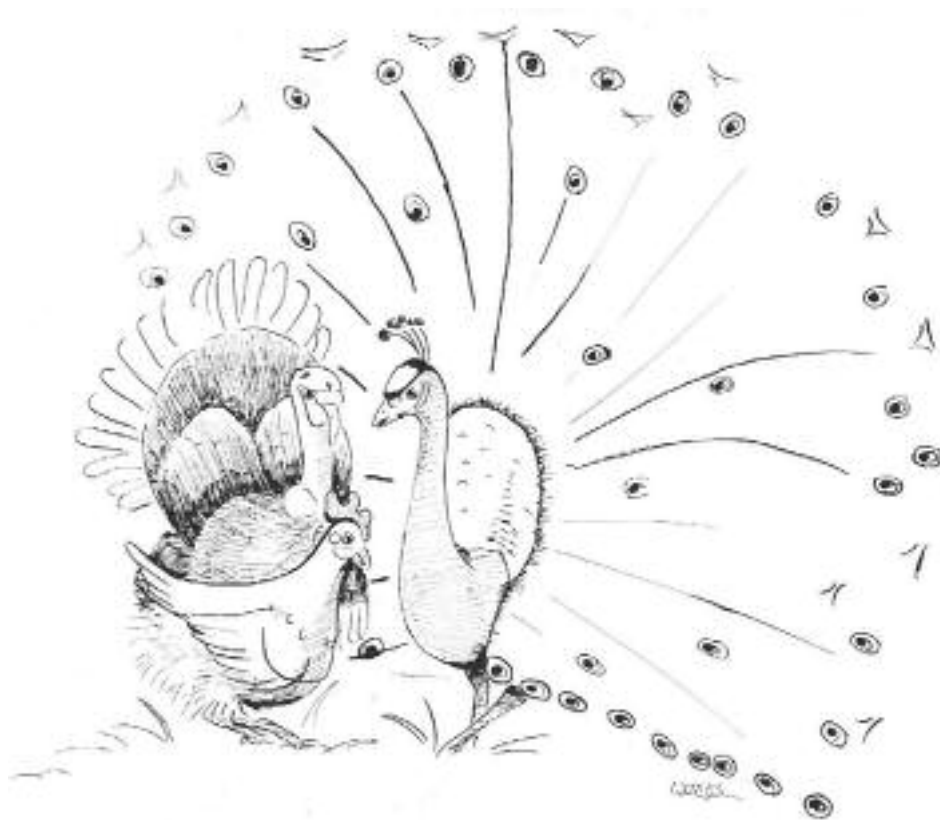


# Klassieke Vogelpest Uitbraak in Nederland 2003

*Deel I: Rol van hobbypluimvee bij de  
verspreiding van Aviaire Influenza*

*Deel II: Vaccinatie mogelijkheden*



H.M. van Geloof  
W.C.M. van Winden

Afdeling Epidemiologie van Infectieziekten;  
Afdeling Pluimvee  
Hoofdafdeling Gezondheidszorg Landbouwhuisdieren  
Faculteit Diergeneeskunde  
Universiteit Utrecht

Yalelaan 7  
3571 AD Utrecht  
Nederland

Juli 2003

Met dank aan:

Afdeling Epidemiologie van Infectieziekten van de Faculteit Diergeneeskunde te Utrecht  
Afdeling Pluimvee van de Faculteit Diergeneeskunde te Utrecht  
Nederlandse Bond van Hoender-, Dwerghoender-, Sier- en Watervogelhouders  
Ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit

Auteurs:

Drs. H.M. van Geloof  
Drs. W.C.M. van Winden



## Inhoudsopgave

### **Deel I: De rol van hobbypluimvee tijdens de klassieke vogelpest uitbraak in Nederland, 2003: een epidemiologische analyse**

1. Inleiding.....	5
2. Aandeel hobby-pluimvee in de totale AI-uitbraak.....	7
3. Analyse van de AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven.....	9
3.1. Beschrijving AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven.....	9
3.2. Tracering per hobbypluimvee-bedrijf.....	10
4. Discussie.....	14
5. Conclusies.....	17

### **Deel II: Vaccinatiemogelijkheden tegen Aviaire Influenza**

6. Inleiding.....	19
7. Vaccins.....	20
8. Effect van vaccinatie op virus replicatie.....	23
9. Gebruik van vaccinatie bij uitbraken van AI elders in de wereld.....	26
10. Discussie.....	28
11. Conclusies.....	31
Literatuurlijst.....	32



## Deel I

# De rol van hobbypluimvee tijdens de klassieke vogelpest uitbraak in Nederland, 2003: een epidemiologische analyse



## 1. Inleiding

Op 28 februari 2003 werd de eerste melding gedaan van een uitbraak van klassieke vogelpest. Daarvoor was Nederland sinds 1927 vrij geweest van deze ziekte. Door het CIDC (aangemerkt als nationaal referentie instituut voor aviaire influenza) werd het virus gekarakteriseerd als een hoogpathogeen aviair influenza (AI) virus van het subtype H7N7.

Over een periode van ongeveer drie maanden werden in totaal 255 bedrijven besmet verklaard. De meeste uitbraken vonden plaats in twee gebieden: de Gelderse Vallei en het gebied rond Weert in Limburg. Het is niet verwonderlijk dat juist in deze gebieden de uitbraak plaats vond. Van Boven *et al.* (2003) kwalificeerden deze regio's als risicogebieden in Nederland. De dichtheid van bedrijven is hier zo hoog dat een introductie van AI in het gebied hoogstwaarschijnlijk tot een grote uitbraak zal leiden.

Tabel 1. HPAI-uitbraken sinds 1959.

1959	Schotland	H5N1
1963	UK	H7N3
1966	Canada	H5N9
1976	Australië	H7N7
1979	Duitsland	H7N7
1979	UK	H7N7
1983	USA	H5N2
1983	Ierland	H5N8
1985	Australië	H7N7
1991	UK	H5N1
1992	Australië	H7N3
1994	Australië	H7N3
1994	Mexico	H5N2
1994	Pakistan	H7N3
1997	Australië	H7N4
1997	Hong Kong	H5N1
1997	Italië	H5N2
1999	Italië	H7N1
2002	Hong Kong	H5N1
2003	Nederland	H7N7

Bron: CIDC Lelystad 2003.

Wereldwijd komen er geregeld uitbraken van Aviaire Influenza voor. Sinds 1959 zijn er 20 gerapporteerde uitbraken van hoog-pathogene aviaire influenza (HPAI) virussen bij pluimvee (Tabel 1). Ongeveer de helft van deze virusintroducties leidden niet of nauwelijks tot verspreiding van het virus vanaf het indexbedrijf (Alexander, 2000b). In Nederland gebeurde dit wel in 2003.

Binnen de Europese Unie worden uitbraken van dierziekten die voorkomen op de lijst A van het O.I.E (Office International des Epizoöties) door middel van “stamping out” bestreden. In Nederland resulteerde deze aanpak in het (grotendeels preventief)



ruimen van zo'n 30 miljoen stuks pluimvee; bijna een derde van de nationale pluimveestapel. Het merendeel van het pluimvee bevond zich op commerciële pluimvee bedrijven. Het aandeel hobbymatig gehouden dieren op dit totale aantal geruimde dieren was gering. Het aantal betrokken hobbyisten was echter zeer groot. Ruim 15.000 hobbyisten kregen te maken met het ruimen van hun dieren. Een gigantisch aantal, afgezet tegen de 1300 geruimde commerciële pluimveebedrijven.

Vanuit de maatschappij kwam veel kritiek op het op grote schaal preventief ruimen van gezonde (hobby-)dieren. De vraag rees of de preventieve ruiming van hobbypluimvee noodzakelijk is geweest om de uitbraak onder controle te krijgen. Nu de AI-uitbraak tot stilstand is gebracht is een nadere analyse van de rol van hobbypluimvee in de verspreiding van het virus tijdens de epidemie wenselijk.

In deze rapportage wordt geprobeerd een inzicht te krijgen in de bijdrage van hobbypluimvee aan de epidemie.



## 2. Aandeel hobby-pluimvee in de totale AI-uitbraak

In totaal zijn er tijdens de uitbraak van aviaire influenza in Nederland 255 pluimveebedrijven (inclusief hobbypluimvee-bedrijven) besmet verklaard. Op 241 daarvan werd AI-virus geïsoleerd. Op de overige 14, werd geen virus geïsoleerd en zijn door de eigenaar geen klinische symptomen van AI waargenomen. Deze bedrijven zijn besmet verklaard op basis van positieve serologie. De besmet-status van deze bedrijven is echter dubieus. Serologie toont alleen antilichamen tegen AI aan. Bij deze dieren is het virus niet vastgesteld en er kan niet worden vastgesteld of ze besmet zijn (geweest) met een hoogpathogeen AI-virus. In dit verslag worden alleen de 241 bedrijven waar hoogpathogeen AI-virus is geïsoleerd als besmet beschouwd.

De aantallen besmette bedrijven en hobbypluimvee-bedrijven<sup>1</sup> tijdens de uitbraak in Nederland (afkomstig van het RCC in Stree) zijn weergegeven in tabel 2. Tabel 2 toont tevens de aantallen besmette bedrijven tijdens de AI-uitbraak in Italië in 1999-2000 (persoonlijke informatie I. Capua, nationaal referentie laboratorium voor NCD en AI, Italië).

Tabel 2. AI-besmette commerciële- en hobbypluimvee-bedrijven tijdens de uitbraken in Nederland (stand op 04-06-2003) en Italië (1999-2000).

Uitbraak	Type bedrijf	Aantal bedrijven		Besmet / At risk	Hobby besmet / totaal besmet
		Besmet	At risk		
Nederland (2003, H7N7)	Commercieel	227	1314	17,3 %	5,8 %
	Hobby	14	15.199	0,09 %	
Italië (1999- 2000, H7N1)	Commercieel	388	n.b.	n.b.	6,0 %
	Hobby	25	n.b.	n.b.	

