

EFFECT VAN TWEEVOUDIGE INFLUENZA VACCINATIE MET IDENTIEKE OF VERSCHILLENDE VIRUSSTAMMEN BIJ INFECTIE- IMMUNE INDIVIDUEN: EEN STUDIE MET H3N2 VIRUSSEN IN HET VARKENSMODEL

Aantal woorden: 19 126

Anna Parys

Studentennummer: 01206913

Promotor: Prof. dr. Kristien Van Reeth

Promotor: Prof. dr. Eric Cox

Onderdeel van de Masterproef voorgelegd voor het behalen van de graad master in de diergeneeskunde

Academiejaar: 2017 – 2018

VERTROUWELIJK – BELANGRIJK

Deze masterproef bevat vertrouwelijke informatie en/of vertrouwelijke onderzoeksresultaten die toebehoren aan de Universiteit Gent of aan derden. Deze masterproef of enig onderdeel ervan mag op geen enkele wijze publiek gemaakt worden zonder de uitdrukkelijke schriftelijke voorafgaande toestemming vanwege de Universiteit Gent. Zo mag de masterproef onder geen voorwaarde door derden worden ingekeken of aan derden worden meegedeeld. Het nemen van kopieën of het op eender welke wijze dupliceren van de masterproef is verboden. Het niet respecteren van de vertrouwelijke aard van de masterproef kan onherstelbare schade veroorzaken aan de Universiteit Gent.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten bieden geen enkele garantie met betrekking tot de juistheid of volledigheid van de gegevens vervat in deze masterproef, noch dat de inhoud van deze masterproef geen inbreuk uitmaakt op of aanleiding kan geven tot inbreuken op de rechten van derden.

Universiteit Gent, haar werknemers of studenten aanvaarden geen aansprakelijkheid of verantwoordelijkheid voor enig gebruik dat door iemand anders wordt gemaakt van de inhoud van de masterproef, noch voor enig vertrouwen dat wordt gesteld in een advies of informatie vervat in de masterproef.

1 Voorwoord

Graag zou ik enkele mensen willen bedanken voor het helpen bij het tot stand komen van deze masterproef.

Allereerst bedank ik professor dr. Kristien Van Reeth voor de begeleiding gedurende het hele jaar. Haar kennis over influenza is impressionant en ik kon met al mijn vragen steeds bij haar terecht. Ik dank haar ook dat ik de kans kreeg dergelijk interessant en uitdagend onderzoek te mogen doen. In het bijzonder zou ik ook doctoraatsstudente Elien Vandoorn willen bedanken om mij bij te staan wanneer er zich problemen voordeden en mij eindeloos te helpen bij alle vragen die mijn pad kruisten. Ook doctoraatsstudente Sharon Chepkwony wil ik hiervoor bedanken.

De laboranten Nele Dennequin en Melanie Bauwens zou ik graag bedanken voor de hulp bij het uitvoeren van het vele labo werk en het verwerken van de stalen. Ook dierverzorger Jonathan Vandenbogaerde zou ik graag willen bedanken voor de uiterst goede zorgen voor de varkens en het helpen bij de staalnames. Ook doctoraatsstudenten Daniel Cortes en Wojciech Stadejek waren een onmisbare hulp bij het tweede deel van het experiment.

Tot slot zou ik graag mijn vrienden en familie willen bedanken voor de nodige afleiding en ontspanning tijdens het onderzoek en het schrijven van de thesis. In het bijzonder zou ik ook Janbart willen bedanken voor het eindeloze begrip en de steun.

2 Inhoudstafel

4	Samenvatting	6
5	Literatuurstudie	8
5.1	Algemene eigenschappen van influenzavirussen	8
5.2	Epidemiologie van het H3N2 virus bij de mens en het varken	12
5.3	Immuunrespons tegenover influenza A virussen	17
5.4	Huidige vaccinatie strategie bij de mens	21
5.5	Huidige vaccinatie strategie bij het varken	23
5.6	Heterologe prime-boost vaccinatie met influenzavirussen	25
6	Probleemstelling en doelstelling	28
7	Materiaal en methoden	29
7.1	Varkens.....	29
7.2	Influenzavirussen en vaccins.....	29
7.3	Proefopzet	30
7.4	Serologische testen	34
7.5	Virustitratie	37
7.6	Statistische analyse	38
8	Resultaten.....	39
8.1	Bepalen van een geschikte inoculatiedosis van het virus A/Nanchang/933/1995	39
8.2	Heterologe prime-boost vaccinatie bij varkens met infectie immuniteit tegenover A/Nanchang/933/1995	44
9	Discussie	50
10	Referentielijst	56
11	Bijlagen	62

3 Lijst met afkortingen

CDC	Center for Disease Control
CPE	cytopathisch effect
Dpc	dagen post challenge
Dpi	dagen post inoculatie
FGZ	fosfaat gebufferde zoutoplossing
G08	sw/Gent/172/2008
HA	hemagglutinine
HAE	hemagglutinerende eenheden
HI	hemagglutinatie inhibitie
IAV	influenza A virussen
MDCK	Madin Darby Canine Kidney
MO15	sw/Missouri/A01840724/2015
NA	neuraminidase
NC95	A/Nanchang/933/1995
PA10	sw/Pennsylvania/A0107677/2010
TCID ₅₀	50 % tissue culture infective dose
VN	virus neutralisatie
WGO	Wereld Gezondheids Organisatie

4 Samenvatting

Het varken is een weinig gebruikt, maar waardevol model voor influenza bij de mens. Niet alleen zijn de influenzavirussen en de -vaccins voor beide diersoorten gelijkaardig, maar ook de anatomie en fysiologie van het ademhalingsstelsel en de immuunrespons vertonen veel gelijkenissen. De voornaamste reden voor de beperkte werkzaamheid van de huidige, geïnactiveerde griepvaccins is de voortdurende variatie in het hemagglutinine eiwit van het virus, waardoor nieuwe virusvarianten aan de bestaande immuniteit kunnen ontsnappen. In vroegere experimenten bij het varken werd aangetoond dat de immuunrespons tegenover H3N2 influenzavirussen sterk kan worden verbreed door voor de eerste (primo-) en tweede (booster-) vaccinatie gebruik te maken van antigenisch verschillende H3N2 virusstammen. Deze heterologe prime-boost vaccinatie zou ook voordelen kunnen bieden voor de controle van griep bij de mens. In de huidige experimenten wilden we nagaan in hoeverre de heterologe prime-boost vaccinatie evengoed werkzaam zou zijn bij varkens die vooraf een infectie hebben doorgemaakt met een ouder menselijk H3N2 influenzavirus, A/Nanchang/933/1995 (NC95). Mensen worden namelijk vooral op oudere leeftijd tegen influenza gevaccineerd, wanneer ze reeds een basisimmuniteit hebben door vroegere infectie(s). In een preliminair experiment werd een geschikte inoculatiedosis voor het humane virus bij het varken bepaald. In het hoofdexperiment werden de dieren eerst intranasaal geïnoculeerd met NC95. Zes weken later volgde een tweevoudige influenza vaccinatie, met 1 maand interval, met geïnactiveerd, geadjuveerd vaccin op basis van een Europees en/of Noord-Amerikaans H3N2 influenzavirus van het varken. De vaccinaties gebeurden volgens een homoloog (twee groepen) of heteroloog (twee groepen) prime-boost regime. Twee controle groepen werden enkel geïnfecteerd met NC95 of niet geïmmuniseerd. Op verschillende tijdstippen werden hemagglutinatie inhiberende antistoffen in serum bepaald tegenover de immunisatie virussen en een reeks antigenisch verschillende H3N2 influenzavirussen. Vier weken na de laatste vaccinatie werden alle dieren onderworpen aan challenge met één van deze laatste virussen. We konden aantonen dat de serum HI-antistofrespons en virologische bescherming zeer sterk

kunnen verbreed worden door infectie-immune dieren tweevoudig te vaccineren met een geïnactiveerd geadjuveerd virus vaccin, zelfs tegenover antigene varianten die niet in het vaccin aanwezig zijn. Deze waarnemingen bieden potentieel voor de influenza vaccinatie strategie van zowel het varken als de mens.

5 Literatuurstudie

5.1 Algemene eigenschappen van influenzavirussen

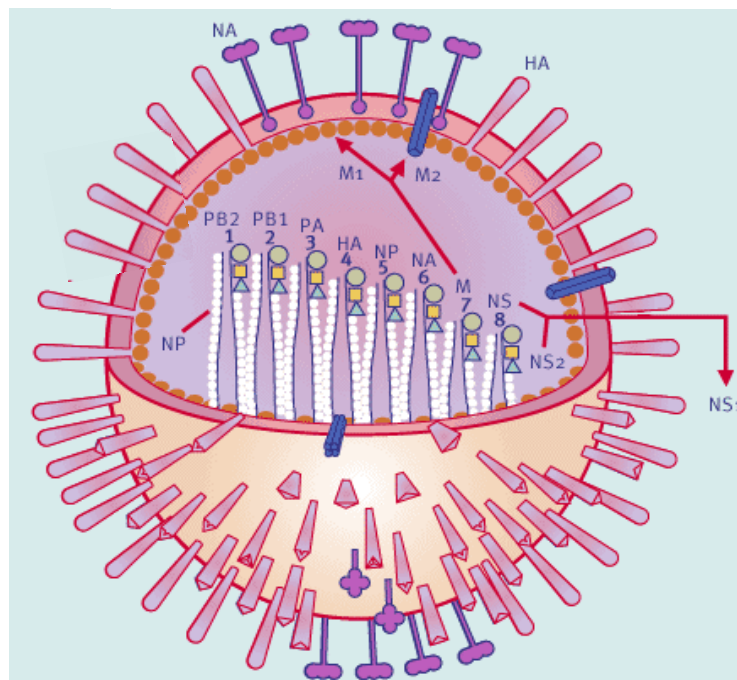
Influenzavirussen, ook wel griepvirussen genoemd, behoren tot de familie van de *Orthomyxoviridae*. Deze familienaam is afgeleid van de Griekse woorden “orthos” (echt, correct) en “myxa” (slijm). Met dit laatste woord wordt verwezen naar het tropisme van de virussen, meer bepaald de slijmvliezen van de ademhalingswegen. Binnen de orthomyxovirusfamilie zijn er verschillende influenzavirus genera of typen. Type B en C zijn alleen bij de mens als ziekmakend agens bekend. Type D werd pas in 2011 ontdekt (Collin et al., 2015); het zou vooral bij het rund voorkomen en de klinische betekenis ervan is nog onduidelijk. Type A is voor de mens het meest ziekteverwekkend en circuleert bij meerdere diersoorten, waaronder het varken. Deze masterproef zal verder uitsluitend over influenza A virussen (IAV) handelen.

Influenzavirussen zijn enkelstrengs RNA virussen met negatieve polariteit. Kenmerkend voor deze virussen is dat het RNA niet uit één enkele streng bestaat, maar “gesegmenteerd” is. Bij IAV bestaat het genoom uit acht afzonderlijke segmenten (Figuur 1). Elk RNA segment bevat de genetische informatie voor één of hoogstens twee virale eiwitten.

Influenzavirussen hebben een lipoproteïnemantel of envelop waarin drie virale eiwitten zitten: het hemagglutinine (HA), het neuraminidase (NA) en het matrixionenaal (M2). De staafvormige HA en de paddenstoelvormige NA glycoproteïnen steken doorheen de envelop van het virus uit (Laver en Valentine, 1969; Lamb et al., 1985) en zorgen respectievelijk voor het binden van het virus aan specifieke receptoren op de gastheercel en het vrijstellen van nieuw gevormde viruspartikels na de vermeerdering in cellen van de gastheer. Het M2 heeft ook een klein extern gedeelte en is belangrijk voor het ontmantelen van het viruspartikel, waardoor de inhoud van het viruspartikel in het cytoplasma van de gastheercel terecht komt (Lamb et al., 1994). De binnenkant van de envelop wordt bekleed met matrixeiwitten (M1) die de envelop verstevigen. In het viruspartikel wordt elk RNA-segment omgeven door RNA-

bindende nucleoproteïnen (NP) en is elk segment geassocieerd met drie polymerase eiwitten (PA, PB1 en PB2) die noodzakelijk zijn voor de RNA-replicatie en -transcriptie. Tenslotte is ook het “niet-structurele” NS2 eiwit in het viruspartikel aanwezig, terwijl NS1 enkel in geïnfecteerde cellen voorkomt. Van de tien virale eiwitten is NS1 dus het enige niet-structurele. NS1 heeft een rol in de regulatie van de genen van de gastheercel. NS2 is belangrijk voor de export van viraal RNA uit de kern van de gastheercel (Bouvier en Palese, 2008). De belangrijkste inductoren van beschermende immuniteit bij de gastheer zijn de HA en NA oppervlakte-eiwitten. Deze zijn echter ook het meest onderhevig aan zogenaamde antigene variatie (Kilbourne et al., 1968; Caton et al., 1982).

Op basis van de antigene eigenschappen van het HA en NA worden de IAV verder onderverdeeld in subtypen. Tot hertoe werden achttien antigenisch verschillende HA (H1 t.e.m. H18) en elf verschillende NA (N1 t.e.m. N11) beschreven (Wu et al., 2014). Het subtype wordt dan aangeduid door de combinatie van een HA met een bepaald cijfer en NA met een bepaald cijfer, bijvoorbeeld H3N2, H1N1, H5N1.



Figuur 1. Structuur van een influenza A virus. De acht RNA segmenten worden voorgesteld in volgorde van afnemend moleculair gewicht. Het RNA segment dat codeert voor het hemagglutinine (HA) neemt dan de vierde plaats in en dat voor het neuraminidase (NA) de zesde (Uit: Van Reeth, 2014).

IAV komen voor bij de mens, het paard, het varken, nertsen, zeezoogdieren, gevogelte en meer recent ook bij de hond (Song et al., 2008). Wilde watervogels zijn het belangrijkste natuurlijk reservoir. Hierbij komen zestien HA en negen NA subtypes voor. Het virus vermeerdert hier, in tegenstelling tot bij zoogdieren, zowel in het spijsverteringsstelsel, als in het ademhalingsstelsel. De infecties blijven bijna altijd subklinisch (Suarez et al., 2008).

Bij de influenza gevoelige zoogdieren komen slechts een beperkt aantal subtypen voor. Bij het varken zijn deze H1N1, H3N2 en H1N2. Bij de mens circuleren momenteel H1N1 en H3N2. Bij beide gastheren veroorzaakt het virus een acute, oppervlakkige infectie van de bovenste en diepere luchtwegen. Het virus verspreidt zich snel tussen soortgenoten via druppelinfectie door de lucht, en ook door contact met materialen of handen die met het virus gecontamineerd zijn (Tellier, 2006). Over het algemeen zijn influenzavirussen diersoort specifiek, maar overdracht tussen verschillende diersoorten is mogelijk. Het is allang gekend dat influenzavirussen van het varken en vogels de mens kunnen infecteren, en in uitzonderlijke gevallen zelfs een pandemie kunnen veroorzaken. Meestal kennen infecties met dierlijke influenzavirussen bij de mens echter een “blind” einde, ze worden dus niet verder van mens tot mens overgedragen. Recent kwam ook aan het licht dat virusoverdracht van mens naar varken, de zogenaamde “reverse zoönose”, veel meer voorkomt dan transmissie van varken naar mens (Webby et al., 2000).

Elk influenzavirus wordt aangeduid volgens een specifieke nomenclatuur. Deze bevat gegevens over het type (A, B, C, D), de gastheer indien het virus van dierlijke oorsprong is, de plaats van isolatie, eventueel een stamnummer, en het jaar van isolatie. Bij IAV wordt het subtype achteraan vermeld, en het type (A) vaak weggelaten voor de dierlijke virussen. Wanneer de gastheer niet vermeld wordt, is het virus van humane oorsprong (WGO, 1980). Een voorbeeld van een influenzavirus is A/sw/Gent/172/08 (H3N2). Dit is een H3N2 virus geïsoleerd bij varkens (“swine”) in de regio Gent in 2008.

Reeds in 1941 werd ontdekt dat het influenzavirus in staat is om kippen-erythrocyten te agglutineren (Hirst, 1941). Dit verschijnsel berust op de eigenschap van het virus om zich met het HA vast te hechten aan specifieke receptoren op de erythrocyt en zo een netwerk te vormen met de erythrocyten. Het HA heeft zijn naam aan deze “hemagglutinatatie” te danken. De mate van hemagglutinatatie correspondeert met de virusconcentratie. Ook kan de hemagglutinatatie worden geremd door antistoffen in het serum van mens en dier die aan het virus werden blootgesteld, vooral wanneer het homologe virus wordt gebruikt in de test in het labo. Op deze hemagglutinatatie inhibitie (HI)-test (Hirst, 1941; Salk, 1944) berust ook nu nog voor een belangrijk deel de identificatie van geïsoleerde influenzavirussen. Het is ook één van de meest gebruikte serologische testen voor het aantonen van antistoffen bij mens en dier.

