

## NEDERLANDSE SAMENVATTING

Een groot deel van de infectieziekten die in mensen voorkomt, is afkomstig uit het dierenrijk, zoals HIV/AIDS, SARS, Ebola en recentelijk H7N9 influenza. Omdat deze zogenaamde zoönosen een serieuze bedreiging kunnen vormen voor de mens, is het belangrijk om meer inzicht te krijgen in de ecologie en de overdracht van deze ziekteverwekkers in hun natuurlijke (in het wild levende) gastheren. Het ontrafelen van de ecologische processen die ten grondslag liggen aan de dynamiek van ziekteverwekkers in wilde dieren kan namelijk belangrijk zijn om adequate controlerende maatregelen te ontwikkelen, bijvoorbeeld om te voorkomen dat nieuwe ziekten ontstaan en zich verspreiden naar andere gastheren.

De zoönotische ziekteverwekkers bestudeerd in dit proefschrift zijn aviaire influenza virussen (AIV), ofwel vogelgriepvirussen. Het laag pathogene fenotype van deze ziekteverwekker (laag pathogene aviaire influenza virussen, LPAIV, genoemd) circuleert van nature in wilde vogels. Watervogels behorend tot de orde *Anseriformes* (eenden, zwanen en ganzen) en *Charadriiformes* (meeuwen, sternen en steltlopers) vormen het natuurlijke reservoir van LPAIV. Bijna alle LPAIV subtypen, d.w.z. alle combinaties van twee belangrijke oppervlakte-eiwitten die het genetisch materiaal van het virus omhullen, hemagglutinine (H1-H16) en neuraminidase (N1-N9), zijn gevonden in watervogels. LPAIV veroorzaakt kortstondige infecties in watervogels, vooral in de darmen, met geen of weinig ziekteverschijnselen. Na introductie in pluimvee kunnen LPAIV subtypen H5 en H7 hoog pathogeen worden (hoog pathogene aviaire influenza virussen, HPAIV, genoemd) hetgeen dan resulteert in ziekte-uitbraken. Deze ziekte-uitbraken, voorheen bekend als 'vogelpest', kunnen 100% sterfte veroorzaken in onbeschermden groepen pluimvee en kunnen ook ziekte en incidentele sterfgevallen bij mensen en wilde vogels teweegbrengen. Eén van de meest bekende HPAIV uitbraken in de recente geschiedenis is veroorzaakt door een variant van het H5N1-virus welke voor het eerst werd ontdekt in Azië in 1996. Deze uitbraken leidde tot op heden tot het wereldwijd ruimen van honderden miljoenen pluimvee en kostte bijna 400 mensen het leven. In de laatste 10 jaar zijn er meer dan 150 uitbraken van HPAIV in pluimvee gemeld uit diverse landen over de gehele wereld.

Onlangs werd duidelijk dat niet alleen HPAIV, maar ook LPAIV een ernstige bedreiging kan vormen voor de mens. De uitbraak van LPAIV H7N9 in China heeft geleid tot meer dan 100 sterfgevallen sinds de eerste ontdekking in februari 2013, terwijl wilde vogels en pluimvee geen duidelijke ziektesymptomen laten zien. De rol van wilde vogels in de wereldwijde verspreiding van HPAIV en, tot op zekere hoogte, ook LPAIV, is nog grotendeels onduidelijk, hoewel hun bijdrage aan de verspreiding van deze besmettelijke ziekte al vaak is gesuggereerd. Ook gezien de potentie van

vogelgriepvirussen om zich te ontwikkelen tot epidemische ziekteverwekkers in mens en pluimvee is het van groot maatschappelijk belang om de rol van wilde vogels in de dynamiek van deze ziekteverwekkers te verduidelijken.

Om onze kennis te vergroten van de ecologische processen die ten grondslag liggen aan de epidemiologie van LPAIV in wilde vogels hebben we de gastheer-ziekteverwekker interactie onderzocht tussen een belangrijke vrijlevende LPAIV gastheer, de wilde eend (*Anas platyrhynchos*), en LPAIV. Wilde eenden zijn vaak geïnfecteerd met LPAIV en herbergen bijna alle LPAIV subtypen die tot op heden in vogels zijn gevonden. Net als andere watervogels, vertonen wilde eenden weinig tot geen tekenen van ziekte als ze experimenteel worden geïnfecteerd met LPAIV. Ook vanuit het oogpunt van HPAIV zijn wilde eenden belangrijke studieobjecten omdat ze nauw verwant zijn aan de gedomesticeerde Pekingeend (*Anas platyrhynchos domesticus*). Tevens kunnen wilde eenden asymptomatisch reageren als ze experimenteel worden geïnfecteerd met HPAIV. Ook vanuit praktisch oogpunt zijn wilde eenden een ideaal studieobject, omdat ze traditioneel worden gevangen in zogenaamde eendenkooien (een stelsel van vangpijpen aangesloten op een grote vijver).