Het aandeel besmette hobbypluimvee-bedrijven op het totale aantal besmette bedrijven lag, zowel voor Italië als voor Nederland, rond de 6 %. Voor een schatting van de kans om besmet te raken, is echter ook het totaal aantal bedrijven at risk van belang. Deze aantallen ontbreken voor de situatie in Italië. Voor de Nederlandse situatie zijn deze getallen wel bekend.

In de beschermingsgebieden en in de bufferzones zijn alle pluimveebedrijven (inclusief hobbypluimvee-bedrijven) geruimd. De aantallen geruimde bedrijven geven een indicatie van het totaal aantal bedrijven dat vóór de AI-uitbraak aanwezig was. Dit is het totaal aantal bedrijven dat kans had om besmet te worden: at risk (Tabel 2).

Zoals uit tabel 2 blijkt, is het totale aantal hobbypluimvee-bedrijven at risk vele malen groter dan het aantal commerciële bedrijven at risk. Samen met het kleinere aantal

<sup>1</sup> Hobbypluimvee-bedrijf: adres met 1 - 250 stuks pluimvee. Ondanks gebruik van de term "bedrijf" gaat het hierbij doorgaans om pluimvee dat niet voor commerciële doeleinden gehouden wordt.



besmette gevallen, leidt dit tot een kleinere fractie besmettingen voor hobbypluimvee-bedrijven: 0,09% besmette hobbypluimvee-bedrijven tegenover 17,3% besmette commerciële bedrijven.

Stel we beschouwen het commercieel zijn van een bedrijf (bedrijfsmatig gehouden pluimvee) als risicofactor ten opzichte van niet commercieel zijn (het hobbypluimvee-bedrijf). Het Relatief Risico (RR) is dan 188 (95% CI 110-321). Dit betekent dat, ten opzichte van de hobbyist, het commercieel zijn bijdroeg aan een verhoogd risico op het optreden van AI. Met andere woorden, een hobbypluimvee-bedrijf had een **188 keer kleinere kans** om besmet te raken dan een commercieel bedrijf.

Bij deze berekeningen is uit gegaan van 241 besmette bedrijven. Toevoeging van de groep “serologisch positieven” (waarbij wel antilichamen zijn aangetoond maar géén AI-virus is geïsoleerd) aan de groep besmette bedrijven, resulteert in 22 besmette hobbypluimvee-bedrijven en 233 besmette commerciële bedrijven. Het RR (Relatief Risico) is in deze situatie 123 (95% CI 79-189), vele malen groter dan 1. Het “commercieel zijn” vormt nog steeds een verhoogd risico om besmet te worden en het wel of niet meetellen van serologisch positieven levert dus geen andere interpretatie van het RR op.



### 3. Analyse van de AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven

Bij de vraag welke rol hobbypluimvee gespeeld heeft bij de verspreiding van AI-virus, is het van belang of er besmetting van commerciële bedrijven door hobbyisten heeft plaats gevonden of juist visa versa.

De transmissie van virus tussen bedrijven wordt bepaald door:

1. de transmissie van het virus binnen een bedrijf,
2. het aantal dieren op het bedrijf en
3. de contactstructuur tussen bedrijven.

In de hier opvolgende analyse van de AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven zal de nadruk liggen op de factoren 2 en 3.

#### 3.1. Beschrijving AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven

Gemiddeld waren er per besmet hobbypluimvee-bedrijf 41,4 (spreiding 4-99) AI-gevoelige dieren aanwezig (Tabel 3). Van de 14 besmette hobbypluimvee-bedrijven bleken er 8 een gemengde collectie AI-gevoelig pluimvee te hebben. Klinische symptomen werden op deze “bedrijven” gezien bij pauwen, fazanten, kalkoenen, parelhoenders, struisvogels, en kippen. Bij de 4 laatst genoemde soorten vond ook virusisolatie plaats. Pauwen, fazanten en diverse watervogelsoorten werden wel bemonsterd, of ze positief waren is niet bekend. De monsters van deze diersoorten werden gemengd met monsters van ander pluimvee op hetzelfde adres. Bij een positieve uitslag viel niet te achterhalen welk individueel monster positief was. De kippen die gehouden werden door de 14 particuliere pluimveehouders waren leghybriden, rashoenders en rasloze hoenders (“bastaarden”). Klinische symptomen werden gezien bij de leghybriden en rasloze hoenders. Virusisolatie vond eveneens bij beide groepen plaats. Voor de groep rashoenders zijn deze gegevens niet bekend.

Tabel 3. Gegevens over de AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven.

AI-besmette hobbypluimvee-bedrijven		Aantal dieren per AI-besmette hobbypluimvee-bedrijf	
Totaal	14	Gemiddeld	41,4
Gemengde collectie	8	Mediaan	33
Agrarisch / kleinschalig	6	Minimum	4
Georganiseerd (lid NHDB)	1	Maximum	99



Zes hobbypluimvee-bedrijven waren bedrijven met een klein koppeltje leghennen (20 – 80 hennen) en in één geval struisvogels. Deze hebben daarom meer contacten in de agrarische sector dan de andere hobbypluimvee-bedrijven en zijn in tabel 3 aangegeven als “agrarisch/kleinschalig”.

Eén van de 14 hobbyisten met besmette dieren was lid van een pluimveevereniging. Het totale aantal hobbyisten in de geruimde gebieden dat lid was van een pluimveevereniging is niet bekend. Daarom kan niet geanalyseerd worden of het houden van pluimvee in georganiseerd verband een risicofactor is voor het optreden van AI.

### 3.2. Tracering per hobbypluimvee-bedrijf

Van elk besmet hobbypluimvee-bedrijf is een inventarisatie gemaakt van de contacten die een rol gespeeld kunnen hebben in de verspreiding van het vogelpestvirus. Hierbij is een indeling gemaakt in enerzijds contacten die als bron van besmetting gediend kunnen hebben, de zogenaamde ‘opwaartse’ contacten, en anderzijds contacten die geïnfecteerd kunnen zijn door het betreffende hobbypluimvee, de zogenaamde ‘neerwaartse’ contacten. Directe contacten via mens of dier zijn geïnventariseerd, maar ook is gekeken of er besmet pluimvee in de omgeving aanwezig was.

Bij opwaartse tracering van de bron is in deze analyse steeds uit gegaan van een incubatietijd die maximaal 7 dagen heeft bedragen. Dit is gebaseerd op een incubatietijd van 3 à 4 dagen voordat symptomen van ziekte optreden (Tollis *et al.*, 2002).

Bij neerwaartse tracering naar de verspreiding van het virus is dezelfde incubatietijd aangehouden. Dit houdt in dat als infectieuze periode is gekozen: van 7 dagen voor de datum van eerste symptomen tot en met de datum van ruiming. Er is vanuit gegaan dat na ruiming een verdere verspreiding van het vogelpest virus niet meer mogelijk is.

#### Wilde vogels

Over het algemeen wordt aangenomen dat wilde vogels een rol spelen in het ontstaan van een uitbraak van klassieke vogelpest bij pluimvee. Met name wilde watervogels dragen veel verschillende typen AI-virussen met zich mee. De virussen die wilde vogels dragen zijn laagpathogeen. Dit houdt in dat pluimvee door contact met wilde vogels besmet kan raken met laagpathogeen AI-virus, waar het pluimvee niet of in lichte mate ziek van wordt. Het laagpathogene AI-virus kan echter muteren tot een hoogpathogeen AI-virus en dit leidt dan tot een uitbraak van klassieke vogelpest (Alexander, 2000a; Nestorowicz *et al.*, 1987).

Hobbypluimvee heeft vrijwel altijd een uitloop en kan dus geregeld in contact komen met wilde vogels. In de eerste dagen van de vogelpest uitbraak was deze vorm van contact nog mogelijk, maar vanaf 1 maart was in de Gelderse Vallei vrijwel al het hobbypluimvee opgehokt. Vanaf deze datum is contact met wilde vogels tot een minimum beperkt, afhankelijk van de kwaliteit van het hok. Als van een incubatietijd van 7 dagen wordt uitgegaan, dan zou het mogelijk kunnen zijn dat pluimvee met uitloop, dat voor 8 maart symptomen van AI vertoonde (hobbypluimvee-bedrijven 1, 2 en 3) besmet



is geraakt door contact met wilde vogels. Voor pluimvee in de Gelderse Vallei dat na 8 maart pas de eerste verschijnselen van ziekte vertoonde, is het minder waarschijnlijk dat ze besmet zijn door contact met wilde vogels. Voor de twee hobbypluimvee-bedrijven in het zuiden geldt dat het hobbypluimvee al meer dan 7 dagen opgehokt was toen de symptomen begonnen. De rol van wilde vogels in de verspreiding van het hoogpathogeen virus is niet te achterhalen, maar lijkt ook niet erg waarschijnlijk.

### **Contacten**

Contacten via mensen, dieren of materiaal tussen besmette bedrijven.

#### *Opwaarts*

Tracering heeft geen relevante contacten opgeleverd.

#### *Neerwaarts*

Op een van de besmette hobbypluimvee-bedrijven is een loonwerker geweest, die op dezelfde dag nog 3 commerciële pluimveebedrijven heeft bezocht en voor verspreiding van het virus kan hebben gezorgd. Twee van de bezochte bedrijven zijn 5 dagen later verdacht verklaard en besmet gebleken. Het derde bezochte bedrijf is 24 dagen later verdacht verklaard. Dit laatste bedrijf is besmet geraakt buiten de infectieuze periode van het hobbypluimvee. Gezien het interval tussen contact en het optreden van ziekte op dit bedrijf is het niet waarschijnlijk dat dit bedrijf besmet is geraakt door het betreffende hobbybedrijf. Deze contacten zijn nog van de tijd dat er geen maatregelen waren ingesteld. Na 1 maart waren dergelijke contacten vanuit hobbypluimvee-bedrijven in principe niet meer mogelijk.