Influenzavirussen zijn genetisch labiele virussen. Er zijn twee mechanismen die hun antigene verschijningsvorm kunnen veranderen. Antigene drift is het resultaat van de accumulatie van puntmutaties die vooral optreden in de genen die coderen voor HA en NA, en kunnen leiden tot aminozuurwijzigingen in de oppervlakte-eiwitten. De wijzigingen in het HA zijn epidemiologisch het meest belangrijk, gezien dit het eiwit is dat door neutraliserende antistoffen wordt herkend. Hierdoor kunnen influenzavirussen dus in zekere mate ontsnappen aan de neutraliserende werking van antistoffen die reeds in de populatie aanwezig zijn. Deze antigene drift in het HA is verantwoordelijk voor de op regelmatige basis wederkerende griep epidemieën.

Antigene shift is een meer drastische wijziging waarbij een nieuw HA subtype ontstaat, waartegen de populatie in het geheel geen immuniteit heeft. Dit kan gebeuren wanneer een influenzavirus vanuit een dierlijk reservoir wordt overgedragen naar een andere gevoelige diersoort of naar de mens. Daarnaast kan het ook optreden bij genetische “reassortering”. Hierbij worden gen segmenten uitgewisseld tussen twee totaal verschillende influenzavirussen wanneer deze gelijktijdig dezelfde cel infecteren. In bepaalde gevallen ontstaat hierdoor een volledig nieuw influenzavirus subtype dat aanleiding kan geven tot een grootschalige griep pandemie.

5.2 Epidemiologie van het H3N2 virus bij de mens en het varken

Alle H3N2 influenzavirussen bij het varken zijn afkomstig van de mens (Figuur 2). De huidige influenzavirussen van varken en mens vertonen echter wel duidelijke antigene en genetische verschillen, omdat ze doorheen de jaren op een andere manier geëvolueerd zijn. Bij het varken zijn er eveneens belangrijke verschillen tussen de influenzavirussen in verschillende werelddelen en streken, wat niet het geval is bij de mens.

Bij de mens werden H3N2 virussen in 1968 geïntroduceerd vanuit vogels, met de “Hong Kong-pandemie” tot gevolg. Daarna bleven H3N2 virussen circuleren, waarbij ze antigene drift ondergingen. Men neemt aan dat er van 1968 tot 2003 reeds meer dan elf antigene H3N2 clusters circuleerden bij de mens (Smith et al., 2004). De drift varianten vervangen elkaar, zodat er in de humane populatie slechts één H3N2 virus tegelijk circuleert.

Rond 1970 werden humane H3N2 virussen geïntroduceerd in de Europese varkenspopulatie (Ottis et al., 1982; Tumova et al., 1980). H3N2 raakte pas wijdverspreid in de varkenspopulatie in de jaren '80, na reassortering met de circulerende H1N1 varkens influenzavirussen. Hierbij heeft het H3N2 virus de interne genen van het varkens H1N1 virus overgenomen, maar zijn humane H3 hemagglutinine en N2 neuraminidase behouden (Campitelli et al., 1997; Castrucci et al., 1993). Ook in het varken ondergaan de H3N2 virussen antigene drift. De varkens virussen evolueren onafhankelijk van de humane H3N2 virussen en de antigene drift van het HA in het varken is trager dan bij de mens. Bij de mens is het HA immers veel meer onderhevig aan antigene drift. Het menselijke H3N2 virus heeft dan ook een zesmaal snellere evolutie doorgemaakt dan het H3N2 virus van het varken (de Jong et al., 2007) waardoor de antigene verschillen met de varkens H3N2 virussen toenemen. Aldus circuleren er momenteel bij het varken nog altijd virussen die sterk verwant zijn met de oudere humane virussen maar niet langer met de recentere humane virussen.

Ondanks de antigene drift van het H3N2 influenzavirus bij het varken, wordt de humane stam A/Port Chalmers/1/1973 nog steeds opgenomen in de Europese vaccinstammen voor het

varken. Voorlopig is er nog wel enige kruisreactiviteit, maar deze zal uiteindelijk terugvallen tot een niveau dat er geen bescherming meer is (de Jong et al., 2007).

Het H3N2 varkens influenzavirus brak uit in 1998 in de Verenigde Staten. Tot dan werd griep in de Amerikaanse varkenspopulatie alleen veroorzaakt door H1N1 virussen, die reeds geïsoleerd werden in 1930 (Shope et al., 1931). De Noord-Amerikaanse H3N2 varkens influenzavirussen zijn drievoudige reassortanten met genen voor de interne eiwitten van humane, aviaire en varkens oorsprong. In het Engels spreekt men dan van “triple reassortant internal genes” (TRIG). Het HA en NA zijn afkomstig van een veel recentere introductie van humane H3N2 virussen in de varkenspopulatie. De virussen werden geïntroduceerd in de populatie in de late jaren '90 en vormden initieel drie antigenen clusters (I-III). Cluster IV is vervolgens ontstaan uit cluster III en is sinds 2005 dominant (Kitikoon et al., 2013). In 2010-2011 vond een nieuwe H3N2 introductie van humane H3 in de Noord-Amerikaanse varkenspopulatie plaats (Rajao et al., 2015), waaruit de “human-like” H3N2 varkens virussen ontstaan zijn. Dit resulteert in twee grote H3N2 clusters die co-circuleren in de Noord-Amerikaanse varkenspopulatie en die antigenisch dicht bij de huidige humane H3N2 virussen liggen dan de Europese varkens virussen.

Varkens influenzavirussen worden over het algemeen niet overgedragen naar de mens maar toch zijn er sporadische zoönotische infecties zonder verdere mens tot mens overdracht (Myers et al., 2007; Shu et al., 2012; Van Reeth 2007). Wanneer een varkens influenzavirus geïsoleerd wordt uit een humane gastheer, wordt dit een “variant” virus genoemd. Transmissie van zowel de cluster IV als de “human-like” H3N2 varkens virussen naar de mens wordt frequent gedetecteerd en dit zorgt de laatste jaren voor extra bezorgdheden in de humane gezondheid. Sinds 2011 werden reeds 426 H3N2 “variant” (H3N2v) infecties gedetecteerd in verschillende Amerikaanse staten. Volgens “Center for Disease Control” (CDC, 2018a) belandden er hiervan 26 mensen in het ziekenhuis en viel er 1 dodelijk slachtoffer. De infecties kwamen vooral voor bij kinderen en werden geassocieerd met direct en intens contact met varkens op landbouwbeurzen.

Een mogelijke verklaring voor het voorkomen van H3N2v bij jonge kinderen is het gebrek aan immuniteit tegen de H3N2 varkens virussen. Ze werden tijdens hun leven enkel blootgesteld aan of gevaccineerd met de recente humane H3N2 virussen die antigenisch verschillend zijn van deze in het varken. Zo blijkt dat de huidige vaccins waarin H3N2 bevat zit niet beschermen tegen H3N2v (Houser et al., 2013). Dit toont aan dat het H3N2 varkens influenzavirus niet alleen een bedreiging vormt voor de varkenspopulatie, maar ook voor de humane gezondheid. Varkens kunnen fungeren als een 'reservoir' waaruit 'nieuwe' influenzavirussen in de humane populatie geïntroduceerd worden eens de immuniteit in de populatie voldoende gedaald is (Hoschler et al., 2013).

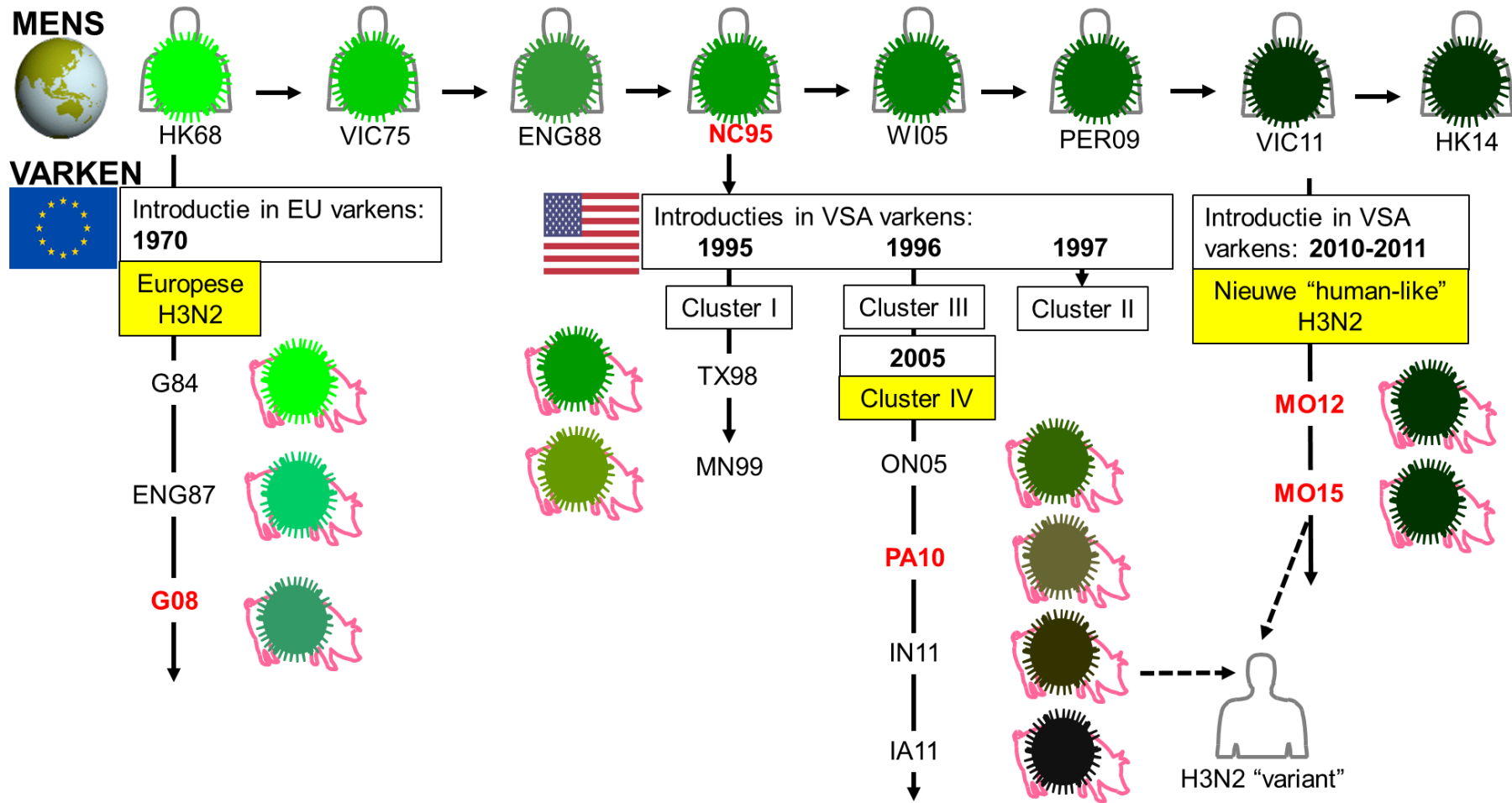
Het is belangrijk in te zien dat H3N2 varkens influenzavirussen mondiaal duidelijk verschillen. Zo is er een veel grotere antigene diversiteit bij de H3N2 varkens influenzavirussen die circuleren in de Verenigde Staten dan in Europa (Lewis et al., 2014). In de continenten Azië en Zuid-Amerika is de situatie anders en mogelijk nog complexer (Bi et al., 2010; Cappuccio et al., 2011).

Typische "griep" symptomen zijn koorts, hoofdpijn, spierpijn, verminderde eetlust, longontsteking, faryngitis, bronchitis en bemoeilijkt ademhaling. Het belang van influenza is groot aangezien het iedere winter 5 tot 15 % van de wereldbevolking treft (Westgeest et al., 2014; Smith et al., 2004). Bovendien sterven er volgens de Wereldgezondheidsorganisatie (WGO, 2017a) jaarlijks wereldwijd naar schatting 250.000- 500.000 mensen aan influenza. Dit betreft volgens de Amerikaanse CDC (2017a) voornamelijk mensen ouder dan 65 jaar, jonge kinderen, immunosuppressieven en zwangere vrouwen. Van de influenza geïnfecteerde personen vertoont 44 % duidelijke ademhalingsymptomen. De andere 56 % maken een subklinische infectie door. Zij vertonen geen duidelijke symptomen, maar kunnen wel andere personen infecteren (Glück, 2014).

Net als bij de mens, is influenza een belangrijke oorzaak van luchtwegproblemen bij het varken. Bij een acute uitbraak zijn de symptomen gelijkaardig aan de typische symptomen bij de mens. Wanneer influenza langdurig op een bedrijf circuleert en er gevoelige dieren

aanwezig zijn, zijn de symptomen minder duidelijk en beperken de ziekteverschijnselen zich tot enkele dieren (enzoötisch).

De griepsymptomen bij het varken en de mens zijn niet alleen zeer gelijkaardig, ze worden bovendien frequent veroorzaakt door dezelfde subtypes (H1N1, H3N2). Dit maakt varkens een zeer geschikt proefdiermodel (Meurens et al., 2012) des te meer omdat ze zowel anatomisch als immunologisch sterk gelijkend zijn op de mens. De anatomische opbouw van de long is gelijkaardig en ook fysiologisch en immunologisch zijn de overeenkomsten duidelijk. Bij beide vermeerdert het virus zowel in de bovenste- als de onderste luchtwegen en gebruikt het dezelfde receptoren om de cel te infecteren. De immuunrespons die volgt op een infectie is erg vergelijkbaar (Van Reeth et al., 1998; De Vleeschauwer et al., 2009). Andere diersmodellen die gebruikt worden zijn de muis en de fret. De muis is zowel anatomisch als immunologisch minder geschikt dan het varken en is bovendien geen natuurlijke gastheer voor influenzavirussen (Bouvier en Lowen, 2010). Influenza negatieve fretten zijn dan weer zeer moeilijk te verkrijgen en zijn ook nadeliger voor het bestuderen van de immunologische reacties (Summerfield et al., 2009).



Figuur 2. Evolutie van H3N2 influenzavirussen bij het varken en de mens. De drie grote H3N2 lijnen die momenteel circuleren in de varkenspopulatie worden aangeduid in het geel. Verschillende tinten groen duiden de antigenische drift van het H3 aan. Virussen zijn afgekort met letters en cijfers die staan voor de plaats en het jaar van isolatie. De weergegeven virussen worden gebruikt in experiment 1 en 2 en de volledige virusnamen worden weergegeven in Tabel 11. De virusstammen in het rood zijn de virussen die gebruikt werden voor de inoculatie (NC95), vaccinatie (G08 en PA10) en challenge (NC95; MO15) van experiment 1 en 2. EU: Europa; VSA: Verenigde Staten van America.

5.3 Immuunrespons tegenover influenza A virussen

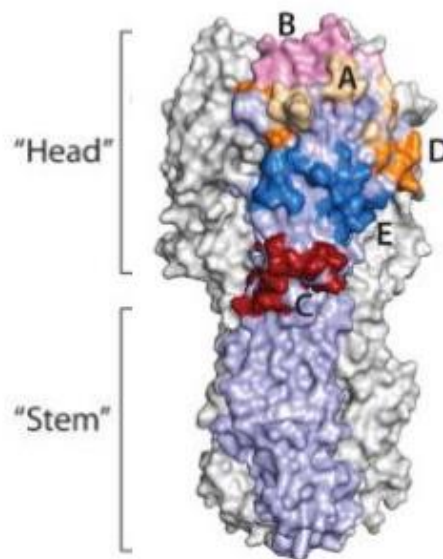
De pathogenese van- en immuunrespons tegenover het influenzavirus zijn gelijkaardig bij mens en varken (Van Reeth et al., 1998). Het virus vermeedert gedurende ongeveer een week in epitheelcellen van de hogere- en lagere luchtwegen. De snelle klaring van het virus is grotendeels te wijten aan de snelle en krachtige immuunrespons (Hayden et al., 2015; Hayden et al., 2009). Zodra infectie wordt opgemerkt, verlaten de dendritische cellen (DC) en macrofagen de luchtwegen. Zij verplaatsen zich via de lymfevaten naar de regionale lymfeknopen of via het bloed naar de milt. Hier zullen zij virale antigenen aanbieden aan naïeve en/of geheugen T- en B-cellen en deze aldus stimuleren. De T- en B-cellen begeven zich vervolgens niet alleen naar de bloedbaan, maar ook naar de mucosa van de luchtwegen en naar de lymfeknopen.