In een eendenkooi in de buurt van Oud Alblas in de Alblasserwaard (51°52'38"N, 4°43'26"E) in Nederland werden gedurende een volledige jaarcyclus wilde eenden gevangen en bemonsterd om de onderliggende mechanismen van de seizoens-dynamiek van LPAIV infecties in wilde vogels te onderzoeken. Ook de rol van migrerende (trekkende) en niet-migrerende (residente) wilde eenden in een LPAIV epidemie werd zo onderzocht, als ook het testen van verbanden tussen LPAIV infectie en lichaamsgewicht, immuun status en gedrag van wilde eenden. Wilde eenden in Europa zijn deeltrekkers wat betekent dat de populatie bestaat uit trekkende en residente individuen. In het najaar en winter mengen deze twee populaties in de overwinteringsgebieden zoals Nederland, wat het mogelijk maakt om de rol van trekkende en residente gastheer populaties in de dynamiek van LPAIV infecties te bestuderen.

Om de herkomst van de wilde eenden te bepalen hebben we isotopenratio's in hun veren gemeten. De geografische locatie waar individuele vogels hun veren hebben geruid kan worden afgeleid van de isotopenratio van waterstof ( $\delta^2\text{H}$ ) in deze veren. Deze techniek is gebaseerd op het principe dat  $\delta^2\text{H}$  in veren nauw gecorreleerd is met  $\delta^2\text{H}$  in neerslag. Gedurende de periode van veergroei wordt regenwater doorgegeven via de voedselketen en opgenomen in veren. Een kalibratiecurve is nodig om  $\delta^2\text{H}$  in veren te converteren naar  $\delta^2\text{H}$  in neerslag om zo een  $\delta^2\text{H}$  veren isoscape (d.w.z. een landkaart met isotopenwaardes) te maken om daarmee de ruilocatie van individuele vogels te bepalen. Op 38 verschillende locaties in 14 Europese landen hebben we veren van jonge wilde eenden verzameld en deze geanalyseerd op  $\delta^2\text{H}$  om daarmee een Europese  $\delta^2\text{H}$  veren isoscape specifiek voor wilde

eenden te maken (Hoofdstuk 2). We vergeleken onze wilde eenden kalibratiecurve met een bestaande kalibratiecurve welke gebaseerd was op veermonsters van verschillende soorten, leeftijdscategorieën en jaren. Factoren zoals soort, leeftijd en jaar kunnen mogelijke variatie in een kalibratiecurve en een isoscape veroorzaken en daarmee de nauwkeurigheid van de bepaling van de herkomst van individuele dieren. Zoals te verwachten leverde onze wilde eend kalibratiecurve een hogere coëfficiënt van herkomst op en was deze nauwkeuriger in het vaststellen van de herkomst van wilde eenden dan de bestaande kalibratiecurve. De winst in nauwkeurigheid met het maken van een soort, leeftijd en jaar specifieke kalibratiecurve was echter gering en voor veel vervolgstudies aan andere vogelsoorten zijn de bestaande kalibratiecurven van voldoende kwaliteit.

Na de ontdekking van HPAIV H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> zijn er, als een soort vroegtijdig waarschuwingssysteem, over de hele wereld surveillance programma's geïnitieerd waarbij wilde vogels voor dit virus werden bemonsterd. Vaak werden de vogels niet alleen voor H<sub>5</sub>N<sub>1</sub> maar ook op andere subtypen getest. Door middel van deze surveillances werd vastgesteld dat op het noordelijk halfrond LPAIV infecties in vrijlevende eenden een opvallende seizoensvariatie vertonen. Echter, door de aard van deze surveillance programma's was dit patroon voornamelijk gebaseerd op een compilatie van gegevens uit afzonderlijke studies, die vaak gericht waren op slechts een enkel seizoen en waarbij een breed scala aan eendensoorten op tamelijk opportunistische wijze was bemonsterd. Om deze temporele dynamiek van LPAIV infecties in een belangrijke gastheer (wilde eend) zonder de eerder genoemde tekortkomingen te bestuderen, hebben we op uitvoerige wijze wilde eenden bemonsterd op een kleine ruimtelijke schaal (in één eendenkooi) gedurende een gehele jaarcyclus, waarbij zowel huidige infecties (d.w.z. LPAIV prevalentie) als ook historische infecties (d.w.z. de prevalentie van antistoffen tegen vogelgriepvirussen) werden geëvalueerd. Aldus toonden we aan dat er in de zomer een kleine LPAIV infectiepiek is en een dominante infectiepiek in het najaar, terwijl de prevalentie van antistoffen tegen vogelgriepvirussen piekt in de winter en in het voorjaar (Hoofdstuk 3).