### **Besmette bedrijven in de omgeving**

Bij alle besmette hobbypluimvee-bedrijven is gekeken naar het aantal besmette bedrijven binnen een straal van 1 km rond de locatie van het hobbypluimvee. De straal van 1 km is gekozen, omdat in dit gebied, op basis van gegevens uit de varkenspestuitbraak (1997) werd verondersteld dat het risico van infectie groter is dan in een gebied op grotere afstand van een haard. Infecties door of naar bedrijven in de omgeving, zonder dat daar een eenduidig contact voor kan worden aangemerkt, worden aangeduid met de term buurtinfecties. Hoe verspreiding van virus in de omgeving precies gebeurt is niet bekend.

Vaak liggen er meerdere commerciële pluimveebedrijven in een gebied van 1 km rondom een hobbypluimvee-bedrijf. Wanneer uitsluitend gekeken wordt naar de datum van verdachtverklaring, die vrijwel samenvalt met de datum waarop de eerste symptomen van ziekte zijn gezien, dan blijkt dat 11 van de 14 hobbypluimvee-bedrijven binnen een straal van 1 km van een of meerdere eerder besmette commerciële bedrijven lagen. Bij slechts 2 hobbypluimvee-bedrijven lagen er binnen een straal van 1 km een of meerdere later besmette commerciële bedrijven. Bij deze grove analyse is echter geen rekening gehouden met de incubatietijd en met de infectieuze periode.

In tabel 4 is hier wel rekening mee gehouden. Hierdoor kan een bepaald (commercieel) bedrijf op minder dan 1 km van het betreffende hobbypluimvee-bedrijf zowel voor als na het hobbypluimvee-bedrijf besmet zijn. Een bedrijf dat bijvoorbeeld 2 dagen na het hobbypluimvee verdacht is verklaard, is zowel een later besmet bedrijf als



een bedrijf dat het betreffende hobbypluimvee besmet kan hebben, immers het bedrijf was, uitgaande van een incubatietijd van 7 dagen, mogelijk al 7 dagen eerder infectieus.

#### Opwaarts

Acht van de 14 hobbypluimvee-bedrijven kunnen volgens onze analyse besmet zijn door een ander besmet bedrijf binnen een straal van 1 km.

Voor de bedrijven 5, 6 en 14 zijn bij de tracering geen contacten gemeld. Bij deze bedrijven bevonden zich geen andere besmette bedrijven binnen een straal van 1 km, maar wel binnen een straal van 2 km. Verder onderzoek zal uit moeten wijzen of besmetting ook kan plaats vinden binnen een straal van 2 km en hoe waarschijnlijk dit is.

*Tabel 4. Aantal pluimveebedrijven binnen 1 km die mogelijk (infectieuze periode van 7 dagen voor verdachtdatum tot datum ruiming) vóór en na het hobbypluimvee-bedrijf besmet zijn.*

Besmet hobbypluimvee-bedrijf	Voor het hobbypluimvee besmet	Na het hobbypluimvee besmet
1	9	9
2	7	5
3	6	6
4	1	0
5	0	0
6	0	0
7	1	1
8	1	1
9	2	1
10	3	1
11	0	0
12	0	0
13	0	0
14	0	0
Totaal	30	24

Bij de bedrijven 11, 12 en 13 waren de bedrijven die binnen een kilometer lagen, meer dan 7 dagen voordat de symptomen bij het hobbypluimvee ontstonden geruimd. Bedrijven rond hobbypluimvee-bedrijf 11 waren 8, 11 en 15 dagen eerder geruimd. Rondom hobbypluimvee-bedrijf 12 waren de besmette bedrijven 10, 16, 21 en 22 dagen eerder geruimd en rondom hobbypluimvee-bedrijf 13 was dit 10 dagen eerder gebeurd. Binnen een straal van 2 km waren geen besmette bedrijven aanwezig en voorlopig zijn bij de tracering van deze drie hobbypluimvee-bedrijven geen contacten genoemd die voor infectie gezorgd kunnen hebben. Het feit dat dit pluimvee toch besmet is geraakt is niet goed te verklaren. Mogelijk heeft er toch (onbewust) contact plaats gevonden of is het virus ook na ruimen nog dagen in de omgeving aanwezig geweest.



### *Neerwaarts*

Bij 7 van de 14 besmette hobbypluimvee-bedrijven is het volgens onze analyse niet waarschijnlijk dat ze ander gehouden pluimvee binnen een straal van 1 km hebben besmet. De 7 overige hobbypluimvee-bedrijven zouden echter wel voor besmetting van ander pluimvee gezorgd kunnen hebben. Dit wordt per bedrijf toegelicht.

De mogelijke neerwaartse besmettingen van de bedrijven 2, 7, 8 en 10 zijn minder waarschijnlijk omdat de symptomen van AI op de commerciële bedrijven, 2 tot 7 dagen eerder ontstonden dan bij de betreffende hobbydieren en het moment van insleep waarschijnlijk eerder heeft plaatsgevonden. Bij de bedrijven 1, 3 en 9 bevonden zich meerdere bedrijven in het kilometergebied, die allemaal in een korte tijd besmet raakten, waardoor er veel mogelijkheden zijn van buurt-infecties ook door andere besmette bedrijven die het later besmette bedrijf geïnfecteerd kunnen hebben.



#### 4. Discussie

Tijdens de klassieke vogelpest uitbraak in Nederland bleek dat van alle hobbypluimvee-bedrijven een kleiner deel besmet werd dan van alle commerciële bedrijven (RR=188). In de gebieden at risk werd 0,1 % van de hobbypluimvee-bedrijven besmet tegen 17,3 % van de commerciële bedrijven die werden besmet.

Als besmette bedrijven zijn alleen die bedrijven aangemerkt waar het aviaire influenza (AI)-virus is geïsoleerd. Toevoeging van de groep “serologisch positieven” (waarbij wel antilichamen zijn aangetoond maar géén AI-virus is geïsoleerd) aan de groep besmette bedrijven, resulteert in een RR (Relatief Risico) van 123 (95% CI 79-189), ook vele malen groter dan 1. Het “commercieel zijn” vormt dus nog steeds een verhoogd risico om besmet te worden en het wel of niet meetellen van serologisch positieven levert dus geen andere interpretatie van het RR op.

Echter, de besmet status van preventief geruimde hobbypluimvee-bedrijven is onbekend, hetgeen een goede interpretatie van de gegevens in de weg staat. Het preventief geruimde pluimvee had besmet kunnen zijn, maar vertoonde voor ruiming nog geen klinische symptomen. Of het pluimvee dat geruime tijd na het besmette bedrijf geruimd werd had hersteld kunnen zijn. Dit zou een onderschatting van het werkelijke aantal besmette bedrijven kunnen betekenen.

Voor een inschatting van de populatie at risk hebben we gebruik gemaakt van het totaal aantal geruimde bedrijven. De aantallen geruimde commerciële bedrijven zullen overeenkomen met het werkelijke aantal bedrijven at risk. Ieder commercieel pluimveebedrijf is immers bekend bij de overheid. Het werkelijke aantal hobbypluimvee-bedrijven at risk is waarschijnlijk onderschat, omdat niet iedere hobbypluimvee houder zich heeft aangemeld. Het berekende RR zou hierdoor in werkelijkheid groter kunnen zijn. Anderzijds kan dit effect ook weer worden tegengewerkt, doordat er in de groep van niet-melders een aantal besmette hobbypluimvee-bedrijven aanwezig zou kunnen zijn. Het werkelijke RR kan door al deze effecten dus verschillen van het in dit verslag berekende RR. Een verandering, zodanig dat  $RR < 1$  wordt is, gezien de aantallen betrokken bedrijven, echter niet te verwachten.

Over de manier van verspreiding van het AI-virus in de omgeving bestaat veel onduidelijkheid. Indirecte contacten kunnen hierbij een rol spelen. Het is bekend dat



deeltjes mest via mens-, dier- of materiaalcontact verspreid kunnen worden (Tollis *et al.*, 2002; Alexander, 2000a). Echter, tracing van dergelijke contacten leverde voor geen van de 14 besmette hobbypluimvee-bedrijven aanknopingspunten voor de bron van infectie, noch voor neerwaartse verspreiding. Slechts één contact via een loonwerker is naar voren gekomen, maar het valt niet te bewijzen dat hierdoor virus is overgebracht. Dit contact heeft namelijk plaats gevonden in de eerste week van de uitbraak in een omgeving waar zeer veel besmette bedrijven aanwezig waren.

De rol van wilde vogels in de verspreiding van het hoogpathogeen virus is niet te achterhalen, maar lijkt niet erg waarschijnlijk. Het effect van verspreiding door de wind wordt op dit moment onderzocht.

Het nauwelijks vinden van contacten tussen hobbypluimvee en commerciële bedrijven sluit aan bij de ervaringen in Italië. Daar wordt bij de bestrijding van AI aangenomen dat de directe (en ook indirecte) contacten tussen hobbypluimvee en commerciële bedrijven minimaal zijn. In Italië wordt hobbypluimvee daarom nauwelijks meer betrokken in de bestrijding van AI. Bij de vaccinatie campagnes werd hobbypluimvee aanvankelijk wel gevaccineerd, nu is dat niet meer het geval. Ook preventieve ruimingen van hobbypluimvee vinden niet meer plaats. Alleen geïnfecteerd hobbypluimvee wordt geruimd (persoonlijke informatie I. Capua, nationaal referentie laboratorium voor NCD en AI, Italië).

Omdat specifieke contacten tussen hobbypluimvee-bedrijven en commerciële bedrijven niet gevonden werden, hebben we de mogelijkheid op het optreden van buurtinfecties geanalyseerd. Acht hobbybedrijven kunnen via buurtinfectie met een commercieel bedrijf besmet zijn geraakt. Voor 11 hobbybedrijven is het onwaarschijnlijk dat ze via buurtinfectie commerciële bedrijven hebben besmet. Voor drie bedrijven is dat in principe mogelijk geweest. In de 1 km zone lagen echter ook commerciële bedrijven die in die periode tot besmetting van andere bedrijven kunnen hebben geleid.