B-cellen produceren antistoffen (Baumgarth et al., 2000). Het HA maakt via zijn receptor bindingsplaats contact met receptoren op het oppervlak van de gastheer cel. Antistoffen gericht tegenover het HA kunnen deze binding en, indien in voldoende mate aanwezig, ook de infectie voorkomen. Dit zijn dus de zogenaamde neutraliserende antistoffen (Van Reeth et al., 2012). De concentraties neutraliserende en dus beschermende antistoffen kunnen worden gemeten met behulp van twee serologische testen: de virus neutralisatie- (VN) test en de minder omslachtige HI-test, die een betrouwbaar surrogaat is voor de VN-test (Bresee et al., 2013).

Er moet ook op gewezen worden dat het HA-eiwit uit twee grote delen bestaat: (1) een bolvormig hoofd (in het Engels “head”, dit deel wordt ook HA1 genoemd) en (2) een steel (“stem” of “stalk”, of HA2). De neutraliserende antistoffen zijn hoofdzakelijk gericht tegenover vijf immunodominante antigene domeinen in het hoofd van het HA. Figuur 3 toont de antigene domeinen van H3 influenzavirussen, die worden aangeduid met de letters A tot en met E (Wilson en Cox, 1990). Deze antigene domeinen zijn echter ook het meest aan antigene variatie onderhevig, en de antistoffen zullen dus minder goed reageren met driftvarianten. Er worden ook antistoffen gevormd tegen de meer geconserveerde steel van het HA. Deze antistoffen zouden een bredere bescherming kunnen bieden tegenover driftvarianten (Corti et

al., 2011; Ekiert et al., 2011; Wang et al., 2010). Daar tegenover staat dat na een natuurlijke infectie uiterst lage hoeveelheden anti-steel antistoffen worden gevormd, en dat ze niet worden geïnduceerd door de traditionele influenzavaccins. Ook zouden deze antistoffen een minder krachtige werking hebben dan de antistoffen tegenover het HA-hoofd. Antistoffen gericht tegen het NA zijn niet neutraliserend. Ze zijn wel in staat om het vrijkomen van partikels uit geïnfekteerde cellen te vertragen en aldus de ziekte af te zwakken (Wright et al., 2007).

HI- en VN-antistoffen in het serum kunnen bij het varken vanaf 7 tot 10 dagen na een experimentele virusinoculatie worden aangetoond. Ze bereiken een piek op 2-3 weken na inoculatie en dalen vanaf 8-10 weken (Heinen et al., 2000; Larsen et al., 2000; Van Reeth et al., 2006). Zoals verwacht zijn de serumantistoffen aanvankelijk van het IgM isotype en later IgG. Secretorische IgA antistoffen worden lokaal geproduceerd ter hoogte van de neusmucosa en de long (Larsen et al., 2000; 2001).



Figuur 3. Structuur van het hemagglutinine (HA) van H3 influenzavirussen. Het bolvormig hoofd ("Head") met zijn vijf antigene gebieden (A, B, C, D en E) is het voornaamste doelwit voor de neutraliserende antistoffen. De antigene drift vindt vooral plaats in deze regio; de aminozuren in de steel ("Stem") zijn veel meer geconserveerd.

Naast humorale immuniteit induceert een influenza infectie ook cellulaire immuniteit. Deze bestaat enerzijds uit CD4⁺ T-cellen of T-helpercellen, die zullen differentiëren naar T-helper 1 (Th1) of T-helper 2 (Th2) cellen. Th2-cellen zorgen voor de activatie en differentiatie van B-cellen (Lamb et al., 1982), terwijl Th1-cellen betrokken zijn bij de CD8⁺ cytotoxische T-cel respons (Zhu en Paul, 2010). Anderzijds zijn er de CD8⁺ T-cellen die zich zullen ontwikkelen tot cytotoxische T-lymfocyten. Deze laatste cellen zijn de hoeksteen van de cellulaire immuniteit. Zij kunnen enkel geactiveerd worden via virale eiwitten die aanwezig zijn in het cytoplasma van de gastheercel na virus infectie. Ze kunnen vervolgens migreren naar de plaats van infectie en daar de virus geïnfecteerde cellen herkennen en vernietigen en zo de verdere spreiding van het virus verhinderen (Nakanishi et al., 2009). In tegenstelling tot de neutraliserende antistoffen zijn de cytotoxische T-lymfocyten meestal gericht tegen sterk geconserveerde epitopen van zowel oppervlakte-eiwitten als interne eiwitten van het influenzavirus. In het muismodel kunnen ze bescherming bieden tegen driftvarianten en zelfs tegen verschillende subtypes (Assarsson et al., 2008). Er zijn echter voldoende aanwijzingen dat dit niet of veel minder het geval is bij influenza gevoelige zoogdieren. Bij deze diersoorten kan de cellulaire immuniteit op zich geen afdoende bescherming bieden. Na een primaire infectie met een influenzavirus zullen er zowel CD4⁺- en CD8⁺- geheugencellen (Strutt et al., 2010; Woodland et al., 2001) alsook geheugen B-cellen gevormd worden (Crotty et al., 2004). Deze cellen zullen een sterkere en snellere reactie mogelijk maken bij een volgende influenza infectie.

Bij de mens en het varken is er tussen influenzavirussen van het H1 en H3 subtype geen serologische kruisreactie in HI- of VN-testen, en nagenoeg geen kruisbescherming. Toch werd onder bepaalde omstandigheden een gedeeltelijke kruisbescherming gezien, zonder aanwezigheid van hoge titers aan kruis reagerende HI- of VN-antistoffen in serum. Voor het varken was dit bijvoorbeeld het geval in experimentele studies waarbij de dieren met een tijdsinterval van enkele weken werden geïnoculeerd met antigenisch verschillende H1N1 influenzavirussen uit Europa en Noord-Amerika, met Europese H1N1 en H1N2 virussen, of

met het Europese H3N2 virus en het Noord-Amerikaanse cluster IV H3N2 virus (De Vleeschauwer et al., 2011; Qiu et al., 2013; Van Reeth et al., 2003). Men veronderstelt dat de kruisbescherming te wijten is aan een combinatie van mucosale IgA antistoffen, cellulaire immuniteit, en kruis reagerende VN- en/of NI- (neuraminidase inhibitie) antistoffen. Verder onderzoek naar de immunologische mechanismen van deze kruisbescherming is echter vereist.

De huidige vaccinatie strategie bij mens en varken (zie verder) bestaat uit het parenteraal toedienen van een geïnactiveerd vaccin. De toediening gebeurt diep intramusculair, bij de mens soms ook subcutaan. De immuunrespons die volgt op deze vaccinatie verschilt van de immuunrespons na blootstelling aan het infectieuze influenzavirus en vermeerdering van dit virus in de luchtwegen. Met de geïnactiveerde entstoffen is de bescherming vrijwel volledig gebaseerd op de inductie van antistoffen tegen het virale HA in de circulatie. De antistoffen in het serum komen via transsudatie ook terecht in de mucosa van het ademhalingsstelsel. Dit proces verloopt efficiënter in de long dan in de neusmucosa (Graham en Crowe, 2007). Vaccinatie zorgt dus vooral voor een reductie van de virusreplicatie in de longen, waardoor ook de ergste ziektesymptomen worden voorkomen, maar kan niet altijd de virusreplicatie in de bovenste luchtwegen, of virusexcretie en transmissie naar andere dieren, tegengaan.

Geïnactiveerde vaccins vertonen drie beperkingen op het vlak van de immuunrespons. Ten eerste induceren deze alleen serumantistoffen en geen secretorische IgA. Ten tweede dalen de serum antistoftiters relatief snel. Op 6 weken na de boostervaccinatie (zie 5.6) zijn de antistoftiters reeds aanzienlijk lager dan op 2 weken (Kyriakis et al., 2010). Ten derde wordt enkel de humorale en niet de cellulaire immuunrespons gestimuleerd (Van Reeth en Ma, 2013). Hieruit volgt dat de bescherming na vaccinatie over het algemeen minder breed is dan na infectie. Anderzijds kunnen de serum HI-antistoftiters na een dubbele vaccinatie van influenza negatieve varkens tien- tot honderdmaal hoger zijn dan deze na infectie (Heinen et al., 2001; Larsen et al., 2001; Vincent et al., 2008). De olieachtige adjuvantia in de meeste griepvaccins voor het varken (zie 5.5) kunnen deze hoge antistoftiters verklaren en zorgen ook

voor een bredere bescherming in vergelijking met de, over het algemeen, niet-geadjuveerde, griepvaccins voor de mens.

Gezien het belang van de serum HI-antistoftiter na vaccinatie, is de antistoftiter tegenover een bepaalde influenza virusstam een goede maatstaf voor de graad van bescherming tegenover diezelfde stam. Bij de mens en het paard worden HI-antistoftiters ≥ 40 post vaccinatie over het algemeen als beschermend beschouwd (Ohmit et al., 2011). Ook in experimentele vaccinatie challenge studies bij het varken was er een positieve correlatie tussen de serum HI-antistoftiter tegenover het challenge virus en de graad van bescherming, maar de exacte “seroprotectieve” titer is niet goed gedefinieerd en verschilt ook tussen verschillende studies (Heinen et al., 2001; Kitikoon et al., 2013; Van Reeth et al., 2001; Loving et al., 2013). In experimenten aan het Laboratorium voor Virologie, faculteit Diergeneeskunde, waren HI-titers van 80-160 tegenover een bepaald influenzavirus over het algemeen in staat om 50 % van de dieren beschermen tegenover challenge met dit virus (Van Reeth et al., 2001; De Vleeschauwer et al., 2015).

5.4 Huidige vaccinatie strategie bij de mens

Zoals reeds vermeld wordt bij de mens hoofdzakelijk gebruik gemaakt van geïnactiveerde influenzavaccins. Deze worden jaarlijks voor de epidemische periode intramusculair of subcutaan toegediend. Een levend verzwakt vaccin voor intranasale toediening was gedurende enkele jaren op de markt. Tijdens het griepseizoen 2017-18 was het in de meeste Europese landen en in de VSA niet meer te verkrijgen, gezien het onvoldoende werkzaam zou zijn (CDC, 2018b).

De virusstammen voor de productie van geïnactiveerde influenzavaccins worden opgegroeid in bebroede kippeneieren. Daarna wordt het virus behandeld met detergenten om de oppervlakte-eiwitten af te splitsen van de interne eiwitten, vandaar de benaming “split” vaccin (Nicholson et al., 2003; Wood, 1998). Tenslotte voegt men virus-inactiverende agentia toe, zoals formaldehyde of bèta-propiolactone, waardoor resterende infectieuze viruspartikels worden afgedood. Alle griepvaccins zijn multivalent, zodat drie of vier vaccinstammen moeten worden opgegroeid en samengevoegd (Sanders et al., 2015). In de VSA is er ook een vaccin

op de markt waarbij het virale HA op een kunstmatige manier wordt gemaakt door middel van recombinant DNA technologie (CDC, 2018b). Geadjuveerde vaccins worden soms aangeraden voor personen ouder dan 65, maar ze zijn slechts in enkele Europese landen beschikbaar. De meeste griepvaccins voor de mens bevatten geen adjuvans.

Tabel 1 toont de verschillende griepvaccins die in België op de markt waren gedurende het seizoen 2017-2018 en de virusstammen waarop ze gebaseerd zijn. Deze vaccins bevatten drie of vier vertegenwoordigers van de influenzavirussen die momenteel bij de mens circuleren: één H1N1 stam (type A), één H3N2 stam (type A) en één of twee influenza B stammen. Ze worden respectievelijk trivalente en quadrivalente vaccins genoemd. De virusstammen worden bepaald door de Wereldgezondheidsorganisatie (WGO) en zijn identiek of gelijkaardig voor de verschillende producten. Ook de hoeveelheid HA, 15 µg van elke virusstam, is gestandaardiseerd (Wilkinson et al., 2017).

Vaccinatie is aanbevolen voor personen met risico voor complicaties na een influenza infectie zoals personen met chronische aandoeningen (hartziekten, diabetes...), personen ouder dan 65 jaar, personen werkzaam in de gezondheidssector en vrouwen in het tweede of derde trimester van de zwangerschap (WGO, 2017b). Griepvaccinatie is ook zinvol voor personen die beroepshalve met levende varkens of met pluimvee in contact komen. Omwille van de korte duur van de immuniteit en de antigene variatie van het virus moeten risicopersonen jaarlijks opnieuw worden gevaccineerd. Indien vaccinatie aangewezen is bij kinderen van minder dan 6 jaar, moeten twee injecties met 4 weken interval gegeven worden, gezien het afwezig zijn van een basisimmuniteit. Immuniteit wordt 14 dagen na vaccinatie bereikt en zou ongeveer 6 maanden aanhouden. De griepvaccins zijn zeer veilig, gezien ze geen levend virus bevatten en sterk gezuiverd zijn. De meest voorkomende klachten na vaccinatie zijn pijn, roodheid of lichte zwelling op de plaats van injectie. In zeldzame gevallen ziet men allergische reacties tegenover één van de bestanddelen van het vaccin, zoals ei- of kippeneiwitten.

De werkzaamheid van de vaccins is deels afhankelijk van de antigene overeenkomst tussen de vaccinstammen en de circulerende stammen. Zoals reeds vermeld, vergaderen

griepexperten van de WGO tweemaal per jaar om te beslissen over de meest geschikte vaccinstammen voor respectievelijk het noordelijk en zuidelijk halfrond. Omdat de vaccinproductie omslachtig is en er jaarlijks ongeveer 300 miljoen doses nodig zijn, betekent dit dat de virusstammen bijna een jaar voorafgaand aan het griepseizoen worden geselecteerd (Russell et al., 2008). De H3N2 stam uit het vaccin werd het laatste decennium zesmaal aangepast: in 2008, 2010, 2012, 2014, 2015 en 2016 (BCFI, 2018).

Tabel 1. Griepvaccins voor de mens die tijdens het seizoen 2017-18 werden gebruikt in België (BCFI, 2018).

Productnaam (producent)	Aantal stammen	Soort stammen
Influvac S® (Abbott)	Trivalent	- A/Singapore/GP1908/2015 (H1N1)pdm09 - A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) - B/Brisbane/60/2008
α-RIX-Tetra® (Glaxo Smith Kline)	Tetravalent	- A/Singapore/GP1908/2015 (H1N1)pdm09 - A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) - B/Brisbane/60/2008 - B/Phuket/3073/2013
Vaxigrip-Tetra® (Sanofi Pasteur Europe)	Tetravalent	- A/Michigan/45/2015 (H1N1)pdm09 - A/Hong Kong/4801/2014 (H3N2) - B/Brisbane/60/2008 - B/Phuket/3073/2013

5.5 Huidige vaccinatie strategie bij het varken

Er bestaan enkele gelijkenissen, maar vooral veel verschillen tussen griepvaccins voor de mens en het varken. De huidige commerciële influenzavaccins voor het varken zijn geïnactiveerde, multivalente vaccins. De influenza virusstammen worden vooraf vermeerderd in eieren of op celculturen. In tegenstelling tot de griepvaccins voor de mens zijn de vaccins voor het varken meestal gehele geïnactiveerde virussen met een adjuvans, vaak een olie-emulsie. Een levend verzwakt vaccin voor intranasale toediening en een RNA-vaccin zijn enkel in de VSA op de markt. De geïnactiveerde vaccins zijn niet gestandaardiseerd wat betreft de antigene dosis, het aantal en soort vaccinstammen en het soort adjuvans. Er bestaat ook geen organisatie die advies verleent in verband met de selectie van vaccinstammen, of het al dan

niet vervangen van oudere stammen door meer recente. Voor varkens zijn griepvaccins eventueel ook beschikbaar als combinatievaccins met o.a. *Mycoplasma hyopneumoniae*, porcien parvovirus, etc. (Van Reeth en Ma, 2013).

De grootste moeilijkheid voor de selectie van geschikte vaccinstammen is de complexe epidemiologie van varkens influenza (zie 5.2), waarbij genetisch en antigenisch verschillende H1 en H3 influenzavirussen circuleren in verschillende delen van de wereld. Om deze reden worden de varkens influenzavaccins voor Noord-Amerika en Europa lokaal geproduceerd en bevatten ze totaal verschillende stammen. In Noord-Amerika bevatten de vaccins twee tot vijf verschillende H1N1 en H3N2 stammen. De H3N2 stammen behoren tot cluster I of cluster IV; één vaccin bevat beide H3N2 clusters (Van Reeth en Ma, 2013).