De zomer LPAIV infectiepiek werd waarschijnlijk veroorzaakt door de aanwas van immunologisch naïeve, jonge eenden (Hoofdstuk 3). Deze jonge eenden waren vaker geïnfecteerd, scheden grotere hoeveelheden virus uit en hadden minder antistoffen tegen vogelgriepvirussen dan oudere vogels. Toch ontdekten wij dat in deze periode bijna de helft van de eieren van wilde eenden maternale antistoffen tegen vogelgriepvirussen ontvingen (Hoofdstuk 6). Maternale antistoffen worden overgedragen van moeders op hun nakomelingen om hun pasgeborenen bescherming te geven tegen infectie van ziekteverwekkers. Daarnaast vonden wij dat de concentratie van antistoffen tegen vogelgriepvirussen in het eigeel positief gecorreleerd waren met circulerende concentraties van antistoffen

tegen vogelgriepvirussen in de vrouwtjes waarvan de eieren afkomstig waren, en positief gecorreleerd waren met de volgorde waarin de eieren waren gelegd. Lichaamsgewicht van vrouwtjes, grootte van het ei en het geslacht van het embryo waren niet geassocieerd met de concentraties van maternale antistoffen tegen vogelgriepvirussen in de eieren. Dat een groot deel van de eieren van wilde eenden maternale antistoffen tegen vogelgriepvirussen had suggereert dat deze antistoffen een belangrijke rol kunnen spelen in de dynamiek van LPAIV infecties in vrijlevende wilde eenden.

De grote LPAIV infectiepiek die we in het najaar vonden werd waarschijnlijk veroorzaakt door de aankomst van vatbare, trekkende wilde eenden in het overwinteringsgebied (Hoofdstuk 3). Zowel trekvogels die van ver als ook van korte afstand kwamen waren vaker geïnfecteerd dan residente wilde eenden. Ook hadden trekkende individuen weinig antistoffen tegen vogelgriepvirussen. Hoewel deze studie is uitgevoerd op één locatie en op een kleine ruimtelijke schaal, hebben we, met behulp van resultaten van een aanvullend onderzoek twee jaar later, kunnen aantonen dat de waargenomen patronen van LPAIV prevalentie in het najaar en in de winter in onze eendenkooi representatief waren voor de dynamiek van LPAIV infecties in vrijlevende wilde eenden elders in Nederland (Box 8.1).

Om te beoordelen of de hierboven voorgestelde mechanismen inderdaad een rol spelen in het verklaren van de dynamiek van LPAIV infecties in wilde vogels, gebruikten we een epidemiologisch model waarbij we onderscheid maakten tussen trekvogels, residente jongen en residente oudere vogels (Box 8.2). Dit model stelde ons in staat om parameter instellingen te vinden die de dynamiek van LPAIV infecties in deze drie subpopulaties konden nabootsen. Een dergelijk resultaat werd alleen behaald indien we in het model de volgende aspecten opnamen: (i) een constante doortrek (verversing) van trekvogels, (ii) korte termijn immuniteit van de gastheer en (iii) aparte virus transmissiesnelheden voor trekvogels, residente jongen en residente oudere vogels. Het model onderschrijft dus de veronderstelde rol van jongen en trekvogels als belangrijke factoren in de epidemiologie van LPAIV in ons studiegebied en ofschoon deze oefening geen daadwerkelijke test van deze factoren is, is het echter wel een stimulans voor verder empirisch onderzoek naar gastheer-demografie en LPAIV ecologie en epidemiologie in wilde vogels.

Voortbordurend op de hierboven vermelde bevindingen gebruikten we een veelzijdige en interdisciplinaire benadering om de rol van trekkende en residente gastheren in de introductie en handhaving van een specifieke LPAIV epidemie in het najaar verder onder de loep te nemen (Hoofdstuk 4). Deze epidemie werd veroorzaakt door een H<sub>3</sub> LPAIV subtype. Tijdens de LPAIV epidemie werden korte- en lange-afstand trekkers van wilde eenden vaker geïnfecteerd met H<sub>3</sub> LPAIV dan residente individuen, terwijl residenten meer virus uitscheden aan het begin van de epidemie. H<sub>3</sub>-specifieke antistoffen

werden gevonden in slechts een paar trekkende en residente wilde eenden. Deze resultaten suggereren dat de LPAIV epidemie in het najaar waarschijnlijk was geïnitieerd door een enkele introductie van H3 LPAIV in vatbare residenten, gevolgd door virusreproductie die voor een belangrijke mate gecorreleerd was met de toestroom van trekkende wilde eenden. Deze bevindingen suggereren dat trekkende individuen de LPAIV epidemie in het najaar aandrijven (Hoofdstuk 3) en fungeren als lokale versterkers van het virus door het handhaven van deze epidemie (Hoofdstuk 4). Maar of trekkende individuen ook fungeerden als vector, door het introduceren van nieuwe LPAIV lijnen is minder duidelijk.