Op grond van deze analyse is het dus niet waarschijnlijk dat hobbypluimvee d.m.v. buurtinfecties commerciële bedrijven besmet heeft. Met name het kleinere aantal dieren op een hobbypluimvee-bedrijf (gemiddeld 41 per besmet hobbypluimvee-bedrijf vergeleken met 23.000 voor een commercieel bedrijf) kan hier de oorzaak van zijn. Van Nes *et al.* (1998) toonde immers voor het Aujeszky virus aan dat, naarmate er op een bedrijf meer dieren aanwezig zijn, een bedrijf gemiddeld een groter aantal andere bedrijven besmet. Er mag dus verwacht worden dat er d.m.v. buurtinfecties door een commercieel bedrijf veel meer andere bedrijven besmet zijn dan door een hobbypluimvee-bedrijf.

Een nadeel van ons onderzoek is dat in de analyse van buurtinfecties, in het kilometergebied van een besmet hobbypluimvee-bedrijf alleen besmette bedrijven zijn meegenomen, niet het totaal aantal bedrijven at risk. Door de uitgevoerde ruimingen in een kilometergebied verandert deze populatie at risk echter voortdurend. Op het moment van verdacht-verklaring van een hobbypluimvee-bedrijf waren de meeste commerciële bedrijven op minder dan een kilometer afstand reeds geruimd, omdat ze ook binnen een kilometergebied vielen van een, al eerder besmet geraakt commercieel bedrijf. Het



hobbypluimvee kon het virus gewoonweg niet verder verspreiden naar commerciële bedrijven omdat deze niet meer aanwezig waren.

In een uitgebreidere analyse zou het daarom aan te bevelen zijn om, binnen een kilometer van een besmet hobbypluimvee-bedrijf alle bedrijven at risk mee te nemen in de analyse en niet alleen de besmette bedrijven. Dit geldt met name voor de aanwezige, niet besmette, hobbypluimvee-bedrijven, omdat juist deze minder snel geruimd zijn dan de commerciële bedrijven. Dit zou meer informatie op moeten leveren over de mogelijkheid van hobbypluimvee om virus te verspreiden.

In de Nederlandse situatie werden besmette hobbypluimvee-bedrijven uiteraard geruimd. Daarnaast werd al het hobbypluimvee in de beschermingsgebieden en bufferzones preventief geruimd. Zoals eerder vermeld werden deze voornamelijk preventieve ruimingen pas afgerond, meer dan een maand nadat het laatste besmette bedrijf geruimd was. Omdat deze tijd de incubatietijd van AI, ook de 10 dagen die door het ministerie van LNV genoemd wordt, ruim overschrijdt, lijkt deze maatregel zo lang na de laatste besmetting van weinig nut. Direct (binnen de bedrijfsincubatietijd) na de besmetverklaring van een bedrijf al het hobbypluimvee dat zich binnen een straal van 1 km bevindt ruimen is beter te onderbouwen. Maar dan nog, hobbypluimvee kan wel besmet raken met AI maar lijkt vrijwel niet bij te dragen aan verspreiding van AI.



## 5. Conclusies

Doel van dit onderzoek was de rol van hobbypluimvee in de verspreiding van het klassieke vogelpest virus vast te stellen. Het onderzoek was grotendeels beschrijvend van aard, en harde conclusies kunnen uit dit observationeel onderzoek daarmee niet worden getrokken.

De kans op besmetting met het AI virus is voor een hobbypluimvee-bedrijf ongeveer 190 keer zo klein als voor een commercieel bedrijf. Aangezien een hobbypluimvee-bedrijf gemiddeld ongeveer 550 keer zo klein is als een gemiddeld commercieel bedrijf, zullen besmette hobbybedrijven ook gemiddeld 550 keer zo weinig virus uitscheiden.

Gezien de naar verhouding geringe infectiviteit van de hobbybedrijven, is het niet waarschijnlijk dat hobbybedrijven hebben bijgedragen aan de verspreiding van het AI virus.

Bij één hobbybedrijf is een professioneel contact gevonden tussen dat bedrijf en enkele commerciële bedrijven. Dat kan betekenen dat vanuit dat hobbybedrijf de besmetting overgedragen zou kunnen zijn. Dit bedrijf is echter vroeg in de epidemie besmet geraakt, toen de bestrijdingsmaatregelen nog niet van kracht waren. Bij de overige hobbybedrijven zijn contacten met commerciële bedrijven, die mogelijk tot verspreiding hebben geleid of die de besmetting van het hobbybedrijf kunnen verklaren, niet gevonden.

Bedrijven in een straal van 1 km rond een besmet bedrijf lopen een grotere kans te worden besmet, de zgn. buurtinfecties. Acht hobbybedrijven kunnen via buurtinfectie met een commercieel bedrijf besmet zijn geraakt. Voor 11 hobbybedrijven is het onwaarschijnlijk dat ze via buurtinfectie commerciële bedrijven hebben besmet. Voor drie bedrijven is dat in principe mogelijk geweest. In de 1 km zone lagen echter ook commerciële bedrijven die in die periode tot besmetting van andere bedrijven kunnen hebben geleid. Gezien de bedrijfsgrootte ligt het meer voor de hand dat die commerciële bedrijven voor verspreiding in de zone hebben gezorgd.

De rol van hobbypluimvee in de verspreiding van het virus lijkt gering. Ruimen van besmette bedrijven staat niet ter discussie. Het veterinair nut van preventief ruimen nadat de incubatietijd sinds het ruimen van het laatste besmette bedrijf is verstreken is niet zinvol. Als de dieren na zo'n lange tijd nog niet ziek zijn geworden t.g.v. AI dan worden ze dat waarschijnlijk ook niet meer. Daarmee vormen ze dan dus geen gevaar meer voor verder verspreiding.



## Deel II

# Vaccinatiemogelijkheden tegen Aviaire Influenza



## 6. Inleiding

Hoogpathogeen Aviaire Influenza, de zogenaamde Klassieke Vogelpest, is een lijst A-ziekte. Deze ziekte is zeer besmettelijk en veroorzaakt in een korte tijd sterfte onder pluimvee. In Europees verband is overeengekomen dat deze ziekte bestreden wordt door besmet en ernstig klinisch verdacht pluimvee te ruimen. Tevens wordt in Nederland pluimvee geruimd dat contact heeft gehad met besmette dieren en wordt in ieder geval al het gehouden pluimvee dat zich in een straal van 1 km rond een besmette haard bevindt geruimd. Bij de uitbraak van AI in het voorjaar van 2003 heeft dit in Nederland geleid tot ruiming van grote aantallen bedrijfsmatig en hobbymatig gehouden pluimvee. Het beleid betreffende een groot deel van de zeer besmettelijke lijst-A ziekten roept steeds meer weerstand op en de vraag rijst of het ruimen van besmette, maar vooral de preventieve ruiming en vernietiging van gezonde, niet besmette dieren nodig is.

Tegen AI zou een alternatieve bestrijdingsmethode kunnen worden ingezet t.w. vaccinatie. Door vaccinatie komt een immuunrespons tegen het vaccin-virus op gang. Deze respons wordt geactiveerd als de vogel in contact komt met een veldstam, waardoor symptomen van AI kunnen worden voorkomen! Waarom wordt vaccinatie dan niet gebruikt bij de bestrijding van AI?



## 7. Vaccins

Allereerst een omschrijving van de verschillende soorten AI-vaccins. Proeven met AI vaccins zijn gedaan met als uitleesparameters 1) bescherming tegen de symptomen van AI als gevolg van een infectie met het virus 2) inductie van antilichamen en 3) virusuitscheiding, dit om de werkzaamheid van een vaccin te bepalen. Bij een uitbraak is het echter noodzakelijk dat een vaccin in staat is de verspreiding van het virus tussen bedrijven te verminderen zodat uiteindelijk het virus wordt uitgeroeid. Hieronder volgt eerst een overzicht van de gegevens met betrekking tot het vermogen van vaccins klinische protectie te induceren. In de discussie worden de mogelijkheden van vaccinatie bij een uitbraak bediscussieerd.

### Vaccin van een geïnactiveerd AI-virus

Bij vaccinatie met een geïnactiveerd AI-virus wordt een geheel geïnactiveerd AI-virus in een olie-emulsie via injectie toegediend. Het pluimvee reageert hierop met de aanmaak van antilichamen tegen het vaccin-virus. Naast antilichamen worden echter geen afweercellen tegen het vaccin-virus gemaakt (Suarez, D. L., 2000, pp. 16-17).

Een vaccin van een geïnactiveerd AI-virus werkt met name goed tegen het ontstaan van ziekte als gevolg van een infectie met een homoloog veldvirus. Ziekte, sterfte en eiproductiedaling worden voorkomen als de dieren 3-4 weken voor de infectie gevaccineerd zijn. Het vaccin werkt ook tegen ziekte door infectie met AI-virussen die hetzelfde subtype heamagglutinine (H-deel) hebben, maar het heeft vrijwel geen effect bij infectie met een ander subtype heamagglutinine. Wel kunnen in een vaccin meerdere subtypen virus gemengd worden, voorlopig is bekend dat een mengsel van 4 subtypen heamagglutinine tot de mogelijkheden behoort. De mate van klinische bescherming is afhankelijk van de leeftijd waarop gevaccineerd wordt. Vaccinatie van 1-3 dagen of 4-5 weken oude vleeskuikens geeft 4 weken later een goede bescherming tegen het AI-virus, maar pas op 8 weken na vaccinatie geeft het een volledige bescherming. Bij ouder pluimvee is de bescherming volledig op 4 weken na vaccinatie. Naast leeftijd is de concentratie van het vaccin-virus van invloed op de mate van bescherming en op de serologische titer die volgt na vaccinatie. Een hogere concentratie geeft een betere bescherming.

Wanneer een gevaccineerde vogel experimenteel geïnfecteerd wordt met een AI-virus dan kan de vogel virus uitscheiden, ondanks dat ze geen klinische symptomen van ziekte vertoont.

Hierin bestaan verschillen tussen vogels die 1 of 2 keer gevaccineerd zijn. Een 2 maal gevaccineerde vogel scheidt na infectie minder virus uit dan een 1 maal gevaccineerde vogel en bij 2 maal gevaccineerde vogels worden na vaccinatie hogere antilichamen titers gevonden. Het lijkt dat 2 maal gevaccineerde vogels beter beschermd zijn, maar in een veldstudie bij de uitbraak in Utah in 1995 werden geen verschillen gevonden tussen 1 en 2 maal gevaccineerd pluimvee in titers of in het optreden van klinische verschijnselen.