Tabel 2 toont de samenstelling van de verschillende producten die beschikbaar zijn in Europa. Over het algemeen bevatten deze vaccins oudere virusstammen dan in de VSA. Dit heeft deels te maken met het feit dat sommige Europese vaccins reeds in de jaren '80 werden ontwikkeld, maar ook met strengere vereisten voor registratie van diergeneeskundige vaccins in Europa dan in de VSA. Indien de fabrikant de stammen uit het vaccin zou willen wijzigen, moeten namelijk opnieuw vaccinatie challenge proeven worden uitgevoerd tegenover de nieuwe stammen. In de VSA daarentegen volstaat het de werkzaamheid aan te tonen op basis van serologisch onderzoek van gevaccineerde varkens. Bovendien ligt de vaccinatiegraad in de VSA, waar ongeveer 70 % van de productiebedrijven tegen varkens influenza vaccineert, veel hoger dan in Europa (Vincent et al., 2008). In de VSA worden ook autologe geïnactiveerde vaccins, waarin bedrijfsspecifieke stammen worden ingesloten, steeds populairder (Van Reeth en Ma, 2013).

Griepvaccins voor het varken worden vooral gebruikt in zeugenbedrijven met de bedoeling een goede maternale immuniteit te verkrijgen bij de jonge biggen en zo griepgerelateerde problemen tijdens de eerste levensweken te vermijden. Bij biggen afkomstig van gevaccineerde zeugen kunnen de maternale antistoffen tot de leeftijd van 8 tot 14 weken aanwezig blijven (Markowska-Daniel et al., 2011). Bij jonge biggen en mestvarkens wordt

eerder zelden tegen influenza gevaccineerd (Beaudoin et al., 2012). Op het moment van vaccinatie zijn er mogelijks nog maternale antistoffen aanwezig die ervoor kunnen zorgen dat het vaccin niet aanslaat (Allerson et al., 2013).

Tabel 2. Commercieel beschikbare influenzavaccins voor het varken in Europa. Namen van de virusstammen worden vermeld, tenzij niet bekend gemaakt door de producent (Van Reeth en Ma, 2013).

Productnaam (producent)	Aantal stammen	Soort stammen	Adjuvant	Beschikbaarheid
Gripork (Hipra)	Bivalent	- Sw/Olost/84 (H1N1) - A/Port Chalmers/1/73 (H3N2)	Olie	Spanje, Portugal
Fluen-Suivax (Fatro)	Bivalent	- H1N1 - H3N2	Aluminium hydroxide	Italië
Izovac-Suiflu (Izo)	Bivalent	- Sw/OMS/2899/82 (H1N1) - Sw/OMS/3622/84 (H3N2)	Aluminium hydroxide	Italië
Respiporc Flu3 Gripovac 3 (Impfstoffwerk Dessau-Tornau)	Trivalent	- Sw/Haselunne/2617/03 (H1N1) - Sw/Bakum/1769/03 (H3N2) - Sw/Bakum/1832/00 (H1N1)	Carbomer	Meeste Europese landen

Zoals getoond in Tabel 2 bevatten sommige Europese varkens influenzavaccins H3N2 stammen uit de jaren '70 of '80. Deze stammen bieden deels nog wel bescherming tegen recentere Europese stammen, maar niet tegen de sterk verschillende Noord-Amerikaanse stammen (Vleeschauwer et al., 2015). De bredere kruisreactiviteit is het gevolg van het adjuvant in het vaccin. Dat zorgt niet alleen voor hogere antistoftiters, maar ook voor een bredere kruisreactiviteit van de antistofrespons (Dormitzer et al., 2011).

5.6 Heterologe prime-boost vaccinatie met influenzavirussen

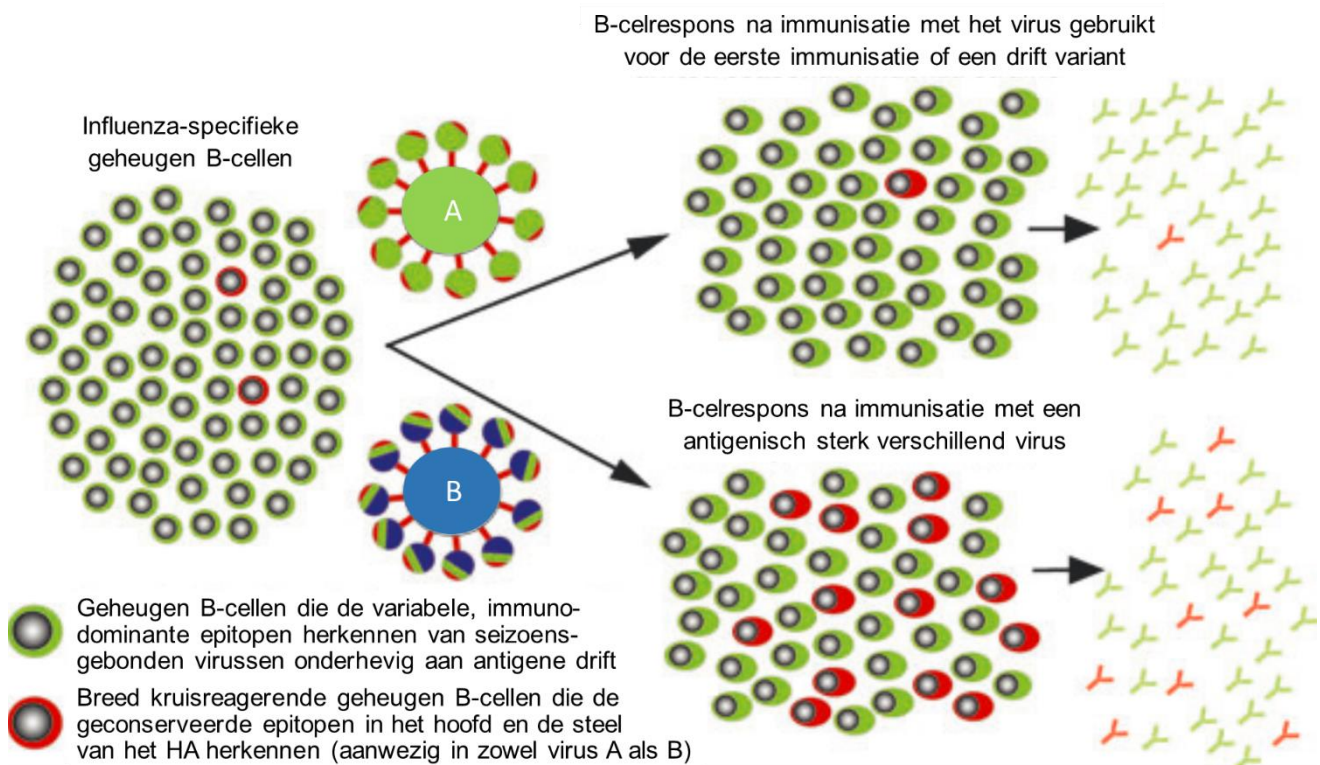
Heterologe prime-boost vaccinatie is een manier om de immuunrespons te verbreden. Deze strategie bestaat erin verschillende vaccins te gebruiken voor de eerste (primo-) en de

herhalings (booster-) vaccinatie. Het kan hier gaan om: (1) verschillende soorten vaccins gebaseerd op hetzelfde antigen (bv levend verzwakt en geïnactiveerd vaccin); (2) dezelfde soorten vaccins gebaseerd op antigenisch verschillende varianten van eenzelfde virus; (3) een combinatie van beide.

In kippen en eenden werd reeds aangetoond dat een primovaccinatie met een H5 “fowlpox”-gebaseerd vectorvaccin gevolgd door een boostervaccinatie met een heteroloog, geïnactiveerd H5 vaccin resulteert in een bredere immuunrespons dan twee toedieningen van hetzelfde geïnactiveerd vaccin (Bublot et al., 2008; van den Berg et al., 2008).

Bij de mens werd de interesse voor heterologe prime-boost influenza vaccinatie gewekt tijdens de H1N1 griepandemie in 2009, die veroorzaakt werd door een virus afkomstig van het varken. Dit pandemisch H1N1 (H1N1pdm09) virus was antigenisch sterk verschillend van de tot dan toe circulerende seizoensgebonden H1N1 influenzavirussen. Echter, in aanwezigheid van immuniteit tegen de seizoensgebonden H1N1 bleek één vaccinatie met H1N1pdm09 voldoende om bescherming te bekomen, terwijl individuen zonder immuniteit een dubbele vaccinatie nodig hadden. Bovendien ontwikkelden de individuen met vooraf aanwezige immuniteit tegenover de seizoensgebonden H1N1 een brede antistofrespons na vaccinatie of infectie met het H1N1pdm09 (Li et al., 2012; Chiu et al., 2013). Er werden monoklonale antistoffen aangetoond met een neutraliserend vermogen tegenover sterk verschillende virusvarianten binnen één subtype en zelfs tegenover meerdere subtypen (Clementi et al., 2012; Ekiert en Wilson 2012). De breed reagerende antistoffen bleken gericht te zijn tegenover geconserveerde epitopen in het hoofd en in de weinig variabele steel van het HA. Dit fenomeen kan verklaard worden als volgt (Figuur 4). Bij een initiële influenzavirus infectie of -vaccinatie worden voornamelijk antistoffen en geheugen B-cellen aangemaakt tegen de immunodominante, variabele epitopen in het hoofd van het HA. Slechts een kleine fractie van de B-cellen produceren neutraliserende antistoffen tegenover de subdominante, geconserveerde epitopen in het hoofd en de steel van het HA. Bij daaropvolgende (booster-) infecties of vaccinaties met hetzelfde of een zeer gelijkaardig (drift variant) virus, worden de

B-cellen tegenover de variabele epitopen herhaaldelijk gestimuleerd en blijven deze B-cellen bijgevolg dominant. De geheugen B-cellen die reageren met de geconserveerde epitopen in het hoofd en in de steel van het HA vormen een duidelijke minderheid. Wanneer echter een (booster-) infectie of vaccinatie gebeurt met een virusstam waarvan de immunodominante epitopen van het HA vrijwel volledig verschillen (zoals H1N1pdm09) van deze van het voorgaande virus (heterologe prime-boost), kunnen enkel de geheugen B-cellen gericht tegenover de geconserveerde epitopen het nieuwe virus herkennen. In dit geval zullen deze zeldzame kruis reagerende geheugen B-cellen gestimuleerd worden en het immuun-antwoord domineren.



Figuur 4. Model voor het stimuleren van breed reagerende geheugen B-cellen en antistoffen tegen influenzavirussen (gebaseerd op Li et al., 2012). A: hetzelfde virus als gebruikt voor de primo-immunisatie of een drift variant; B: virus van een verschillende antigene cluster.

Aan het Laboratorium voor Virologie, faculteit Diergeneeskunde werd reeds een grootschalig experiment uitgevoerd om de heterologe prime-boost vaccinatie strategie te testen bij het varken. Hierbij werd gebruik gemaakt van experimentele, geïnactiveerde vaccins op basis van antigenisch sterk verschillende H3N2 virussen van het varken. Er werd gekozen voor sw/Gent/172/2008 (G08) en sw/Pennsylvania/A01076777/2010 (PA10). G08 stamt af van het humane A/Hong Kong/1/1968 en vertegenwoordigt de H3N2 virussen in de Europese varkenspopulatie. PA10 heeft het humane A/Nanchang/933/1995 (NC95) als voorouder en vertegenwoordigt de cluster IV H3N2 varkens influenzavirussen in Noord-Amerika (Figuur 2). Door te vaccineren met G08 gevolgd door PA10 ontstaat bescherming tegen beide virussen, wat niet het geval is met de traditionele vaccinatie strategie bestaande uit het toedienen van eenzelfde virus bij de eerste en tweede vaccinatie of het toedienen van de twee virusstammen tegelijk. Bovendien zorgt de heterologe prime-boost vaccinatie ook voor bescherming tegen een hele reeks heterologe H3N2 virusstammen, met uitzondering van de meest recente humane stammen (Van Reeth et al., 2017).

6 Probleemstelling en doelstelling

Zoals reeds beschreven kunnen de humane griepvaccins geen bescherming bieden tegenover nieuwe varianten van het H3N2 influenzavirus, die om de paar jaar opduiken. De vaccins voor het varken kunnen dan weer onmogelijk bescherming bieden tegenover alle H3N2 varkens influenzavirussen die wereldwijd circuleren. Ook zijn de vaccins voor de mens niet werkzaam tegen de virussen van het varken, en omgekeerd.

Aan het Laboratorium voor Virologie, faculteit Diergeneeskunde werden reeds veelbelovende resultaten bekomen door een tweevoudige influenza vaccinatie van varkens met twee verschillende geïnactiveerde virusstammen. Deze methode wordt “heterologe prime-boost” vaccinatie genoemd. Ze biedt ook mogelijkheden voor het verbeteren van de werkzaamheid van griepvaccinatie bij de mens. De vorige experimenten werden echter uitgevoerd bij influenza naïeve varkens, vergelijkbaar met de situatie bij kinderen. Maar volwassenen,

waarbij influenzavaccins hoofdzakelijk worden ingezet, hebben in het verleden reeds meerdere influenza infecties doorgemaakt. Hierdoor stelt zich de vraag in hoeverre de heterologe prime-boost vaccinatie even goed zal werken bij individuen die reeds een H3N2 infectie hebben doorgemaakt.

7 Materiaal en methoden

7.1 Varkens

Er werd gewerkt met influenzavirus seronegatieve biggen. Deze biggen waren bij aankomst 5 weken oud en afkomstig van een conventioneel bedrijf met een hoge gezondheidsstatus en vrij van IAV. Bij de start van het experiment waren alle biggen vrij van HI-antistoffen tegenover volgende influenzavirussen: sw/Belgium/1/1998 (H1N1), sw/Gent/172/2008 (H3N2), sw/Gent/7625/1999 (H1N2) en A/California/04/2009 (H1pdm09). Deze virussen zijn representatief voor de influenzavirussen die momenteel circuleren in de Europese varkenspopulatie. De biggen werden gehuisvest in isolatiestallen met een HEPA-filter. Bij aankomst kreeg elk big een intramusculaire injectie met ceftiofur (Naxcel®, Pfizer-1ml/20 kg lichaamsgewicht).

7.2 Influenzavirussen en vaccins

Vier verschillende influenzavirussen werden gebruikt voor immunisatie en/of challenge van de dieren. Het humane virus A/Nanchang/933/1995 (NC95) diende voor het nabootsen van de immuniteit tegenover een virus dat ca. 30 jaar geleden bij de mens circuleerde en waarmee de meeste mensen ouder dan 30 jaar in contact gekomen zijn. Twee H3N2 virussen van het varken, één uit Europa en één uit Noord-Amerika, werden gebruikt voor immunisatie met geïnactiveerd vaccin. Sw/Gent/172/2008 (G08) werd geïsoleerd in 2008 bij een uitbraak met acute respiratoire symptomen bij vleesvarkens in Oost-Vlaanderen. Sw/Pennsylvania/A0107677/2010 (PA10) werd in 2010 geïsoleerd in de Amerikaanse staat Pennsylvania. Dit virus behoort tot de zogenaamde “cluster IV” H3N2 varkens

influenzavirussen. Beide virussen werden reeds gebruikt in voorgaande heterologe prime-boost vaccinatie studies bij het varken (Van Reeth et al., 2017). Om de bescherming tegenover challenge na te gaan gebruikten we een virus uit de meest recente antigene cluster bij varkens in de VSA, de zogenaamde “novel reassortant” H3N2, sw/Missouri/A01840724/2015 (MO15). Het HA van dit virus is afkomstig van een humaan virus uit de periode 2010-2011 en het vertoont sterke genetische en antigene verschillen met de drie virussen die werden gebruikt voor immunisatie.

Alle virussen werden opgegroeid in een continue cellijn van honden nier cellen (Madin-Darby Canine Kidney MDCK) volgens standaardprocedures (Van Reeth et al., 2017).

Voor het bereiden van de vaccins werden de virusstocks daarna geïnactiveerd. Het virus wordt hiervoor op ijs onder ultraviolet (UV) licht geplaatst zoals eerder beschreven (Van Reeth et al., 2017). Om te controleren of het virus volledig geïnactiveerd werd, werden twee passages met het geïnactiveerd materiaal uitgevoerd op MDCK cellen. Het geïnactiveerde virus werd bewaard bij -70 °C om later te analyseren met een HA-test. Op basis van de resultaten van deze test werden beide vaccins op 256 HAE per dosis van 1.6 ml gebracht door de virusstocks aan te lengen met fosfaat gebufferde zoutoplossing (FGZ). Daarna werd nog 0.4 ml (20 % w/v) commerciële olie-in-water adjuvant per dosis toegevoegd.

