18G x 1,5" naald. Vervolgens wordt de inhoud van de ampul voorzichtig opgezogen met een 18G x 1,5" naald en toegediend aan de rest van het oplosmiddel in de vaccinzak. Vaccin niet op-en-neer zuigen.
Overig:	vaccin moet <1u na bereiding toegediend zijn
Toedieningsroute:	Subcutaan achter in nek; 20G naald
Toedieningsdosis:	0,2 ml
Leeftijd toediening:	1-dag-kuiken

HVT-vaccin Boehringer Ingelheim

Productnaam:	HVT-H5
Fabrikant:	Boehringer Ingelheim (BIAH)
Vaccin batch:	HVT-H5
Filling date:	17-12-2021
Oplosmiddel batch:	006/21
Oplosmiddel exp:	Dec23
Opslag condities:	vaccin <-140°C; oplosmiddel op kamertemperatuur
Bereiding:	volgens protocol BIAH: in een schone omgeving wordt één ampul van het vaccin ontdooid in een waterbad met steriel water (26-28°C) voor 60-90 seconden. Er wordt 5 ml oplosmiddel opgezogen met een 20 ml spuit en 18G x 1,5" naald. Vervolgens wordt de inhoud van de ampul voorzichtig opgezogen met een 18G x 1,5" naald en toegediend aan de rest van het oplosmiddel in de vaccinzak. Vaccin niet op-en-neer zuigen.
Overig:	vaccin moet <1u na bereiding toegediend zijn
Toedieningsroute:	Subcutaan achter in nek; 20G naald
Toedieningsdosis:	0,2 ml
Leeftijd toediening:	1-dag-kuiken

DNA-vaccin Huvepharma

Productnaam:	AI DNA vaccin
Fabrikant:	Huvepharma
Vaccin batch:	AIV_01Jul22
Vaccin exp:	NA
Opslag condities:	2-8°C
Bereiding:	Ready-to-use
Toedieningsroute:	Intramusculair in borstspier; 25G naald
Toedieningsdosis:	0,2 ml
Leeftijd toediening:	14 dagen oud

Geïnactiveerd vaccin MSD

Productnaam:	Nobilis
Fabrikant:	MSD Animal Health Boxmeer
Vaccin batch:	H067A, productie datum: Mar2021
Vaccin exp:	Mar2023
Opslag condities:	2-8°C
Bereiding:	Ready-to-use

Overig:	Goed schudden voor gebruik
Toedieningsroute:	Subcutaan achter in nek; 20G naald
Toedieningsdosis:	100%, titergroep: 50% (125 µl) en 75% (188 µl)
Leeftijd toediening:	8 dagen oud

Bijlage 3: schatting van volgende generatie matrix (NGM)

Het niet optreden van virustransmissie in de 'Nobilis MSD titergroepen' waarbij alleen de infectiedieren zijn gevaccineerd ondersteunt de transmissieparameter β schatting. De schatting van de volgende generatie matrix (NGM) is met het effect op vatbaarheid en het effect op infectiviteit in de β schatting is:

	H	L
H	0,116	1,384
L	0,338	3,974

Waarbij elk element de (partiele) R van de kolom naar de rij weergeeft. Dus de R voor een groep met lage titer is 3,974 en een groep met alleen hoge titer 0,116. Het verschil in vatbaarheid, i.e. de verschillen tussen de rijen, is niet significant verschillend van nul. Daarom gebruiken we uiteindelijk een NGM met alleen een effect van het vaccin op infectiviteit die NGM is dan:

	H	L
H	0,195	3,568
L	0,195	3,568

Van beide NGM kun je aflezen dat in een situatie van de 'Nobilis MSD titergroep' met infectieuze dieren met een hoge titer en contactdieren met een lage titer, de R<1 is, namelijk 0,338 en 0,195 respectievelijk. Dit heet een partiele R, omdat de R, en dus R<1, alleen geldt zolang er geen contactdier besmet raakt. In een groep met 50% hoog en 50% laag is de R>1 indien willekeurige dieren besmet raken. De resultaten van de speciale 'MSD Nobilis titergroep' in deze studie komen overeen met de conclusie van Sitaras, *et al.* (2016) over H5N1 TT, namelijk dat de vermindering van virustransmissie door vaccinatie alleen komt door vermindering in infectiviteit van de gevaccineerde kippen [19].

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

Wageningen Bioveterinary Research
Rapport 2300528

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