Toediening van een olie-emulsie vaccin via een im of sc injectie is specialistisch en tijdrovend werk, gebruik van geïnactiveerd virus is dan ook een kostbare manier van



vaccineren. Geïnactiveerde virussen zijn echter wel relatief gemakkelijk te maken en kunnen goed bewaard worden in een vaccin-bank, waardoor ze snel beschikbaar zijn.

Met antilichamen-tests zijn gevaccineerde vogels niet te onderscheiden van geïnfecteerde vogels. Bij een uitbraak in Italië in 1999-2002 is echter gevaccineerd met een H7N3 virus, terwijl de uitbraak een H7N1 virus betrof. Gevaccineerd pluimvee maakte antilichamen tegen N3 en niet tegen N1, behalve als het gevaccineerd pluimvee geïnfecteerd werd. De N3 en N1 antilichamen zijn te onderscheiden met een immunofluorescentie-test. Dit is de zogenaamde DIVA (differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategie en deze is goedgekeurd door de EU.

(Beard, C., 2000, pp. 18-19; Suarez, D.L., 2000, pp. 16-17; Brugh, M. et al., 1979, 165-169; Frame, D., 2000, pp. 20-21; Stone, H.D., 1987, pp. 483-490; Capua, I., 2002, pp. 47-55)

Leverbaar:

H7N1, H7N3 en 4 andere soorten en DIVA-test, binnen 3 maanden kan elk geïnactiveerd vaccin geproduceerd worden. (Merial)

H7N1. (Intervet)

(echter beide niet in de EU geregistreerd)

### **Recombinant vaccin**

Bij een recombinant vaccin zit het erfelijk materiaal dat codeert voor het haemagglutinine (H-deel) van een AI-virus ingebouwd in het erfelijk materiaal van een ander virus. Dit virus dient als vector, het vector-virus infecteert de gevaccineerde vogel. De vogel maakt hierop antilichamen én afweercellen tegen het vector-virus én tegen het haemagglutinine van AI dat door het vector-virus geproduceerd wordt. Als vector-virus wordt meestal het vogelpokkenvirus gebruikt, maar ook ILT of VEE kunnen als vector dienen.

Het recombinant vaccin biedt een goede bescherming tegen ziekte door een infectie meteen AI-virus van eenzelfde subtype haemagglutinine. De leeftijd van vaccinatie is van invloed op de werkzaamheid. Uit proeven blijkt dat kippen gevaccineerd op een leeftijd van 2 dagen 80% minder sterfte vertonen als ze 10 dagen later een challenge met het virus ondergaan. Wanneer kippen op de eerste levensdag gevaccineerd worden en pas 3 weken later gechallengeerd worden dan sterft er geen. Bij vaccinatie op een leeftijd van 10 dagen of ouder sterven er geen dieren als ze 10 dagen na de vaccinatie een challenge met het virus ondergaan. Een nadeel is dat het recombinant vaccin alleen gebruikt kan worden als de vogel niet eerder geïnfecteerd of gevaccineerd is geweest met het vector-virus. Als dit wel het geval is dan is het afweerstelsel al getriggerd tegen het vector-virus en zal ze het vaccin uitschakelen. Een booster geven kan met recombinant vaccins doorgaans niet, een uitzondering hierop is een VEEvector-virus.

Wanneer gevaccineerde dieren geïnfecteerd worden, dan kan het AI-virus nog wel uitgescheiden worden, terwijl de dieren geen ziekte vertonen en niet sterven. De mate van virus-uitscheiding hangt af van de mate waarin het haemagglutinine van het vaccin en van het veld-virus met elkaar overeen komen. Hoe meer overeenkomst, hoe minder virus er uit de oropharynx geïsoleerd kan worden.

Toediening van een recombinant vaccin vindt plaats via een sc injectie of via de wing-web methode.



Gevaccineerd pluimvee reageert niet positief op een AGP-test of op ELISA omdat het gevaccineerde pluimvee een lagere antilichaam titer heeft dan geïnfecteerd pluimvee. Geïnfecteerd pluimvee wordt wel positief op een AGP-test of ELISA, ook als ze voor de infectie gevaccineerd was. Dit kan gebruikt worden om onderscheid te maken tussen gevaccineerd en geïnfecteerd pluimvee. Om onderscheid te maken kan ook gebruik gemaakt worden van het feit dat gevaccineerd pluimvee geen antilichamen tegen het neuramidase (N-deel) heeft. Gevaccineerd en geïnfecteerd pluimvee kunnen gemakkelijk van elkaar worden onderscheiden door tests uit te voeren.

(Arriola, J.M., 2000, pp. 23-24; Beard, C., 2000, pp. 18-19; Suarez, D.L., 2000, pp. 16-17; Swayne, D.E. et al., 2000, pp. 1088-1095; Boyle, D.B. et al., 2000, pp. 44-48)

Leverbaar:

H5-vogelpokken. (Merial)

(echter niet in de EU geregistreerd en onderhevig aan strikte regelgeving omtrent genetische manipulatie)

### **Subunit vaccin**

Er zijn twee soorten subunit-vaccins: het ene type vaccins bestaat uit een haemagglutinine (H-deel) dat met een adjuvans wordt toegediend. Het haemagglutinine is geproduceerd door baculoviruscellen (dit zijn cellen van een insecten-virus) of door planten. Een ander type subunit-vaccins zijn de DNA-vaccins. Bij deze vaccins is een deel van het erfelijk materiaal van een AI-virus ingebouwd in een bacteriële plasmide. De plasmide kan in de vogelcel het haemagglutinine van het AI-virus tot expressie brengen.

Een gevaccineerde vogel maakt als reactie op het eerste type subunit-vaccins antilichamen. Als reactie op de DNA-vaccins worden zowel antilichamen als afweercellen tegen het AI haemagglutinine gemaakt.

Een subunit-vaccin biedt bescherming tegen symptomen van AI en tegen sterfte door een infectie met een AI-virus die een zelfde subtype haemagglutinine heeft. Het enige in de literatuur gevonden onderzoek laat zien dat van de 5 kippen die op de eerste levensdag gevaccineerd zijn, er geen sterft als ze 3 weken later gechallenged worden.

Wanneer gevaccineerde vogels geïnfecteerd worden dan kan uitscheiding van virus nog optreden. Echter, hoe meer het haemagglutinine van het vaccin en van het veldvirus met elkaar overeen komen, hoe minder uitscheiding er via de oropharynx plaats vindt.

Toediening van een subunit-vaccin vindt plaats via im injectie. Haemagglutinine geproduceerd door planten kan ook toegediend worden door het pluimvee de betreffende planten te voeren.

Er worden alleen antilichamen tegen het haemagglutinine (H-deel) gevormd en niet tegen het neuramidase (N-deel). Hierdoor kunnen gevaccineerde vogels onderscheiden worden van geïnfecteerde vogels.

Door de mogelijkheid tot massale productie van subunit-vaccins hoeven deze vaccins niet duur te zijn.

(Swayne, D.E. et al., 2000, pp. 165-172; Swayne, D.E. et al., 2000, pp. 1088-1095; Suarez, D.L., 2000, pp. 16-17)

Subunit vaccins zijn nog niet verkrijgbaar.



Vanwege de huidige EU regelgeving betreffende lijst A-ziektes en met name AI is het niet mogelijk om enig vaccin tegen AI te registreren. Toepassen van vaccinatie tegen AI mag alleen als de Europese Commissie toestemming geeft. Vooral nog lijkt slechts in uitzonderlijke gevallen vaccinatie met een geïnactiveerd vaccin te worden toegestaan.

## **8. Effect van vaccinatie op virus replicatie**

Alle typen vaccins voorkomen klinische symptomen en sterfte onder AI-gevoelig pluimvee. De vaccins bieden een vrijwel volledige klinische bescherming bij infectie met een homolog virus en bieden een goede bescherming tegen klinische symptomen bij infectie met een heteroloog virus. Het heteroloog virus draagt hetzelfde type haemagglutinine (H) als het vaccin-virus. Welk type vaccin het beste werkt is moeilijk te zeggen. Geïnactiveerde vaccins hebben hun werkzaamheid m.b.t. het induceren van klinische bescherming onder laboratoriumomstandigheden en in het veld al geruime tijd bewezen.

De leeftijd van vaccinatie en concentratie van het vaccin zijn van invloed op de bescherming door het vaccin (Boyle, D.B. et al., 2000 pp. 44-48; Stone, H.D., 1987 pp. 483-490; Swayne, D.E. et al., 2000 pp. 165-172; Brugh, M. et al., 1979, pp. 165-169). Hoe lang een vaccin precies bescherming biedt wordt niet aangegeven, ook is niet duidelijk hoe lang gevaccineerde dieren nog een titer houden tegen het vaccin. Hobbypluimvee wordt over het algemeen ouder dan 3, 4 of 8 weken en zal de leeftijd waarop ze na vaccinatie volledig klinisch beschermd is tegen het AI-virus in ieder geval bereiken. Echter, bij vaccinatie moet er terdege rekening mee worden gehouden dat pluimvee pas na 3-4 weken volledig beschermd is, ongeacht het type vaccin dat gebruikt wordt. In de eerste 3-4 weken na vaccinatie kan het pluimvee nog wel ziek worden bij besmetting met het AI-virus.

Gevaccineerde dieren kunnen met het vogelpest virus geïnfecteerd worden, maar ze worden er in het algemeen niet meer ziek van. In deze vogels kan wel vermeerdering van het virus plaats vinden en ook wordt door een deel van deze vogels het virus uitgescheiden (Arriola, J.M., 2000 pp. 23-24; Beard, C., 2000 pp. 18-19; Bijleveld, H., 2003 pp. 12-13; Boyle, D.B. et al., 2000 pp. 44-48; Capua, I. et al., 2003 pp. 47-55; European Commission, 2000; Karunakaran, D. et al., 1987, pp. 498-503; Swayne, D.E. et al., 2000 pp. 165-172; Swayne, D.E. et al., 2000 pp. 1088-1095; Voeten, A.C., 2003 pp. 10-11; Vries, T.S. de, 2003 pp. 7-8). Dit is het grootste nadeel van vaccinatie.