7.3 Proefopzet

Er werden 2 experimenten uitgevoerd: een preliminair experiment (experiment 1) met 11 biggen en het eigenlijke experiment (experiment 2) met 30 biggen.

In experiment 1 werd het humane virus NC95 getest voor zijn vermeerdering bij het varken. Elf biggen werden at random ingedeeld in drie groepen, zoals getoond in Tabel 3. Eén groep (n=4) werd geïnoculeerd met een lage virus dosis, $3.6 \log_{10} \text{TCID}_{50}$. Een tweede groep (n=4) kreeg een hogere virus dosis, $4.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}$. De derde groep (n=3) werd niet geïnoculeerd en diende als challenge controle groep.

De inoculatie gebeurde intranasaal met behulp van een tepelcanule en een injectiespuit. De individuele dosis (3 ml) werd verdeeld over beide neusopeningen. Op dag 0, 2, 4, 6, 8 en 10

na de inoculatie werden van alle varkens neusswabs (Figuur 5) verzameld om de virusvermeerdering na te gaan.



Figuur 5. Het verzamelen van neusswabs. Hierbij wordt het varken vastgehouden met een metalen strop. Er wordt van beide neusgaten een aparte swab genomen m.b.v. een wattenstaafje (met een aluminium staaf). Na afname worden de neusswabs op ijs bewaard en na afloop gesuspendeerd in 1 ml transportmedium.

Tien weken na inoculatie volgde de challenge met NC95 aan een dosis van $7 \log_{10}$ TCID₅₀. Neusswabs voor virustitratie werden verzameld bij challenge en 3 dagen later bij euthanasie. Bij het afslachten werden stalen van de bovenste (nasale mucosa en trachea) en onderste (linker en rechter long) luchtwegen verzameld en bewaard bij -70 °C in afwachting van de virustitratie om de graad van vermeerdering van het virus na challenge na te gaan. De stalen werden voorgaand aan de virustitratie verwerkt tot 20 %-ige suspensies.

De serologische respons werd opgevolgd door collectie van een 10 ml bloedstaal per varken op dag 0, dag 21, dag 41, dag 56, dag 76 en dag 79 post inoculatie.

In experiment 2 werd nagegaan wat het effect is van een voorafgaande infectie met NC95 op de homologe en heterologe prime-boost vaccinaties met G08 en/of PA10. Dertig biggen werden at random ingedeeld in zes groepen van vijf dieren, zoals getoond in Tabel 4. Aan de niet geïmmuniseerde challenge controle groep werd FGZ toegediend in plaats van infectieus virus of geïnactiveerd vaccin. De groep infectie NC95 werd enkel geïnoculeerd met NC95,

zonder daaropvolgende vaccinaties. Vier groepen werden eerst geïnoculeerd met NC95 en kregen 6 en 10 weken later geïnactiveerd vaccin toegediend, in een homologoog of heteroloog prime-boost regime.

Op basis van het preliminair experiment werd gekozen voor een inoculatiedosis van $4.9 \log_{10}$ TCID₅₀ NC95. De inoculatie gebeurde zoals in experiment 1. Neusswabs (Figuur 5) voor virustitratie werden verzameld op dag 0, 2, 4, 6, 8 en 10 na inoculatie om na te gaan of de virusinoculatie geslaagd was. Bij de controle groep werden er neusswabs genomen op dag 0 en 10 om na te gaan of de dieren influenza negatief bleven.

Bloedstalen werden verzameld op dag 0, 28, 46, 64, 77, 92, 106 en 117 na inoculatie om de serologische respons na te gaan.

Op 6 weken na de derde immunisatie werden alle dieren onderworpen aan een intranasale challenge met $7 \log_{10}$ TCID₅₀ MO15. Neusswabs voor virustitratie werden verzameld op de dag van challenge en 3 dagen later bij euthanasie. Stalen van de bovenste (trachea) en onderste (rechter long) luchtwegen werden verzameld en verwerkt zoals hoger beschreven.

Tabel 3. Proefopzet experiment 1

Groep	Aantal biggen	Primo-inoculatie (Week 0)	Challenge (Week 10)
Niet geïmmuniseerde challenge controle	3	-	NC95, 7 log ₁₀ TCID ₅₀
Infectie NC95, lage dosis	4	NC95, 3.6 log ₁₀ TCID ₅₀	NC95, 7 log ₁₀ TCID ₅₀
Infectie NC95, hogere dosis	4	NC95, 4.3 log ₁₀ TCID ₅₀	NC95, 7 log ₁₀ TCID ₅₀

Tabel 4. Proefopzet experiment 2

Groep	Aantal biggen	Primo- inoculatie	Vaccinatie 1 (Week 6)	Vaccinatie 2 (Week 10)	Challenge (Week 16)
Niet geïmmuniseerde challenge controle	5	FGZ	FGZ+adjuv.	FGZ+adjuv.	MO15
Infectie NC95	5	NC95	FGZ+adjuv.	FGZ+adjuv.	MO15
Infectie NC95- vaccinatie G08-G08	5	NC95	G08	G08	MO15
Infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10	5	NC95	PA10	PA10	MO15
Infectie NC95- vaccinatie G08-PA10	5	NC95	G08	PA10	MO15
Infectie NC95- vaccinatie PA10-G08	5	NC95	PA10	G08	MO15

7.4 Serologische testen

Alle sera werden onderzocht in een HI-test tegenover de drie virussen die werden gebruikt voor de immunisaties. De sera verzameld op 2 weken na de laatste immunisatie werden eveneens getest tegen vijftien bijkomende H3N2 influenzavirussen (Tabel 8) die antigenisch verschillend waren van NC95, G08 en PA10. In experiment 1 werd naast de HI-test ook een VN-test uitgevoerd tegenover NC95. Alle stalen werden voor gebruik geïnactiveerd door ze gedurende 30 minuten bij 56 °C te brengen.

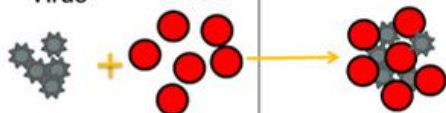
7.4.1 Hemagglutinatiesinhibitie (HI)

De serumstalen werden vooraf behandeld met receptor destroying enzyme (RDE) en met een oplossing van 50 % kalkoen erythrocyten. Deze voorbehandelingen dienen om respectievelijk niet-specifieke inhibitoren van de hemagglutinatiesinhibitie en niet-specifieke hemagglutinininen te verwijderen. Hierdoor bedraagt de startverdunding van het serum 1/10.

De HI-test gebeurt in U-vormige 96-well microtiterplaten. In de eerste rij brengen we 50 µl van elk te testen serum. In alle overige rijen wordt 25 µl FGZ toegevoegd. Om tweevoudige verdundingen van de sera te bekomen, brengen we 25 µl over van de eerste rij naar de volgende enz.,... Met uitzondering van de laatste rij waar 25 µl serum wordt toegevoegd; deze dient als serumcontrole. Uit deze controle kunnen we uitmaken of alle niet-specifieke agglutinininen uit het serum verwijderd zijn.

Vervolgens wordt aan alle rijen 25 µl virussuspensie toegevoegd, met uitzondering van de serumcontrole. De virussuspensie moet een constante hoeveelheid virus bevatten, nl. 4 hemagglutinerende eenheden (HAE) per 25 µl. Hiertoe worden de virusstocks, waarvan de HA-titer reeds gekend is uit vroegere testen, verdund in FGZ tot 4 HAE per 25 µl. Ter controle van de verdunding wordt dan voorafgaand aan de eigenlijke HI-test een zogenaamde terugtitratie uitgevoerd. De terugtitratie wordt in viervoud uitgevoerd voor elke virusstam. Op basis van de resultaten kan, indien nodig, de verdunding voor gebruik in de test aangepast worden. We laten het virus serum mengsel gedurende 1 uur incuberen bij kamertemperatuur,

zodat eventueel aanwezige antistoffen de kans krijgen om met het virus te reageren. Daarna voegen we een 0.5 % oplossing van de kalkoen erythrocyten toe en volgt opnieuw 1 uur incubatie bij kamertemperatuur. Voor het aflezen wordt de plaat onder een hoek van 90 ° geplaatst voor een witte achtergrond. In de wells met inhibitie van de hemagglutinatatie zal de 'knop' van erythrocyten traanvormig naar beneden lopen. Het omgekeerde van de hoogste serum verdunning die nog inhibitie van de hemagglutinatatie (Figuur 6) veroorzaakt, is de HI-antistoftiter.

	Components	Interaction	Microtiter Results
A	RBCs		No Reaction 
B	Virus + RBCs		Hemagglutination 
C	Virus + Antibody + RBCs		Hemagglutination Inhibition 

Figuur 6. De hemagglutinatatie inhibitie-test (HI) gaat de reactie na tussen erythrocyten, antistoffen en influenzavirus. In afwezigheid van influenzavirus zullen de erythrocyten in de oplossing naar de bodem van de microtiterplaat zakken waardoor ze het uitzicht krijgen van een rode 'knop' (rij A). Indien erythrocyten samen met influenzavirussen in oplossing gebracht worden, zullen ze binden aan het hemagglutinine (HA) van het virus, waardoor een netwerk van erythrocyten en virus wordt gevormd (rij B). Dit fenomeen wordt hemagglutinatatie genoemd. Wanneer er antistoffen aanwezig zijn die aan het virus binden, wordt voorkomen dat het virus aan de erythrocyten zal binden en wordt de hemagglutinatatie verhinderd (rij C) (Uit: CDC, 2017b).

7.4.2 Virus neutralisatie (VN)

De VN-test is een erg sensitieve en specifieke test, die de titer van de neutraliserende antistoffen meet. De test is gebaseerd op de inhibitie van influenzavirus infectie van een cel door neutraliserende antistoffen. HI- en VN-testen detecteren grotendeels dezelfde soorten

antistoffen, de resultaten zijn dus gelijklopend. De VN-test is echter nog gevoeliger dan de HI-test. Zeer lage antistoftiters kunnen dus met de VN-test gemakkelijker worden opgespoord.

De VN-test wordt uitgevoerd in 96-well microtiterplaten met vlakke bodem. In de eerste rij brengen we 75 µl “minimal essential medium”, in alle overige rijen 50 µl. Dit medium bevat enkele essentiële voedingsstoffen voor de cellen en daarnaast ook antibiotica. Daarna wordt 25 µl van elk te testen serum aan de eerste rij toegevoegd en worden tweevoudige serum verdunningen gemaakt door 50 µl van de eerste rij naar de volgende rij, enz.,... te brengen. Aan elke verdunning wordt vervolgens 50 µl van een constante hoeveelheid, nl. 100 TCID₅₀ van het influenzavirus, toegevoegd. Daarna wordt het virus serum mengsel gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37 °C.

Vervolgens worden MDCK cellen toegevoegd aan een concentratie van 40.000 cellen per well. Alleen de niet geneutraliseerde influenzavirussen kunnen nog in de cellen vermeerderen. Na 24 uur incubatie worden de platen gefixeerd door ze te wassen met FGZ en te drogen in een broedstoof (37 °C) gedurende 2 uur. Vervolgens worden de platen ingevroren bij -20 °C, waardoor alle biologische processen in de cellen en de virusvermeerdering worden stilgelegd. Na minimum 12 uur bij -20 °C volgt een immunocytochemische kleuring om de virus-positieve MDCK cellen zichtbaar te maken. Hiertoe worden de cellen eerst gefixeerd door 100 µl paraformaldehyde (4 %) toe te voegen aan elke well. Voor de kleuring wordt gebruik gemaakt van een monoklonale antistof tegenover het influenzavirus nucleoproteïne, polyklonaal geit anti-muis IgG gekoppeld aan peroxidase en het substraat 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC). Na kleuring worden de platen onder de lichtmicroscopie beoordeeld. Een well is viruspositief wanneer er minstens één gekleurde cel wordt aangetroffen. In het andere geval, wanneer er geen gekleurde cellen aanwezig zijn, heeft er geen virusvermeerdering plaatsgevonden. Als VN-antistoftiter neemt men het omgekeerde van de serum verdunning die nog in staat is de hoeveelheid virus volledig te neutraliseren.

7.5 Virustitratie

Er werden virustitraties uitgevoerd van neusswabs en van stalen van de neusmucosa, trachea en longen. De neusswabs werden na afname bewaard op ijs, vervolgens gesuspenseerd in 1 ml transportmedium en gedurende 1 uur krachtig geschud met een schudtoestel bij 4 °C, en nadien bewaard bij -70 °C. Alvorens de eigenlijke titratie te starten, werden de stalen eerst gecentrifugeerd (10397 g, 5 min, 4 °C) om de bevuilding die meekwam met het nemen van de swab te laten bezinken.

Van de weefselstalen werd een 20 %-ige suspensie bereid. Hiertoe werden de stalen gewogen en vervolgens met een mixer gehomogeniseerd in FGZ met 1 % penicilline-streptomycine.

De titraties werden uitgevoerd op 2- tot 3- dagen oude MDCK cellen in 96-well microtiterplaten. Alle stappen van de procedure werden uitgevoerd in de laminaire flow. Eerst werden tienvoudige verdunningen van de te testen stalen aangelegd in “minimal essential medium” (onverdund t.e.m. 10^{-7}). Dit medium bevat enkele essentiële voedingsstoffen voor de cellen en daarnaast ook antibiotica en trypsine. Het medium van de cellen werd eerst afgezogen met een steriele naald en de cellen werden gewassen met FGZ. Met elke verdunning werden vier wells geïnoculeerd. De microtiterplaat werd vervolgens gedurende 2 uur in de CO₂ broedstoof (37 °C) geïncubeerd.

Na incubatie werden de onverdunde en de tienmaal verdunde stalen weggenomen, gewassen met FGZ en vervangen door medium. Deze weinig verdunde weefselstalen kunnen namelijk toxische effecten hebben op de cellen. Aan de volgende verdunningen (10^{-2} t.e.m. 10^{-7}) werd medium toegevoegd. De platen werden daarna opnieuw in de CO₂ broedstoof geïncubeerd. Dagelijks werden de platen bekeken voor het al dan niet optreden van cytopathisch effect (CPE). Geïnfecteerde cellen vertonen CPE, dat wordt gekenmerkt door zwelling en verschrompeling van de cellen en vorming van syncytia. Niet-geïnfecteerde cellen behouden hun typische monolaag. De virustiter is het omgekeerde van de verdunning waarbij 50 % van de wells CPE vertoont en 50 % niet. Deze verdunning is dus het 50 % eindpunt. Het eindpunt van de titratie zal echter zelden zo komen te liggen dat men het op het zicht kan aflezen. De

berekening van de virustiters gebeurt volgens de methode van Reed en Muench; ze worden uitgedrukt als $\log_{10} \text{TCID}_{50}$ per gram weefsel of per 100 mg neussecreet. De detectielimiet van de virustitratie bedroeg $1.7 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ voor beide soorten stalen. We kunnen dus zeggen dat de stalen die negatief waren een waarde hebben lager dan deze detectielimiet.

7.6 Statistische analyse

De stalen die negatief testten voor virus of antistoffen kregen een waarde die overeenkomt met de helft van de minimaal detecteerbare titer. Voor de virustitraties van neusswabs en weefselstalen was dit $0.9 \log_{10} \text{TCID}_{50}$. Voor HI- en VN-testen was dit respectievelijk 5 en 2.

In experiment 1 werden de groep met de lage en de hogere virus inoculatie dosis onderling vergeleken voor virus excretie en serologische respons na de primo-inoculatie. Na challenge werden beide groepen vergeleken met de controle groep voor virustiters.

In experiment 2 werd de serologische respons tegenover de drie immunisatie virussen vergeleken tussen de homologe en heterologe gevaccineerde groepen, alsook tussen de gevaccineerde groepen en de infectie-immune groep. Na challenge werden de virustiters van zowel de infectie-immune controle groep als de challenge controle groep vergeleken met deze van de gevaccineerde groepen.

Voor analyse van virustiters werd de two-way ANOVA test gebruikt. De Kruskal-Wallis test werd gebruikt om antistoftiters te vergelijken. $P < 0.05$ werd beschouwd als statistisch significant.

8 Resultaten

8.1 Bepalen van een geschikte inoculatiedosis van het virus A/Nanchang/933/1995

8.1.1 Virusexcretie en antistofrespons na inoculatie van varkens met twee verschillende dosissen van A/Nanchang/933/1995

Tabel 5 toont de virustiters in de neusswabs tussen 0 en 10 dagen na inoculatie met A/Nanchang/933/1995 (NC95). Bij de groep geïnoculeerd met de lage dosis testten slechts twee van de vier dieren positief, op één (V-17-2690) of enkele (V-17-2603) tijdstippen. Ook in de groep geïnoculeerd met de hogere dosis waren slechts twee van de vier dieren positief. Het totaal aantal positieve stalen (zes versus vier) en de maximale virustiters (5.2 versus 3.8 $\log_{10}$ TCID₅₀) waren echter iets hoger in de laatstgenoemde groep, maar het verschil in virustiters was niet significant ($p=0.279$).