Het wordt vaak verondersteld dat wilde eenden asymptomatische dragers zijn van LPAIV, omdat ze nauwelijks ziekteverschijnselen vertonen als ze experimenteel geïnfecteerd worden. Echter, of dit ook het geval is in vrijlevende wilde eenden is grotendeels onbekend. Om deze reden onderzochten we mogelijke effecten van LPAIV infectie op lichaamsgewicht en immuun status van vrijlevende wilde eenden gedurende de jaarlijkse LPAIV infectiepiek in het najaar (Hoofdstuk 5). Immuun status werd bepaald met behulp van vijf immunologische indexen. Lichaamsgewicht verschilde niet tussen LPAIV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde individuen. Ongeacht of ze nu geïnfecteerd waren of niet, hadden korte- en lange- afstand trekkers een lager gewicht dan residenten. Hoewel er specifieke verschillen tussen de seksen en migratie strategieën waren, verschilden immunologische indexen niet of slechts marginaal tussen LPAIV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde individuen. Deze zwakke associaties tussen LPAIV infectie en lichaamsgewicht en immuun status van vrijlevende wilde eenden kan worden beschouwd als onderbouwing van hun rol als asymptomatische dragers van LPAIV; dit werpt het intrigerende idee op dat ze het gevolg kunnen zijn van gastheer-pathogeen co-evolutie, hetgeen de vermeende rol van wilde eenden als een belangrijk reservoir van LPAIV zou kunnen verklaren.

Om verder te onderzoeken of wilde eenden echt asymptomatische dragers zijn van LPAIV hebben we een model gebruikt om de (lokale) overleving van LPAIV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde residente wilde eenden te bepalen tijdens de infectiepiek in het najaar (Box 8.3). We vonden geen verschil in overleving tussen LPAIV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde wilde eenden. Echter, de kans om de eenden terug te vangen was wel hoger voor LPAIV geïnfecteerde wilde eenden, wat suggereert dat geïnfecteerde vogels dichter bij het studiegebied bleven, wat in overeenstemming is met de bevindingen van Hoofdstuk 7 (zie onder).

Om nog meer inzicht te krijgen in de rol van wilde vogels in de verspreiding van LPAIV onderzochten we mogelijke effecten van LPAIV infectie op het bewegingsgedrag van vrijlevende wilde eenden (Hoofdstuk 7). Gedurende de LPAIV infectiepiek in het najaar registreerden we de dagelijkse lokale en regionale bewegingen van met GPS loggers

uitgeruste LPAIV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde individuen op. Bij een vergelijking binnen individuen, individuen dus waarvan de infectiestatus tijdens de registratieperiode veranderde, was er geen verband tussen LPAIV infectie en dagelijkse lokale en regionale bewegingen. Echter, bij een vergelijking tussen individuen lagen de dagelijkse regionale bewegingen van LPAIV geïnfecteerde wilde eenden lager dan die van niet-geïnfecteerde individuen, welke steeds lager werd naarmate de weersomstandigheden slechter werden (d.w.z. meer wind, neerslag en lagere temperaturen leidden tot een sterkere afname in de regionale bewegingsintensiteit van geïnfecteerde vogels). De dagelijkse lokale bewegingspatronen verschilde niet tussen LPAIV geïnfecteerde en niet-geïnfecteerde individuen. Deze bevindingen suggereren dat LPAIV geïnfecteerde wilde eenden waarschijnlijk nog wel in staat zijn om virusdeeltjes te transporteren naar andere gebieden, maar dat de afstand van dergelijke verspreidingen waarschijnlijk lager ligt dan men zou verwachten op basis van het gedrag van niet-geïnfecteerde individuen.

Samenvattend heeft onze studie aangetoond dat (i) het najaar de meest kritische periode is van het jaar met het hoogste percentage aan LPAIV geïnfecteerde wilde eenden, (ii) LPAIV epidemieën in wilde vogels waarschijnlijk voornamelijk plaatsvinden op lokale schaal, (iii) trekkende gastheren een belangrijke rol spelen in de dynamiek van LPAIV infecties als potentiële veroorzakers en bekrachtigers van de najaar LPAIV epidemie en, dan waarschijnlijk vooral vanwege hun verhoogde vatbaarheid voor lokaal circulerende virussen in plaats van hun rol als vector van nieuw geïntroduceerde LPAIV lijnen van verre, (iv) wilde eenden waarschijnlijk in staat zijn om LPAIV asymptomatisch te dragen en (v) wilde eenden waarschijnlijk in staat zijn om LPAIV lokaal en zelfs regionaal te verspreiden.