Tabel 5: Virusisolatie uit swabs genomen op dag 2-3 na challenge, 3-4 weken na vaccinatie.

Virus	Vaccin	Swab	Controle		Gevaccineerd	
			Aantal/tot	Hoeveelheid	Aantal/tot	Hoeveelheid
H7N1 <sup>a,b</sup>	H7N3	Oropharynx	8/10	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup> ELD <sub>50</sub> /ml	1/13	<10 <sup>4E</sup> LD <sub>50</sub> /ml
H7N1 <sup>a,b</sup>	H7N3	Cloaca	10/10	10 <sup>2</sup> -10 <sup>4</sup> ELD <sub>50</sub> /ml	1/13	<10 <sup>4E</sup> LD <sub>50</sub> /ml
H7N3 <sup>b</sup>	H7N3	Oropharynx	20/20	10 <sup>4</sup> ELD <sub>50</sub> /ml	9/20	10 <sup>1.4E</sup> LD <sub>50</sub> /ml
H7N3 <sup>b</sup>	H7N3	Cloaca	19/20	10 <sup>3.2</sup> ELD <sub>50</sub> /ml	4/20	10 <sup>1.2E</sup> LD <sub>50</sub> /ml
H7N1 <sup>b</sup>	H7N1	Oropharynx	10/10		4/10	
H7N1 <sup>b</sup>	H7N1	Cloaca	10/10		4/10	
H5N2 <sup>c</sup>	H5Nxx	Oropharynx	17/20		83/100	10 <sup>1.3</sup> - 10 <sup>4</sup> ELD <sub>50</sub> /ml lager dan controle
H5N2 <sup>c</sup>	H5Nxx	Cloaca	12/20	Laag	<20/100	Laag
H5N2 <sup>c</sup>	H5bac	Oropharynx	5/5		5/5	
H5N2 <sup>c</sup>	H5bac	Cloaca	0/5		0/5	
H5Nx <sup>c,d</sup>	H5pok	Oropharynx	72/80	10 <sup>4.5</sup> (10 <sup>3.2</sup> -10 <sup>6.4</sup> ) ELD <sub>50</sub> /ml	24/90	10 <sup>1.7</sup> (10 <sup>0.9</sup> -10 <sup>4.6</sup> ) ELD <sub>50</sub> /ml
H5Nx <sup>c,d</sup>	H5pok	Cloaca	70/80	10 <sup>2.7</sup> (10 <sup>1.9</sup> -10 <sup>3.9</sup> ) ELD <sub>50</sub> /ml	3/90	10 <sup>0.9</sup> (10 <sup>0.9</sup> -10 <sup>1.0</sup> ) ELD <sub>50</sub> /ml

<sup>a</sup> Capua, I. et al., 2002 pp. 47-55; <sup>b</sup> Goossen van den Bosch, 2003; <sup>c</sup> Swayne, D.E. et al., 2000 pp. 165-172; <sup>d</sup> Swayne, D.E. et al., 2000 pp. 1088-1095

H5bac is een subunit vaccin geproduceerd door baculoviruscellen.

H5pok is een recombinant vaccin met als vector het vogelpokkenvirus.

Tabel 5 laat zien dat verschillende vaccins een reductie veroorzaken in het aantal vogels dat na challenge met een AI virus dit virus uitscheidt. De hoeveelheid uitgescheiden virus is bij een infectie na vaccinatie lager dan bij een infectie van ongevaccineerde dieren. Via de luchtwegen wordt door gevaccineerd pluimvee een 10-1000 maal lagere hoeveelheid virus uitgescheiden, terwijl uit de cloaca 100 keer minder virus geïsoleerd wordt. Uitscheiding via de cloaca is ook in de controle groep 10 keer minder dan via de luchtwegen.

Hoe groot is het werkelijke gevaar van verspreiding van AI-virus door gevaccineerd pluimvee en is er een verschil tussen de typen vaccins? Resultaten uit het onderzoek van Swayne et al. (2000 en 2002) geven aan dat bij vaccinatie met een recombinant vogelpokkenvaccin de virusuitscheiding een reductie ondervindt in dezelfde orde van grootte als bij vaccinatie met geïnactiveerde vaccins (tabel 5). Data van de subunit vaccins zijn verkregen van slechts 5 dieren, waarbij de hoeveelheid uitgescheiden virus niet is gemeten. Wat betreft de reductie in virusuitscheiding lijken de geïnactiveerde vaccins en de recombinant vaccins even goed te werken, naar de werking van subunit vaccin zou meer onderzoek verricht moeten worden.



Er is weinig bekend over het effect van de hoeveelheid virus die door geïnfecteerd gevaccineerd pluimvee uitgescheiden wordt. Capua et al. (2002) plaatsten 5 gevoelige kippen bij 13 kippen die 2 uur daarvoor geïnfecteerd waren met AI (H7N1) en die 2 en 4 weken eerder gevaccineerd waren met geïnactiveerd virus (H7N3). Vanaf 8 tot 13 dagen na het bijplaatsen stierven 4 van de 5 gevoelige kippen. Bij de gevaccineerde kippen werd echter zowel uit de trachea-swabs als uit de cloaca-swabs geen virus geïsoleerd. Hieruit wordt de conclusie getrokken dat vogels die 2 keer gevaccineerd zijn zeer lage hoeveelheden virus uitscheiden, zo laag dat dit niet meer te detecteren is, maar wel kan ze gevoelig pluimvee infecteren. De proef zou echter moeten worden uitgevoerd met gevaccineerde sentinels omdat in de praktijk hele stallen worden gevaccineerd en niet slechts een deel. Dan kan transmissie tussen gevaccineerde dieren bepaald worden.

Als er niet gevaccineerd wordt dan sterft pluimvee 4-6 dagen nadat het in contact is geweest met besmet pluimvee (niet gepubliceerde data). Dit is sneller dan de 8 dagen die nodig lijken voordat pluimvee sterft door contact met besmet gevaccineerd pluimvee. Misschien is de verklaring hiervoor te vinden in de lagere hoeveelheid virus die uitgescheiden wordt door gevaccineerd pluimvee. Of de verklaring ligt in de verschillende subtypen AI die gebruikt zijn. Capua et al. (2002) vaccineerde met H7N3 en infecteerde met H7N1, terwijl voor de niet gepubliceerde data een H5N2 virus gebruikt werd.

Literatuur die aantoont hoeveel virus er nodig is om een vogel met AI te besmetten is niet gevonden, daarom lijkt onderzoek hiernaar gewenst, zeker omdat wel bekend is hoeveel virus geïnfecteerd gevaccineerd pluimvee uitscheidt. De vraag is of de immuniteit die wordt geïnduceerd en de vermindering in virus uitscheiding samen voldoende zijn om verspreiding van het virus te voorkomen. Dit zou moeten worden onderzocht in transmissieproeven

In principe wordt verspreiding van AI door vaccinatie niet voorkomen, maar doordat het aantal uitgescheiden virusdeeltjes sterk wordt verminderd kan vaccinatie de kans op verspreiding wellicht verminderen. Nadeel is dat er bij besmette gevaccineerde dieren geen kliniek van AI meer optreedt, waardoor de kans bestaat dat deze dieren niet geruimd worden en gedurende een langere tijd voor verspreiding van AI kunnen zorgen.



## 9. Gebruik van vaccinatie bij uitbraken van AI elders in de wereld

Geregeld treden ergens in de wereld uitbraken van Aviaire Influenza op. In het algemeen wordt het virus bestreden met vervoersverboden of vervoersbeperkingen en met het ruimen van besmette dieren. De totale aanpak verschilt echter per land. In sommige landen is onder andere vaccinatie opgenomen in de bestrijding van AI. Hier volgt een kort overzicht van de aanpak en het verloop van een uitbraak van AI in 3 verschillende landen. De ervaringen in deze landen en het verloop van de epidemie in Nederland kunnen aanzet zijn tot een discussie over het huidige beleid bij bestrijding van AI en eventuele aanpassingen van het beleid in de toekomst.

### Mexico 1994

In 1994 werd Mexico geconfronteerd met een hoogpathogeen H5N2 AI-virus. Slechts pluimvee dat een positieve virusisolatie had werd geruimd. Er werd een vervoersverbod ingesteld voor pluimvee dat positief testte op AI. Pluimvee mocht alleen vervoerd worden als de koppel 10-14 dagen voor het transport een negatieve uitslag had op de serologische test. Vanaf 1995 werd er gevaccineerd, in eerste instantie enkel met het geïnactiveerde virus, vanaf 1998 was er ook de mogelijkheid om te vaccineren met een recombinant vogelpokken-H5 vaccin. Omdat gevaccineerde koppels pluimvee positief reageren op de serologische testen werden bij de gevaccineerde dieren sentinels (gevoelig pluimvee/verklikkerkippen) geplaatst. Wanneer deze sentinels negatief testten op serologie dan werd toestemming gegeven om de koppel te vervoeren. Door vaccinatie heeft men de uitbraak onder controle gekregen. Er is doorgegaan met vaccineren, ook nadat de uitbraak ten einde was.

(Arriola, J.M., 2000, pp. 23-24; Goossen van den Bosch, 2002)

### Utah 1995

Met name kalkoenen werden in 1995 in een gebied met een hoge concentratie aan kalkoenen (1,9 miljoen besmette kalkoenen in 800 km<sup>2</sup>) getroffen door een hoogpathogeen H7N3 AI-virus. De uitbraak duurde in totaal 19 weken en als voornaamste bronnen van besmetting worden voerlevering en vervoer van levend pluimvee naar de mesterij genoemd. Gedurende de epidemie werden namelijk nog nieuwe dieren uitgebroed en opgelegd. Ook deze nieuw opgelegde dieren werden besmet met AI. Er werd geen totale depopulatie nagestreefd omdat dit financieel niet op te brengen zou zijn voor de kalkoen-industrie in Utah. Vanaf de 12<sup>e</sup> week in de uitbraak werd er gevaccineerd met geïnactiveerd H7N3-Pakistan95. Verspreid over het gebied werden sentinels tussen de gevaccineerde dieren geplaatst. Deze sentinels werden regelmatig met serologische testen onderzocht op AI, maar zijn nooit positief bevonden. Klinische symptomen, nog seroconversie in sentinels traden op ongeacht of de koppel 1 of 2 keer gevaccineerd was. Het aantal nieuwe besmette bedrijven liep al terug voordat er met vaccineren werd begonnen, maar men is ervan overtuigd dat vaccinatie heeft bijgedragen aan het onder controle krijgen van de epidemie, mede omdat ervaringen met infecties van laagpathogeen AI lieten zien dat het virus langdurig rond blijft circuleren als er geen maatregelen genomen worden.