Tabel 6 toont het verloop van de antistoftiters in HI- en VN-testen bij dezelfde dieren. Dezelfde dieren waarbij virusexcretie werd aangetoond ontwikkelden ook HI- en VN-titers. Deze titers waren hoger bij de groep geïnoculeerd met de hogere dosis, maar opnieuw was het verschil op geen enkel tijdstip significant ($p=0.1184$ voor HI-antistoffen; $p=0.2633$ voor VN-antistoffen). De challenge controle groep bleef negatief voor virusexcretie en serum antistofrespons.

Tabel 5. Virusexcretie na inoculatie met A/Nanchang/933/1995 (NC95) aan twee verschillende dosissen.

Immunisatie groep	Nummer Varken	Virustiter ($\log_{10}$ TCID ₅₀ /100mg) in neusswabs op... dagen post inoculatie					
		0	2	4	6	8	10
Infectie NC95, lage dosis	V-17-2603	<1.7	1.7	3.5	2.0	<1.7	<1.7
	V-17-2605	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2606	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2690	<1.7	<1.7	3.8	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	1.1	2.3	1.1	0.9	0.9
Infectie NC95, hogere dosis	V-17-2588	<1.7	4.5	5.2	4.0	1.7	<1.7
	V-17-2592	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2593	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2599	<1.7	<1.7	2.4	3.0	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	1.8	2.3	2.2	1.1	0.9

Tabel 6. Serologische respons na inoculatie met A/Nanchang/933/1995 (NC95) aan twee verschillende dosissen.

Antistoftiters NC95 op... dagen post inoculatie											
Immunisatie groep	Nummer Varken	0		21		41		56		76	
		HI	VN	HI	VN	HI	VN	HI	VN	HI	VN
Infectie NC95, lage dosis	V-17-2603	<10	<4	20	12	10	12	10	12	10	12
	V-17-2605	<10	<4	<10	<4	<10	<4	<10	<4	<10	<4
	V-17-2606	<10	<4	<10	<8	<10	<4	<10	<4	<10	<4
	V-17-2690	<10	8	20	24	10	16	10	12	10	12
	Gemiddelde	5	3	10	7	7	5	7	5	7	5
Infectie NC95, hogere dosis	V-17-2588	<10	<4	640	768	160	128	80	192	80	128
	V-17-2592	<10	<4	10	<4	<10	<4	<10	<4	<10	<4
	V-17-2593	<10	<4	<10	<4	<10	<4	<10	<4	<10	<4
	V-17-2599	<10	<4	320	384	160	192	80	128	40	96
	Gemiddelde	5	2	57	33	28	18	20	18	17	15

HI=hemagglutinatie inhibitie; VN= virus neutralisatie

8.1.2 Evaluatie van de bescherming tegenover challenge met A/Nanchang/933/1995

Tabel 7 toont de virustiters in de neusswabs en de weefselstalen 3 dagen na challenge met NC95. Op moment van de challenge waren de neusswabs van alle dieren virus-negatief. Na de challenge kon bij alle dieren uit de challenge controle groep virus worden aangetoond in de neusswabs en in de neusmucosa, maar niet in de trachea of in de longstalen. Slechts bij één van de drie controle dieren werd een minimale hoeveelheid virus gevonden ($1.7 \log_{10} \text{TCID}_{50}$, dit is de detectielimiet) in het staal van de linker long. Ook bij de dieren die vooraf waren geïnfecteerd met NC95 kon geen virus worden aangetoond in de trachea en longen, met uitzondering van twee dieren (V-17-2588 en V-17-2593) met minimale virustiters in de trachea. Zowel de neusswabs als de neusmucosa testten negatief bij één van de vier dieren uit de “lage dosis” infectie-immune groep en bij drie van de vier dieren uit de “hogere dosis” groep. In beide infectie-immune groepen waren de gemiddelde virustiters in deze stalen significant lager ($p=0.00566$) dan in de challenge controle groep.

Tabel 7. Bescherming tegenover challenge met het homologe virus op 10 weken na inoculatie met A/Nanchang/933/1995 (NC95).

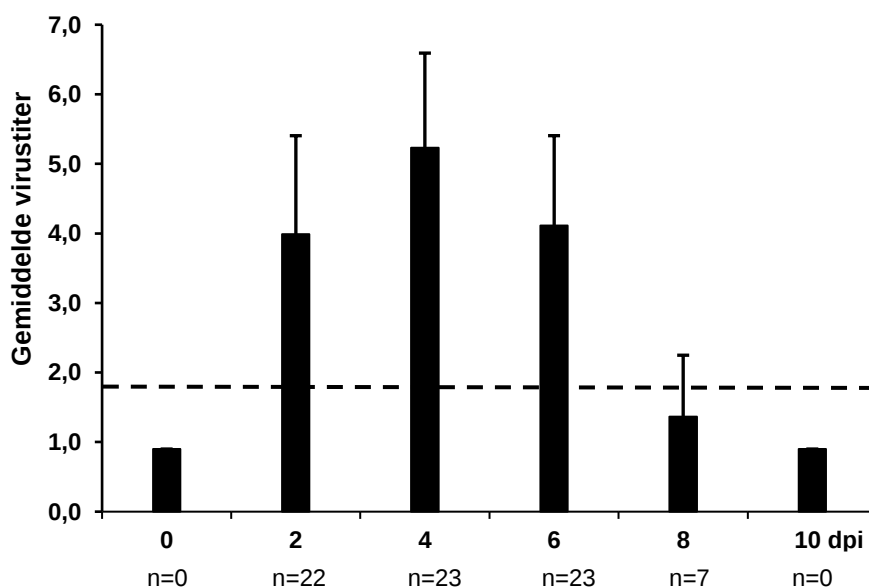
Virustiter in...						
Immunisatie groep	Nummer varken	Neusswabs	Neusmucosa	Trachea	Long Rechts	Long Links
Niet geïmmuniseerde challenge controle	V17-2577	4.0	4.3	<1.7	<1.7	<1.7
	V17-2578	1.8	5.7	<1.7	<1.7	1.7
	V17-2601	4.2	5.2	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	3.3	5.1	0.9	0.9	0.9
Infectie NC95, lage dosis	V-17-2603	1.8	4.5	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2605	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2606	2.4	5.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2690	2.4	1.8	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	1.9	3.2	0.9	0.9	0.9
Infectie NC95, hogere dosis	V-17-2588	<1.7	<1.7	1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2592	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2593	<1.7	4.5	1.8	<1.7	<1.7
	V-17-2599	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	1.8	1.3	0.9	0.9

Virustiters worden uitgedrukt in log₁₀ TCID₅₀/100mg neussceet of in log₁₀ TCID₅₀/g weefsel

8.2 Heterologe prime-boost vaccinatie bij varkens met infectie immuniteit tegenover A/Nanchang/933/1995

8.2.1 Virusexcretie na de primo-inoculatie met A/Nanchang/933/1995

In experiment 2 werden 5 van de 6 groepen of 25 dieren intranasaal geïnoculeerd met A/Nanchang/933/1995 (NC95). Van alle individuele dieren werden om de 2 dagen neusswabs verzameld gedurende de eerste 10 dagen na inoculatie. De individuele virustiters zijn terug te vinden in de bijlagen (Tabel 9). Figuur 7 toont het totaal aantal positieve dieren op de verschillende tijdstippen en de gemiddelde virustiters. Met uitzondering van één dier (V17-2763) scheidden alle dieren virus uit. Bij één dier konden geen virustiters worden bepaald door een schimmelcontaminatie van de genomen stalen (V-17-2769). Virusexcretie was aantoonbaar vanaf dag 2 en eindigde ten laatste op dag 8. Van de niet geïmmuniseerde challenge controle groep werden enkel neusswabs verzameld op dag 0 en dag 10, deze waren negatief.

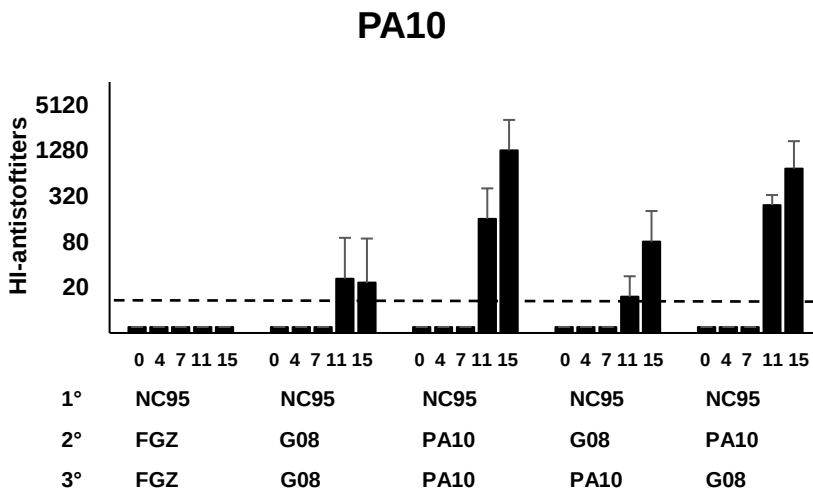
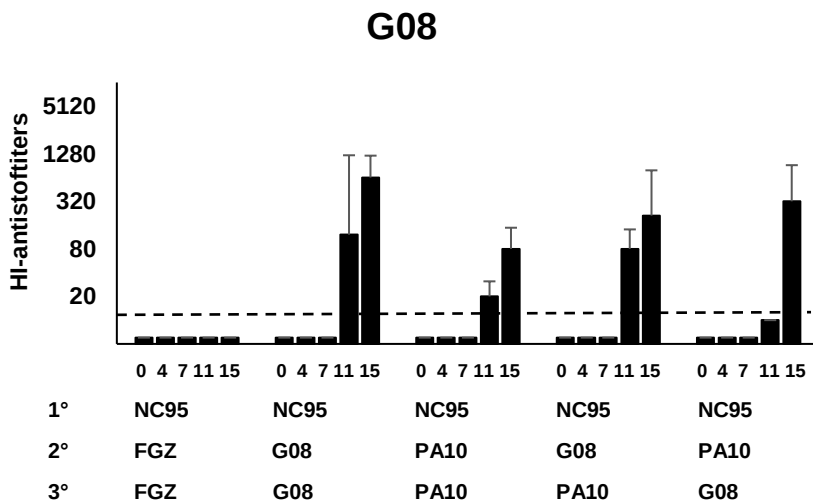
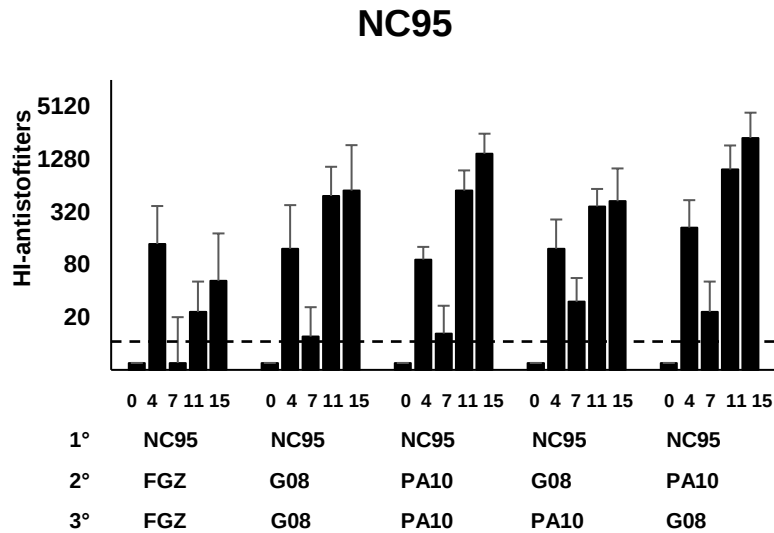


Figuur 7. Evolutie van de virusexcretie na inoculatie met A/Nanchang/933/1995 (NC95). De gemiddelde virustiters worden weergegeven door de balken, de detectielimiet door de stippellijn. De getallen onder de x-as staan voor het aantal dieren (op een totaal van 24) waarbij virus werd aangetoond. Dpi: dagen post inoculatie.

8.2.2 Evolutie van de antistofrespons tegenover de virusstammen gebruikt voor immunisatie

Alle sera werden onderzocht voor hun HI-antistoftiters tegenover NC95, sw/Gent/172/2008 (G08) en sw/Pennsylvania/A0107677/2010 (PA10). De antistoftiters van de individuele dieren op de verschillende tijdstippen worden getoond in de bijlagen (Tabel 10). Figuur 8 toont voor elk van de drie virusstammen de gemiddelde antistoftiters per groep op geselecteerde tijdstippen (week 0, 4, 7, 11 en 15 van het experiment). De niet geïmmuniseerde challenge controle groep testte op alle tijdstippen negatief tegenover de drie virussen.

De inoculatie met NC95 resulteerde bij alle groepen in een antistofrespons tegenover NC95, maar niet tegenover G08 of PA10. Het effect van de eerste vaccinatie is duidelijk op week 11. Zoals verwacht resulteerde deze vaccinatie in antistoftiters tegen de stam uit het vaccin. Daarnaast was er ook een meer dan twintigvoudige toename van de antistoftiter tegen NC95 en verschenen voor het eerst antistoffen tegenover de heterologe vaccinstam (G08 of PA10), maar dan in lagere hoeveelheden. De tweede vaccinatie, waarvan het effect duidelijk te zien is op week 15, gaf een sterke stijging van de antistoftiter tegenover de gebruikte vaccinstam. Er was opnieuw een booster van de antistoftiter tegen NC95, die vooral duidelijk was op 2 weken na deze vaccinatie (zie Tabel 10 in bijlagen). Na deze vaccinatie hadden de homologe prime-boost groepen een meer dan zestienmaal hogere antistoftiter tegenover de stam gebruikt voor vaccinatie dan tegen de heterologe stam, bij de heterologe prime-boost groepen was er minder dan viervoudig verschil tussen beide stammen. In alle gevaccineerde groepen waren de antistoftiters tegenover alle drie virussen hoger dan in de infectie-immune controle groep ($p < 0.001$ voor NC95, G08 en PA10). De groep infectie NC95- vaccinatie G08-G08 scoorde het zwakst, omdat hier de gemiddelde titer tegenover PA10 kleiner dan 40 bleef. De groep infectie NC95- vaccinatie PA10-G08 scoorde het best, omdat de gemiddelde titer tegenover alle drie virussen hoger dan 160 was. Het verschil tussen de homologe en heterologe prime-boost groepen was echter voor geen van de drie virussen significant ($p > 0.05$).



Figuur 8. Evolutie van hemagglutinatie inhibitie (HI)-antistoftiters tegenover de drie virussen gebruikt voor immunisatie (NC95, G08, PA10) in de verschillende groepen. Antistoftiters werden bepaald op 0, 4, 7, 11 en 15 weken na inoculatie met NC95; deze tijdstippen worden voor elk van de vijf groepen weergegeven onder de X-as. Het tijdsinterval tussen de inoculatie met NC95 (eerste immunisatie) en de primovaccinatie (tweede immunisatie) bedroeg 7 weken, tussen de primo- en de boostervaccinatie 4 weken (derde immunisatie). De challenge vond plaats op 15 weken na inoculatie met NC95.

8.2.3 Antistofrespons tegenover andere H3N2 virusstammen van varken en mens

We wilden ook nagaan in welke mate de sera zouden reageren met H3N2 influenzavirussen die antigenisch verschillend zijn van de virussen die werden gebruikt voor de immunisaties. Hiertoe gebruikten we sera verzameld op 2 weken na de laatste immunisatie, gezien de antistoftiters tegen NC95, G08 en PA10 op dat tijdstip een maximum bereikten. Deze sera werden onderzocht voor hun HI-antistoftiters tegenover de vaccinstammen, maar ook tegenover vijftien verschillende H3N2 virusstammen van het varken en de mens uit verschillende antigene clusters. De resultaten worden getoond in Tabel 12 (zie bijlagen) en Tabel 8. Bij de mens wordt een HI-antistoftiter ≥ 40 tegenover een bepaald influenzavirus beschouwd als beschermend tegenover dit specifieke virus. Uit challenge experimenten bij het varken is gebleken dat een antistoftiter ≥ 160 vereist is om bij 50 % van de dieren bescherming tegenover challenge te bekomen.