(Frame, D., 2000, pp. 20-21; Goossen van den Bosch, 2003)



### **Italië 1999**

Een gebied met een hoge concentratie aan pluimvee (tot wel 70.000 dieren per km<sup>2</sup>) werd van maart 1999 tot maart 2001 getroffen door 4 golven van AI uitbraken. Van maart 1999 tot december 1999 woedde een laagpathogeen H7N1 AI-virus. Dit virus muteerde tot een hoogpathogeen H7N1-virus dat het pluimvee vanaf december 1999 besmette. In augustus 2000 dook een nieuw laagpathogeen AI-virus op dat door woedde tot in november 2000. Hierna circuleerde van december 2000 tot maart 2001 een laagpathogeen H7N1 AI-virus onder het pluimvee. In oktober 2002 werd in hetzelfde gebied een laagpathogeen H7N3 AI-virus geïsoleerd in pluimvee.

Tegen het eerste laagpathogene virus werden geen bestrijdings-maatregelen getroffen. Er werd alleen een vervoersverbod ingesteld voor besmet pluimvee en pluimvee in de ‘omgeving’ van besmet pluimvee. Het eerste laagpathogene virus besmette zo’n 199 koppels pluimvee, waarvan 164 koppels vleeskalkoenen (stand november 1999). Het hier op volgende hoogpathogene virus besmette 412 koppels pluimvee. Het hoogpathogene virus werd bestreden met ‘stamping out’: ruiming van besmette bedrijven en van bedrijven in de 1 km zone rondom een besmet bedrijf, een vervoersverbod en een exportverbod in de besmette gebieden.

Vanaf november 2000 tot mei 2002 werd er gevaccineerd met geïnactiveerd H7N3-Pakistan95, nadat het hoogpathogene AI-virus verdwenen was. Tussen gevaccineerde dieren werden in elke stal 50 sentinels geplaatst, die getest werden op serologie en virusisolatie. Vanaf december 2002 werd er ook gevaccineerd met geïnactiveerd H7N1. De Europese Commissie heeft toegestemd om tegen deze laagpathogene AI-virussen te vaccineren met een heteroloog vaccin, zodat onderscheid gemaakt kan worden tussen wel en niet gevaccineerd pluimvee. Dit onderscheid werd gemaakt met een immunofluorescentie-test, dit is de zogenaamde DIVA (differentiating Infected from Vaccinated Animals) methode.

(Goossen van den Bosch, 2002; Goossen van den Bosch, 2003; Capua, I et al., 2000; Capua, I. et al., 2002, pp. 47-55; Wright, C., 2000; Midday Express EU pres and Communication service’s, 2002)



## 10. Discussie

Vaccinatie is een goede manier om te voorkomen dat een individuele vogel ziek wordt ten gevolge van een infectie met AI-virus. Alle typen vaccins voorkomen klinische symptomen en sterfte onder AI-gevoelig pluimvee. Geïnfecteerd gevaccineerd pluimvee kan virus uitscheiden terwijl ze zelf geen symptomen van ziekte vertoont. Hieruit wordt vaak geconcludeerd dat gevaccineerd pluimvee een gevaar vormt voor de onopgemerkte verspreiding van vogelpest. Er is echter weinig bekend over het effect van de hoeveelheid virus die door geïnfecteerd gevaccineerd pluimvee uitgescheiden wordt. Capua et al. (2002) concludeerden dat vogels die 2 keer gevaccineerd zijn zeer lage hoeveelheden virus uitscheiden, zo laag dat dit niet meer te detecteren is, maar wel kan ze gevoelig pluimvee infecteren. De proef zou echter moeten worden uitgevoerd met gevaccineerde sentinels omdat in de praktijk hele stallen worden gevaccineerd en niet slechts een deel. Dan kan transmissie tussen gevaccineerde dieren bepaald worden. Literatuur die aantoonde hoeveel virus er nodig is om een vogel met AI te besmetten is niet gevonden, daarom lijkt onderzoek hiernaar gewenst, zeker omdat wel bekend is hoeveel virus geïnfecteerd gevaccineerd pluimvee uitscheidt.

De vraag is of de immuniteit die wordt geïnduceerd en de vermindering in virus uitscheiding samen voldoende zijn om verspreiding van het virus te voorkomen. Dit zou moeten worden onderzocht in transmissieproeven. Het is best mogelijk dat als geïnfecteerde gevaccineerde dieren minder virus uitscheiden en gevaccineerde contact dieren een hogere dosis nodig hebben om geïnfecteerd te kunnen worden, dit leidt tot stopzetten van verspreiding. Alleen als een vaccin tegen AI dit vermogen heeft zou het kunnen worden ingezet bij een epidemie.

Stel dat gevoelig pluimvee doorgaans besmet raakt als ze bij geïnfecteerd en gevaccineerd pluimvee geplaatst wordt, dan is het nog de vraag hoe dit naar situaties in het veld vertaald moet worden. In het veld zou de strategie bij een uitbraak van AI kunnen zijn dat besmette bedrijven geruimd worden en dat pluimvee in de omgeving gevaccineerd wordt. Dit gevaccineerde pluimvee raakt misschien besmet en scheidt wat virus uit, maar dit is wel 100 tot 1000 maal minder virus dan in een situatie waarin niet gevaccineerd wordt. Ook hierbij zal gelden dat een commercieel bedrijf door het grote aantal stuks pluimvee, meer virus uit zal scheiden dan een hobbypluimvee-bedrijf met gemiddeld 10 stuks pluimvee.

Kan een gevaccineerd commercieel gehouden koppel voldoende virus uitscheiden om een ander pluimvee bedrijf te infecteren? Kan geïnfecteerd en gevaccineerd hobbypluimvee zodanig veel virus produceren dat ze een ander pluimvee bedrijf besmet? Ook hiervoor zijn transmissieproeven nodig, als transmissie niet optreedt binnen een koppel, dan zal dit waarschijnlijk ook niet tussen bedrijven gebeuren. Een aanwijzing voor een antwoord op de eerste vraag kan gevonden worden in de uitbraak in Italië (1999-2000). Een deel van het pluimvee had antilichamen tegen het laagpathogene H7N1 virus dat eerder was verspreid, maar ondanks dit kon het hoogpathogene H7N1 virus zich verspreiden (European Commission, 2000; Capua, I., 2000; Goossen van den Bosch 2002). Om gedegen antwoorden te kunnen geven zal hier onderzoek naar gedaan moeten worden. Alleen dan kan onderbouwd worden of vaccinatie van pluimvee zinvol is bij



bestrijding van vogelpest en of het vervolgens wel of niet nodig zal zijn om gevaccineerd pluimvee alsnog te ruimen. Hierbij moet niet vergeten worden dat hobbypluimvee over het algemeen geen beroepsmatige contacten heeft met de commerciële pluimveehouderij. In deel een van dit werk wordt aangegeven dat hobbypluimvee bij de uitbraak in 2003 wellicht een verwaarloosbare rol heeft gespeeld in de verspreiding van AI.

Vaccinatie bij een uitbraak van hoogpathogene AI lijkt verspreiding van het virus tegen te kunnen werken (zie Mexico en Utah). Kanttekening hierbij is dat in Utah ten tijde van de vaccinatie de uitbraak over de top heen was, misschien had de uitbraak ook zonder vaccinatie op dezelfde manier geëindigd. Echter, er werden in Utah nieuwe gevoelige dieren uitgebreed, die vervolgens gevaccineerd werden. Als deze dieren niet gevaccineerd zouden zijn, dan zouden ze een zeer grote kans lopen om toch weer besmet te raken en had de uitbraak niet geëindigd. Toch moet benadrukt worden dat 'biosecurity'-maatregelen als een hygiëneprotocol en beperking van contacten en vervoer van groot belang zijn en vaccinatie dus alleen als extra maatregel moet kunnen worden ingezet (European Commission, 2000; Arriola, J.M., 2000, pp. 23-24). In Europa wordt een uitbraak van hoogpathogeen AI bestreden door stamping out. Een goed uitgevoerd stamping out beleid zou een hoogpathogeen virus moeten stoppen, omdat alle gevoelige dieren in de omgeving geruimd worden. Maar in de praktijk bleek dit in de bedrijfsdichte gebieden in Nederland niet voldoende te zijn om de epidemie te stoppen

De Europese commissie is van mening dat er, als er wel gevaccineerd zou worden, een risico bestaat dat het virus zich ongemerkt verspreidt. Hiernaast wil men de export van producten uit de pluimveesector veilig stellen. Producten van gevaccineerd pluimvee zouden immers besmet kunnen zijn met AI, een reden waarom landen die vrij zijn van hoogpathogeen AI deze producten kunnen weigeren.

Op diverse plaatsen in de wereld wordt vaccinatie tegen laagpathogeen AI-virus toegepast. Vaak omdat het laagpathogene virus ook schade kan aanrichten (Boyle, D.B. et al., 2000 pp. 44-48). De Europese Commissie heeft in december 2002 hier zelfs in toegestemd voor de situatie in Italië. Goedkeuring vond plaats op basis van bestrijding van het laagpathogene virus om mutatie naar een hoogpathogeen virus te voorkomen (Midday express, 2002). Een continue vaccinatie tegen AI zal een uitbraak van hoogpathogeen AI-virus niet kunnen voorkomen. Er circuleren veel verschillende typen AI in de wereld, met name onder watervogels en het is niet te voorspellen welk type voor een uitbraak van klassieke vogelpest zal zorgen, de ene keer zal dit bijvoorbeeld een H5N3 zijn en de andere keer een H7N1 (Beard, C., 2000 pp. 18-19; Halvorson, D.A., 2002 pp. 5-12; Perdue, M.L., 2000 pp. 9-10).