De niet geïmmuniseerde challenge controle groep bleef negatief in alle testen. In de infectie-immune controle groep werd enkel tegenover NC95 een gemiddelde antistoftiter ≥ 40 bereikt. Een tweevoudige vaccinatie van reeds infectie-immune dieren resulteerde in een sterke verbreding van de antistofrespons. Deze dieren werden onderzocht tegenover vijftien stammen die antigenisch afwijkend waren van de stammen gebruikt voor immunisatie. Tegenover tien tot twaalf van deze stammen werden HI-titers van ≥ 40 gedetecteerd. Antistoftiters tegenover recente humane H3N2 virussen (2005-2014) bleven echter onder de detectielimiet of heel laag in de vier groepen. Over het algemeen werden de hoogste antistoftiters en de breedste respons bekomen in de groepen infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10 en infectie NC95- vaccinatie PA10-G08. In beide groepen was de gemiddelde antistoftiter tegenover het challenge virus sw/Missouri/A01840724/2015 (MO15) ≥ 160 .

Tabel 8. Hemagglutinatatie inhibitie (HI)-antistoftiters tegenover heterologe H3N2 influenzavirussen uit verschillende antigenen clusters in verschillende groepen.

HI-titer tegenover...																		
Immunisatie groep	H3N2 varken EU			H3N2 varken VSA								Seizoensgebonden humane H3N2						
	G84	ENG87	G08	TX98	MN99	ONT05	PA10	IN11	IA11	MO12	MO15	VIC75	ENG88	NC95	WI05	PER09	VIC11	HK14
NC95-FGZ-FGZ	5 (0)	5 (0)	5 (0)	17 (5)	10 (3)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	6 (1)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	70 (5)	5 (0)	5 (0)	5 (0)	5 (0)
NC95-G08-G08	1470 (5)	160 (5)	2941 (5)	368 (5)	211 (5)	40 (5)	80 (5)	121 (5)	243 (5)	121 (5)	106 (5)	121 (5)	106 (5)	1114 (5)	5 (0)	7 (2)	6 (1)	5 (0)
NC95-PA10-PA10	160 (5)	30 (5)	485 (5)	1470 (5)	735 (5)	845 (5)	4457 (5)	3880 (5)	3378 (5)	211 (5)	640 (5)	35 (4)	184 (5)	5120 (5)	10 (2)	23 (5)	7 (2)	35 (5)
NC95-G08-PA10	279 (5)	46 (5)	970 (5)	243 (5)	121 (5)	46 (5)	320 (5)	243 (5)	422 (5)	160 (5)	139 (5)	48 (5)	160 (5)	2560 (5)	5 (0)	7 (2)	6 (1)	5 (0)
NC95-PA10-G08	368 (5)	23 (4)	1114 (5)	1940 (5)	1280 (5)	485 (5)	1470 (5)	1940 (5)	1689 (5)	2787 (5)	422 (5)	70 (5)	160 (5)	5881 (5)	9 (3)	10 (3)	12 (3)	7 (1)

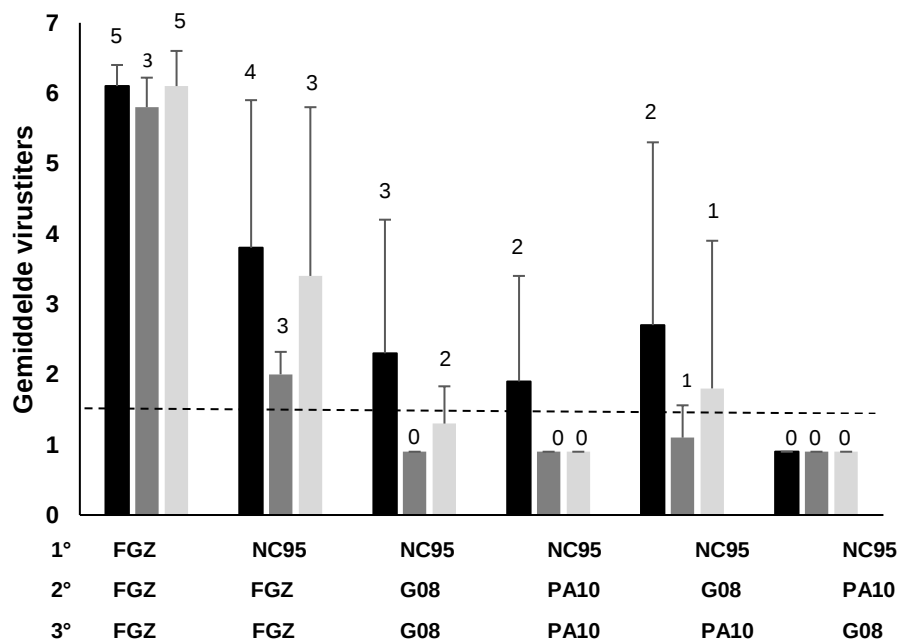
HI-antistoftiters werden 2 weken na de laatste vaccinatie (week 13) bepaald. Zie bijlage (Tabel 11) voor de volledige namen van de virussen gebruikt in de HI-testen. Virussen uit verschillende antigenen clusters worden aangeduid met verschillende kleuren. De startverdunding in de HI-test bedroeg 1:10, aan de negatieve stalen werd een HI-titer van 5 toegekend. Aan de gemiddelde HI-titers per groep wordt een kleurcode gegeven: Titer <10 10-39 40-159 160-630 ≥ 640

De aantallen tussen haakjes staan voor het aantal positieve dieren per groep van vijf dieren.

8.2.4 Bescherming tegenover challenge met het sw/Missouri/A01840724/2015

Op 1 maand na de laatste immunisatie werden de dieren onderworpen aan challenge met een hoge dosis van een H3N2 virus dat verschilt van de virussen gebruikt voor de immunisaties. Drie dagen na de challenge werden de dieren geëuthanaseerd voor onderzoek van de titers van het challenge virus in neusswabs, trachea en longstalen. De resultaten worden getoond in Tabel 14 (zie bijlagen) en Figuur 9. Er konden hoge virustiters worden aangetoond in alle onderzochte stalen van de niet geïmmuniseerde challenge controle groep. In de infectie-immune groep kon bij vier van de vijf dieren virus worden aangetoond in één of meer stalen. De gemiddelde virustiters waren wel lager dan deze in de niet geïmmuniseerde challenge controle groep. In de vier gevaccineerde groepen waren zowel het aantal positieve dieren als de gemiddelde virustiters significant gereduceerd in vergelijking met de niet geïmmuniseerde challenge controle groep ($p < 0.001$). Het verschil met de infectie-immune groep was bij drie van de vier gevaccineerde groepen significant ($p < 0.01$; $p = 0.15$ voor NC95-G08-PA10).

De groep infectie NC95- vaccinatie PA10-G08 vertoonde de meest volledige bescherming, bij deze groep kon geen vermeerdering van het challenge virus aangetoond worden.



Figuur 9. Bescherming tegenover challenge met sw/Missouri/A01840724/2015 (MO15). De balken tonen de gemiddelde virustiters ($\pm$ SD) per groep in de neusswabs (■) en stalen van de trachea (■) en rechterlong (■) op 3 dagen na challenge. Virustiters werden bepaald voor vijf (neusswabs en long) of drie dieren (trachea) per groep; de cijfers staan voor het aantal positieve dieren.

9 Discussie

In vroegere experimenten aan het Laboratorium voor Virologie werd aangetoond dat de immuunrespons tegenover H3N2 influenzavirussen bij het varken sterk kan worden verbreed door voor de eerste (primo-) en tweede (booster-) vaccinatie gebruik te maken van antigenisch verschillende H3N2 virusstammen (Van Reeth et al., 2017). Deze zogenaamde heterologe prime-boost vaccinatie zou ook voordelen kunnen bieden voor de controle van griep bij de mens. De genoemde experimenten werden echter uitgevoerd bij influenza naïeve biggen, terwijl jongeren en volwassenen steeds een basisimmunitet zullen hebben als gevolg van vroegere infecties met het menselijke H3N2 influenzavirus. Om deze situatie na te bootsen, werden de biggen uit het hoofdexperiment (experiment 2) van deze masterproef eerst geïnoculeerd met een infectieus H3N2 virus dat midden jaren '90 circuleerde bij de mens, A/Nanchang/933/1995 (NC95). Zes weken later kregen ze dan een tweevoudige vaccinatie met geïnactiveerde vaccins zoals in het vorige experiment (Van Reeth et al., 2017).

Een tweede belangrijk verschil met het vorige experiment is het virus dat werd geselecteerd om de bescherming tegenover challenge na te gaan, sw/Missouri/A01840724/2015 (MO15). Dit virus behoort tot de meest recente cluster van H3N2 varkens virussen en verschilt antigenisch sterk van alle drie virussen die werden gebruikt voor de immunisaties (Rajao et al., 2015). Er wordt ook aangenomen dat noch de griepvaccins voor de mens, noch de beschikbare vaccins voor het varken tegen dit virus kunnen beschermen. We vonden het daarom een zeer geschikte kandidaat om de “breedte” van de immuunrespons met onze experimentele vaccinatie strategieën te testen.

Het is reeds lang gekend dat humane H3N2 influenzavirussen zowel in de natuur als onder experimentele omstandigheden kunnen vermeerderen bij het varken. Anderzijds is de vermeerdering van dergelijke virussen bij hun niet-natuurlijke gastheer meestal minder efficiënt dan deze van een varkens geadapteerd influenzavirus. Slechts een beperkt aantal humane H3N2 influenzavirussen werden in het verleden onderzocht in experimenten bij het varken, en voor NC95 waren er nog geen gegevens. Daarom was een preliminair experiment voor het

bepalen van een geschikte inoculatiedosis een logische eerste stap. Er werd gekozen voor intranasale inoculatie en twee verschillende relatief lage dosissen: $3.6 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ en $4.3 \log_{10} \text{TCID}_{50}$. Het was immers de bedoeling de situatie na te bootsen bij mensen die jaren geleden aan een dergelijk virus werden blootgesteld. Er werd gestreefd naar een dosis waarbij alle dieren: (1) het virus zouden uitscheiden in het neussecreet, (2) een antistofrespons zouden ontwikkelen, (3) een volledige virologische bescherming zouden vertonen tegenover challenge met hetzelfde virus. In de groep met de “hogere” inoculatiedosis duurde de virusexcretie langer en waren de antistoftiters hoger, maar het aantal dieren dat geen respons vertoonde was in beide groepen gelijk. Wel was er in de groep met de “hogere” inoculatiedosis een volledige virologische bescherming tegenover challenge bij drie van de vier dieren, in vergelijking met slechts één van de vier dieren in de groep met de “lagere” inoculatiedosis. De resultaten na primo-inoculatie en challenge waren dus in overeenstemming.

Uit experiment 1 besloten we dat een inoculatiedosis van $4.3 \log_{10} \text{TCID}_{50} \text{ NC95}$ waarschijnlijk nog net iets te laag was om bij alle dieren een infectie-immuniteit op te wekken. Daarom werd gekozen voor $4.9 \log_{10} \text{TCID}_{50}$ voor het hoofdexperiment. Ondanks het feit dat de inoculatiedosis slechts viermaal hoger was dan in het preliminair experiment, vertoonden nu alle dieren een virologische en serologische respons, en zowel de virustiters als de antistoftiters waren vele malen hoger. Een mogelijke verklaring voor deze verschillen is dat de dieren uit experiment 1 niet helemaal influenza naïef waren bij de start van het experiment. De VN-resultaten (Tabel 6), waar één dier net positief tekent op de dag van inoculatie, wijzen in deze richting. Achteraf werd ook bevestigd dat zich op het bedrijf van herkomst van de dieren een influenza infectie had voorgedaan rond het tijdstip van de aankoop. De mogelijkheid bestaat dus dat ook bij de andere dieren reeds contact geweest was met influenzavirussen en/of reeds antistoffen aanwezig waren, die een invloed hadden op het eindresultaat, wat de resultaten van experiment 1 niet 100 % betrouwbaar maakt.

Na challenge van de niet geïmmuniseerde controle groep met $7 \log_{10} \text{TCID}_{50} \text{ NC95}$ konden we enkel virus detecteren in de neusswabs en neusmucosa, niet in de trachea en de longen. Dit

is in tegenstelling met de resultaten na experimentele inoculatie met typische varkens influenzavirussen (Qiu et al., 2015; Van Reeth et al., 2017). Met dergelijke virussen worden er 3 dagen na de inoculatie ook hoge virustiters gevonden in de trachea en longen (zie ook Figuur 9). In een andere studie waarbij varkens intranasaal werden geïnoculeerd met H3N2 virussen, kwam de virusexcretie van het humane virus sw/Ontario/00130/1997 met enkele dagen vertraging op gang in vergelijking met deze van het varkens geadapteerd virus sw/Minnesota/593/1999 (Landolt et al., 2003). In deze studie werden de weefsels van het ademhalingsstelsel niet onderzocht. Verdere studies zullen moeten uitwijzen of NC95 werkelijk een verminderd tropisme heeft voor de diepere luchtwegen of dat de vermeerdering in de trachea en longen op latere tijdstippen wel optreedt.

Het proefopzet van het hoofdexperiment uit deze masterproef vertoont ook enkele beperkingen. Zo is de immuunrespons 6 weken na 1 enkele infectie van varkens met NC95 niet helemaal vergelijkbaar met de immuniteit in de menselijke populatie. Deze laatste is het resultaat van meerdere infecties met opeenvolgende driftvarianten van H3N2 influenzavirussen, die plaatsvinden met tussenperiodes van enkele jaren. Het aantal en soort virussen waaraan men werd blootgesteld is afhankelijk van de leeftijd en zal ook individueel verschillen bij mensen van dezelfde leeftijd. Een tweede beperking is het ontbreken van vaccinatie controle groepen, zonder voorafgaande infectie met NC95. Hiervoor zouden te veel dieren vereist zijn. Resultaten van dergelijke groepen zijn echter wel beschikbaar uit een vorig experiment en worden getoond in de bijlagen (Tabel 13).

Na inoculatie met NC95 waren er serum HI-antistoffen aantoonbaar tegenover het virus gebruikt voor inoculatie, en lagere, kruis reagerende antistoftiters tegen de hiervan afgeleide cluster I Noord-Amerikaanse H3N2 varkens influenzavirussen. Er waren geen detecteerbare antistoffen tegenover andere humane of varkens H3N2 virussen. Ondanks de afwezigheid van HI-antistoffen tegenover het challenge virus MO15, was er toch een gedeeltelijke bescherming tegenover dit virus. Deze resultaten zijn in overeenstemming met andere influenza infectie studies bij het varken (Vincent et al., 2010; Qiu et al., 2013; Qiu et al., 2015). Zo vertoonden

varkens die vooraf waren geïnoculeerd met het Europese sw/Gent/172/2008 (G08) ook een gedeeltelijke bescherming tegenover challenge met het Noord-Amerikaanse H3N2 virus A/Indiana/08/2011, hoewel ze geen noemenswaardige serumantistoffen tegenover dit laatste virus hadden (Qiu et al., 2015). Het is gekend dat een influenza infectie, in tegenstelling tot vaccinatie met geïnactiveerd vaccin, ook zorgt voor inductie van cellulaire immuniteit en van lokale secretorische IgA antistoffen in de luchtwegen. Beide componenten van de immuunrespons zijn meer breed reagerend in vergelijking met HI- en VN-antistoffen in het serum, en ze zijn allicht gedeeltelijk verantwoordelijk voor de bredere bescherming na infectie. Dit verklaart waarom de bescherming na infectie niet noodzakelijk gecorreleerd is met de serum HI-/VN-antistoftiters, terwijl dit wel het geval is na vaccinatie met een geïnactiveerd vaccin.