Vaccinatie tegen hoogpathogeen AI-virus is een beslissing die in de politiek genomen zal moeten worden, maar voorlopig zal dit voornamelijk wegens export belangen niet toegestaan worden. Ook spelen de directe kosten van vaccinatie, naast gedeelde opbrengsten van de export, een rol. Bij vaccinatie wordt het vaccin aan elke kip individueel toegediend, wat erg arbeidsintensief is. De laatste jaren speelt echter ook de publieke opinie een steeds grotere rol. Het afmaken en vernietigen van grote aantallen gezonde dieren ten behoeve van de bestrijding van een besmettelijke dierziekte wordt niet zonder meer geaccepteerd, zeker niet als er ook een werkzaam vaccin voor handen is. Want is het doden van deze gezonde dieren wel ethisch verantwoord? Wegen



exportbeperkingen en een mogelijk risico voor volksgezondheid hier tegenop? Om dit beleid te veranderen zou wereldwijd op een kritische discussie aangedrongen moeten worden. Voor dieren die eigenlijk niets met de export van producten uit de commerciële veehouderij te maken hebben zou een ander beleid ingesteld kunnen worden, waarbij ook overwogen kan worden om deze dieren niet te vaccineren en niet te ruimen of alleen commerciële bedrijven te vaccineren.

Voor hobbypluimvee wordt in de Europese wetgeving geen uitzondering gemaakt. Echter, met de conclusies uit deel I van dit verslag in de hand, valt te overwegen of vaccinatie wel nodig is als hobbypluimvee maar een kleine kans heeft om besmet te raken en als blijkt dat ze vrijwel niet bijdraagt aan verspreiding van het virus. Er valt te discussiëren over het gevaar van gevaccineerd hobbypluimvee. Het is denkbaar dat eventueel gevaccineerd hobbypluimvee wel besmet raakt en niet geruimd wordt omdat ze geen symptomen vertoont. Als echter blijkt dat besmet hobbypluimvee AI vrijwel niet verspreidt, dan zal besmet gevaccineerd pluimvee dit ook niet doen. Een kanttekening hierbij is dat deze klinisch niet zieke dieren langer in leven blijven en mogelijk een langere tijd virus uitscheiden, echter het effect hiervan is niet onderzocht.

Een andere optie is hobbypluimvee niet vaccineren en niet ruimen, omdat ze (zie deel I) waarschijnlijk een verwaarloosbare rol speelt in de verspreiding van AI en op deze wijze bij een mogelijke infectie toch symptomen vertoont en alsnog geruimd kan worden.



## 11. Conclusies

Vaccinatie geeft een goede klinische bescherming van het pluimvee tegen een AI-virus met hetzelfde heamagglutinine deel en werkt nog beter als ook het neuramidase deel van het vaccin overeenkomt met het veld virus. Gevaccineerde dieren vertonen na infectie geen symptomen, maar kunnen wel het AI-virus uitscheiden en mogelijk verspreiden. In laboratoriumproeven blijkt dat het aantal dieren dat het virus uitscheidt door vaccinatie minder is en dat ook de hoeveelheid uitgescheiden virus 100-1000 maal lager is.

Er is nog weinig bekend over de mogelijkheid dat deze gevaccineerde en geïnfecteerde dieren ander gevoelig pluimvee in de directe omgeving kunnen besmetten en er is niet bekend of deze dieren gevoelig pluimvee in een andere stal kunnen besmetten. Extrapolatie naar de situatie in het veld is nog niet mogelijk en vereist onderzoek.

Bij uitbraak van een hoogpathogeen AI-virus zou vaccinatie de verspreiding van het virus kunnen remmen, maar of dit echt gebeurt is nog niet onderzocht. Continue vaccinatie tegen een hoogpathogeen AI-virus lijkt niet zinvol, omdat het niet te voorspellen is welk type AI-virus voor een uitbraak van klassieke vogelpest zal zorgen. Vaccinatie tegen AI in de EU is verboden. Slechts eenmalig heeft de EU een uitzondering gemaakt: het vaccineren tegen een laagpathogeen AI-virus met een geïnactiveerd olie-emulsie vaccin in Italië is goedgekeurd, mede omdat er gevaccineerd wordt met een heteroloog vaccin waardoor onderscheid gemaakt kan worden tussen gevaccineerde en geïnfecteerde dieren m.b.v. een immunofluorescentietest, de zogenaamde DIVA strategie (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) Laagpathogeen AI is geen lijst A-ziekte, maar er zijn wel plannen om deze LPAI stammen op dezelfde manier te bestrijden als HPAI.



## Literatuurlijst

1. Alexander, D.J., *A review of avian influenza in different bird species*, Veterinary Microbiology, 74 (2000) pp. 3-13.
2. Alexander, D.J., *The history of avian influenza in poultry*, World Poultry, Elsevier special '00, (2000) pp. 7-8.
3. Arriola, J.M., *The Mexican experience*, World Poultry, Elsevier special '00, (2000) pp. 23-24.
4. Beard, C., *Vaccination can help to control AI*, World Poultry, Elsevier special '00, (2000) pp. 18-19.
5. Bijleveld, H., *Acht argumenten tegen enten*, Pluimveehouderij, thema vogelpest in Nederland, 16 (2003) pp. 12-13.
6. Bosch, G. van den, *Overview actual Avian Influenza situation in the world*, Synbiotics lecture, (2002).
7. Bosch, G. van den, *Avian Influenza*, Intervet lecture, (2003).
8. Boven, M. van, Boender, G.J., Elbers, A., Nodelijk, G., Jong, M. de, Dekker, A., Koch, G., Stegeman, A., *Epidemiologische consequenties van vaccinatie*, (2003).
9. Boyle, D.B., Selleck, P., Heine, H.G., *Vaccinating chickens against avian influenza with fowlpox recombinants expressing the H7 haemagglutinin*, Aust. Vet. J., vol 78 no 1 jan (2000) pp. 44-48.
10. Brugh, M. et al., *Immunisation of chickens and turkeys against avian influenza with monovalent and polyvalent oil emulsion vaccines*, American Journal of Veterinary Research, 40 feb (2) (1979) pp.165-169.
11. Capua, I., Grossele, B., Bertoli, E., and Cordioli, P., *Monitoring for highly pathogenic avian influenza in wild birds in Italy*. The Veterinary Record, nov 25 (2000) p. 640.
12. Capua, I., Terrregino, C., Cattoli, G., Mutinelli, F., Rodriguez, J.F., *Development of a DIVA (Differentiating Infected from Vaccinated Animals) strategy using a vaccine containing a heterologous neuramidase for the control of avian influenza*, Avian Pathology, 32 (2002) pp. 47-55.



13. European Commission, *The definition of avian influenza, the use of vaccination against avian influenza*, Scientific committee on animal health and animal welfare, draft report for possible adoption on 27 june (2000).
14. Frame, D., *H7N3 outbreak halted by vaccine*, World Poultry, Elsevier special '00, (2000) pp. 20-21.
15. Halvorson, D.A., *The control of H5 or H7 mildly pathogenic avian influenza: a role for inactivated vaccine*, Avian Pathology, feb 31 (1) (2002) pp. 5-12.
16. Hopp, M., *Avian influenza, human - Netherlands (12)*, Pubmed-mail, apr. 25 (2003), WHO.
17. Karunakaran, D., Newman, J.A., Halvorson, D.A., Abraham, A., *Evaluation of inactivated influenza vaccines in market turkey*, Avian Dis, jul-sep 31 (3) (1987) pp. 498-503.
18. Midday Express EU press and communication service's, *Avian influenza-Italy*, dec 12 (2002).
19. Nes, A. van, Jong, M.C.M. de, Buijtels, J.A.A.M., and Verheijden, J.H.M., *Implications derived from a mathematical model for eradication of pseudorabies virus*, Prev. Vet. Med. 33 (1998), 39-58.
20. Nestorowicz, A. et al., *Molecular analysis of the hemagglutinin genes of Australian H7N7 influenza viruses: role of passerine birds in maintenance or transmission*, Virology, oct 160 (2) (1987) pp. 411-418.
21. Perdue, M.L., *How can a virus suddenly become very pathogenic?*, World Poultry, Elsevier special '00, (2000) pp. 9-10.
22. Stone, H.D., *Efficiency of avian influenza oil-emulsion vaccines in chickens of various ages*, Avian Dis, jul-sep 31 (3) (1987) pp. 483-490.
23. Suarez, D.L., *Bright future for AI vaccines*, World Poultry, Elsevier special '00, (2000) pp. 16-17.
24. Swayne, D.E., Garcia, M., Beck, J.R., Kinney, N., Suarez, D.L., *Protection against diverse highly pathogenic H5 avian influenza viruses in chickens immunized with a recombinant fowlpox vaccine containing an H5 influenza hemagglutinin gene insert*, Vaccine, 18 (2000) pp. 1088-1095.
25. Swayne, D.E., Perdue, M.L., Beck, J.R., Garcia, M., Suarez, D.L., *Vaccines protect chickens against H5 highly pathogenic avian influenza in the face of*



- genetic changes in field viruses over multiple years*, Vet Microbiology, 74 (2000) pp. 165-172.
26. Tollis, M., Trani, L. di., *Recent developments in avian influenza research: epidemiology and immunoprophylaxis*, The Veterinary Journal, 164 (2002) pp. 202-215.
27. Voeten, A.C., *Enten lijkt de beste mogelijkheid*, Pluimveehouderij, thema vogelpest in Nederland, 16 (2003) pp. 10-11.
28. Vries, T.S. de, *Verspreiding voorkomen*, Pluimveehouderij, thema vogelpest in Nederland, 16 (2003) pp. 7-8.
29. Wright, C., *Avian influenza-Italy*, Promed-mail, march 3 (2000).