Vier groepen dieren werden tweemaal gevaccineerd met G08 en/of sw/Pennsylvania/A01076777/2010 (PA10), volgens een homoloog of heteroloog prime-boost regime. Alle vier groepen waren 6 weken voorafgaand aan de eerste vaccinatie experimenteel geïnfecteerd met NC95. Na de tweede vaccinatie vertoonden ze een bredere HI-antistofrespons in vergelijking met: (1) dieren die enkel werden geïnfecteerd met NC95 en (2) dieren die werden gevaccineerd zonder voorafgaande infectie (zie resultaten van vorige studie in bijlagen, Tabel 13). Ook de bescherming tegenover challenge met MO15 was hoger in de vier infectie-immune, gevaccineerde groepen dan in de NC95 infectie-immune controle groep. De gevaccineerde dieren uit de vorige studie werden niet onderworpen aan challenge met MO15. Toch is het onwaarschijnlijk dat ze tegen dit virus beschermd zouden zijn, omdat ze hiertegen geen aantoonbare serum HI-antistoffen hadden. Alle vier infectie-immune, gevaccineerde groepen hadden echter geen of slechts lage serum HI-antistoftiters tegenover een aantal humane H3N2 virussen uit de periode 2005-2014. Om dezelfde redenen als vermeld voor de NC95 infectie-immune groep kunnen we echter een gedeeltelijke bescherming tegenover challenge met deze virussen niet uitsluiten. Het is zelfs mogelijk dat deze bescherming hoger zou zijn bij de infectie-immune gevaccineerde groepen dan bij de

groep die enkel werd geïnfecteerd met NC95. De lage HI-antistoftiters tegenover het A/Hong Kong/4801/2014 virus in de groep infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10 versterken dit vermoeden. De resultaten van een studie met H1N1 influenzavirussen in het muismodel wijzen eveneens in deze richting (Kim et al., 2016). In deze studie werden de muizen eerst geïnfecteerd met het oudere H1N1 virus A/Puerto Rico/8/1934, 4 weken later werden ze gevaccineerd met geïnactiveerd vaccin op basis van het antigenisch verschillende H1N1 virus A/Fort Monmouth/1/1947; controle groepen kregen enkel de infectie, enkel één vaccinatie, of Puerto Rico/8/1934 vaccinatie gevolgd door Fort Monmouth/1/1947 vaccinatie. Infectie gevolgd door vaccinatie gaf niet alleen de hoogste serum antistoftiters, maar ook een hogere lokale antistof- en T-cel respons. Een moeilijkheid voor het beoordelen van de bescherming bij – al dan niet deels – infectie-immune dieren is echter het ontbreken van zogenaamde “correlates of protection”, of geschikte immunologische testen en parameters om de complexe, niet volledig door serum HI/VN-antistoffen gemedieerde bescherming te meten. Arbeidsintensieve challenge studies zijn dus voorlopig het enige middel.

Er zijn nog relatief weinig studies over het effect van twee of meer opeenvolgende influenza infecties en/of -vaccinaties op de antistofrespons. Klinische studies bij de mens zijn moeilijk, omdat men gedurende vele jaren eenzelfde groep mensen serologisch moet kunnen opvolgen. Bovendien kan men de infectie geschiedenis van deze mensen nooit exact kennen. Een fenomeen dat echter frequent wordt beschreven is de zogenaamde “original antigenic sin”, “back boosting”, of “antigenic seniority” (Davenport et al., 1953; Miller et al., 2013; Fonville et al., 2014). Dit betekent dat de antistofrespons tegenover deze influenzavirus variant waarmee men het eerst in contact kwam, wordt versterkt bij elke volgende infectie met een andere variant binnen hetzelfde subtype, zodat men de hoogste antistoftiters behoudt tegenover het eerste virus. In onze studie kan de booster van de anti-NC95 antistoftiters na de vaccinaties ook worden beschouwd als een vorm van “original antigenic sin”. De productie van antistoffen tegen G08 en PA10 werd echter niet geremd door de voorafgaande infectie met NC95. Dit is dan weer in strijd met de meest strikte definitie van original antigenic sin, maar wel in

overeenstemming met andere recente studies (Miller et al., 2013; Fonville et al., 2014). Verder wijzen onze serologische en challenge resultaten ook op kwalitatieve verschillen in de antistofrespons tussen de verschillende gevaccineerde groepen. Het voordeel van de heterologe prime-boost vaccinatie is dat men tegenover beide vaccinstammen gelijkaardige antistoftiters kan bekomen, terwijl na homologe prime-boost vaccinatie de titers tegenover het heterologe virus (G08 of PA10) veel lager bleven. De verschillende serologische profielen in de verschillende groepen hebben waarschijnlijk te maken met verschillen in de genetische en antigene verwantschap tussen de immunisatie stammen. Het is nog niet bekend wat de optimale genetische en antigene “afstand” is om een brede antistofrespons te bekomen, of hoeveel en welke aminozuren in het HA1 gemeenschappelijk moeten zijn. Tabel 11 in de bijlagen geeft een overzicht van alle H3N2 influenzavirussen gebruikt in de HI-testen en hun genetische verwantschap in het HA1 gedeelte van het hemagglutinine.

Ten slotte kunnen we uit onze studie ook lessen trekken over het gebruik van levend verzwakte influenzavirus vaccins in heterologe prime-boost vaccinatie regimes. Dergelijke vaccins worden intranasaal toegediend en de immuunrespons is even veelzijdig, maar meestal zwakker, dan na een infectie met virulent virus. Met andere RNA virussen zoals HIV en Ebola werden veelbelovende resultaten bekomen door eerst te vaccineren met een vermeerderend vaccin, en daarna met een geïnactiveerd of eiwit vaccin op basis van een verschillend viraal antigeen (Sullivan et al., 2000; Lu, 2009). In deze gevallen maakt men dus voor de opeenvolgende vaccinaties niet alleen gebruik van verschillende antigenen, maar ook van verschillende soorten vaccins. In de huidige studie gaf infectie met NC95 gevolgd door één toediening van geïnactiveerd G08 of PA10 hogere antistoftiters tegenover beide virussen in vergelijking met homologe of heterologe prime-boost met G08 of PA10 zonder voorafgaande infectie (Van Reeth et al., 2017). De sera verzameld na de eerste vaccinatie zullen nu nog verder worden onderzocht voor hun reactie met andere H3N2 influenzavirussen in de HI-test. Samengevat konden we een bredere serologische respons en bescherming aantonen wanneer dieren, voorafgaand aan een (homologe of heterologe) prime-boost vaccinatie

werden geïnfecteerd met NC95. Dit wil zeggen dat heterologe prime-boost vaccinatie met geïnactiveerde, antigenisch verschillende influenzavirussen nog beter werkzaam zal zijn bij individuen die reeds een basisimmunitet hebben. We veronderstellen ook dat andere humane H3N2 influenzavirussen dan NC95 het resultaat van de vaccinatie op een gelijkaardige, positieve manier kunnen beïnvloeden.

10 Referentielijst

- Allerson, M., Deen, J., Detmer, S.E., Gramer, M. R., Joo, H.S., Romagosa, A., Torremorell, M., 2013. The impact of maternally derived immunity on influenza A virus transmission in neonatal pig populations. *Vaccine* 31, 500–505.
- Assarsson, E., Bui, H.H., Sidney, J., Zhang, Q., Glenn, J., Oseroff, C., Mbawuike, I.N., Alexander, J., Newman, M.J., Grey, H., et al., 2008. Immunomic analysis of the repertoire of T-cell specificities for influenza A virus in humans. *Journal of Virology* 82, 12241-12251.
- Baumgarth, N., Herman, O.C., Jager, G.C., Brown, L.E., Herzenbergh, L.A., Chen, J., 2000. B-1 and B-2 cell-derived immunoglobulin M antibodies are nonredundant components of the protective response to influenza virus infection. *Journal of Experimental Medicine* 192, 271-280.
- Belgisch centrum voor farmacotherapeutische informatie. Influenza 2017-2018. <http://www.bcfi.be/nl/articles/2764?folia=2762&matches=influenzavaccins%7Cinfluenzavaccin%7Cvaccins%7Cinfluenzaseizoen> laatst geconsulteerd op 29 april 2018.
- Beaudoin, A., Johnson, S., Davies, P., Bender, J., Gramer, M., 2012. Characterization of influenza A outbreaks in Minnesota swine herds and measures taken to reduce the risk of zoonotic transmission. *Zoonoses Public Health* 59, 96–106.
- Bi, Y., Fu, G., Chen, J., Peng, J., Sun, Y., Wang, J., Pu, J., Zhang, Y., Gao, H., Ma, G., 2010. Novel swine influenza virus reassortants in pigs, China. *Emerging Infectious Diseases* 16, 1162-1164.
- Bouvier, N.M., Palese, P., 2008. The biology of influenza viruses. *Vaccine* 26(4), D49-D53.
- Bouvier, N.M., Lowen, A.C., 2010. Animal models for influenza virus pathogenesis and transmission. *Viruses* 2, 1530-1563.
- Bresee, J.S., Fry, A.M., Sambhara, S., Cox, N.J., 2013. Inactivated influenza vaccines. In: *Vaccines*, Zevende Edn. Saunders Elsevier, Philadelphia, VSA, pp. 456-489.
- Bublot, M., Karaca, K., Minke, J., Pritchard, N., Le Gros, F.X., Poulet, H., Audonnet, J.C., Swayne, D., Nordgren, R., 2008. Current influenza vaccines for poultry and other animal species. *Research Signpost*, 117-136.
- Campitelli, L., Donatelli, I., Foni, E., Castrucci, M.R., Fabiani, C., Kawaoka, Y., Krauss, S., Webster, R.G., 1997. Continued evolution of H1N1 and H3N2 influenza viruses in pigs in Italy. *Virology* 232, 310-318.
- Cappuccino, J.A., Pena, L., Dibarbora, M., Rimondi, A., Pineyro, P., Insaralde, L., Quiroga, M.A., Machuca, M., Craig, M.I., Olivera, V. et al., 2011. Outbreak of swine influenza in Argentina reveals a non-contemporary human H3N2 virus highly transmissible among pigs. *Journal of General Virology* 92, 2871-2878.
- Castrucci, M.R., Donatelli, I., Sidoli, L., Barigazzi, G., Kawaoka, Y., Webster, R.G., 1993. Genetic reassortment between avian and human influenza A viruses in Italian pigs. *Virology* 193, 503-506.
- Caton, A.J., Brownlee, G.G., Yewdell, J.W., Gerhard, W., 1982. The antigenic structure of the influenza virus A/PR/8/34 hemagglutinin (H1 subtype). *Cell* 31, 417-427.

- Centers for Disease Control and Prevention. People at high risk of developing flu-related complications. https://www.cdc.gov/flu/about/disease/high_risk.htm laatst geconsulteerd op 1 november 2017a.
- Centers for Disease Control and Prevention. Antigenic Characterization. <https://www.cdc.gov/flu/professionals/laboratory/antigenic.htm> laatst geconsulteerd op 26 november 2017b.
- Centers for Disease Control and Prevention. Case Count: Detected U.S. Human Infections with H3N2v by State since August 2011. <https://www.cdc.gov/flu/swineflu/h3n2v-case-count.htm> laatst geconsulteerd op 28 april 2018a.
- Centers for Disease Control and Prevention. Influenza ACIP Vaccine Recommendations 2017-2018. <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/66/rr/pdfs/rr6602.pdf> laatst geconsulteerd op 14 mei 2018b.
- Chiu, C., Wrammert, J., Li, G.M., McCausland, M., Wilson, P.C., Ahmed, R., 2013. Cross-reactive humoral responses to influenza and their implications for a universal vaccine. *Translational Immunology in Asia-Oceania* 1283, 13-21.
- Clementi, N., Criscuolo, E., Castelli, M., Mancini, N., Clementi, M., Burioni, R., 2012. Influenza B-cells protective epitope characterization: a passkey for the rational design of new broad-range anti-influenza vaccines. *Viruses* 4, 3090-3108.
- Collin, E.A., Sheng, Z.Z., Lang, Y.K., Ma, W.J., Hause, B., Li, F., 2015. Cocirculation of two distinct genetic and antigenic lineages of proposed influenza D virus in cattle. *Journal of Virology* 89(2), 1036-1042.
- Corti, D., Voss, J., Gamblin, S.J., Codoni, G., Macagno, A., Jarrossay, D., Vachieri, S.G., Pinna, D., Minola, A., Vanzetta, F., Silacci, C., et al., 2011. A neutralizing antibody selected from plasma cells that binds to group 1 and group 2 influenza A hemagglutinins. *Science* 333, 850-856.
- Crotty, S., Ahmed, S., 2004. Immunological memory in humans. *Seminars in Immunology* 16(3), 197-203.
- Davenport, F.M., Hennessy, A.V., Francis, T.J., 1953. Epidemiologic and immunologic significance of age distribution of antibody to antigenic variants of influenza virus. *The Journal of Experimental Medicine* 98, 641-656.
- de Jong, J.C., Smith, D.J., Lapedes, A.S., Donatelli, I., Campitelli, L., Barigazzi, G., Van Reeth, K., Jones, T.C., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D., Fouchier, R.A., 2007. Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe. *Journal of Virology* 81, 4315-4322.
- De Vleeschauwer, A., Atanasova, K., Van Borm, S., van den Bergh, T., Rasmussen, T.B., Uttenthal, A., Van Reeth, K., 2009. Comparative pathogenesis of an avian H5N2 and a swine H1N1 influenza virus in pigs. *PLoS ONE* 4, e6662.
- De Vleeschauwer, A., Van Poucke, S.G., Karasin, A.I., Olsen, C.W., Van Reeth, K., 2011. Cross-protection between antigenically distinct H1N1 swine influenza viruses from Europe and North America. *Influenza and other respiratory viruses* 5(2), 115-122.
- De Vleeschauwer, A., Qiu, Y., Van Reeth, K., 2015. Vaccination-challenge studies with a Port Chalmers/73 (H3N2)-based swine influenza virus vaccine: Reflections on vaccine strain updates and on the vaccine potency test. *Vaccine* 33, 2360-2366.
- Dormitzer, P.R., Galli, G., Castellino, F., Golding, H., Khurana, S., Del Giudice, G., Rappuoli, R., 2011 Influenza vaccine immunology. *Immunological Reviews* 239, 167–177.
- Ekiert, D.C., Friesen, R.H., Bhabha, G., Kwaks, T., Jongeneelen, M., Yu, W., Ophorst, C., Cox, F., Korse, H.J., Brandenburg, B., et al., 2011. A highly conserved neutralizing epitope on group 2 influenza A viruses. *Science* 333, 843–850.
- Ekiert, D.C., Wilson, I.A., 2012. Broadly neutralizing antibodies against influenza virus and prospects for universal therapies. *Current Opinions Virology* 2(2),134-141.

- Fonville, J. M., Wilks, S.H., James, S.L., Fox, A., Ventresca, M., Aban, M., Xue, L., Jones, T.C., Le N.M.H., Pham, Q.T., 2014. Antibody landscapes after influenza virus infection or vaccination. *Science* 346, 996–1000.
- Glück, T., 2014. Most Influenza Infections Are Subclinical. *Journal Watch*.
- Graham, B.S., Crowe, J.E.J., 2007. Immunization against viral diseases. In: *Field's virology vol1*, Vijfde Edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, VSA, pp. 487–538.
- Hayden, F.G., Palese, P.A., 2009. Influenza virus. In: *Clinical Virology*, Derde Edn. ASM Press, Washinton, DC, VSA, pp. 911-942.
- Hayden, F.G., Gwaltney, J.M.J. 2015. Viral infections. In: *Textbook of Respiratory Medicine*, Vijfde Edn. Saunders Elsevier, Philadelphia, VSA, pp. 977–1035.
- Heinen, P.P., van Nieuwstadt, A.P., Pol, J.M.A., de Boer-Luijtz, E.A., Van Oirschot, J.T., Bianchi, A.T., 2000. Systemic and mucosal isotype-specific antibody responses in pigs to experimental influenza virus infection. *Viral Immunology* 13(2), 237-247.
- Heinen, P.P., van Nieuwstadt, A.P., de Boer-Luijtz, E.A., Bianchi, A.T., 2001. Analysis of the quality of protection induced by a porcine influenza A vaccine to challenge with an H3N2 virus. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 82, 39-56.
- Hirst, G.K., 1941. The agglutination of red cells by allantoic fluid of chick embryos infected with influenza virus. *Science* 94, 22-23.
- Hoschler, K., Thompson, C., Casas, I., Ellis, J., Galiano, M., Andrews, N., Zambon, M., 2013. Population susceptibility to North American and Eurasian swine influenza viruses in England, at three time points between 2004 and 2011. *Eurosurveillance* 18, 20578.
- Houser, K.V., Pearce, M.B., Katz, J.M., Tumpey, T.M., 2013. Impact of prior seasonal H3N2 influenza vaccination or infection on protection and transmission of emerging variants of influenza A (H3N2)v virus in ferrets. *Journal of Virology* 87,13480–13489.
- Kilbourne, E.D., Laver, W.G., Schulman, J.L., Webster, R.G., 1968. Antiviral Activity of Antiserum Specific for an Influenza Virus Neuraminidase. *Journal of Virology* 2(4), 281-288.
- Kim, J.H., Liepkalns, J., Reber, A.J., Lu, X., Music, N., Jacob, J., Sambhara, S., 2016. Prior infection with influenza virus but not vaccination leaves a long-term immunological imprint that intensifies the protective efficacy of antigenically drifted vaccine strains. *Vaccine* 34(4), 495-502.
- Kitikoon, P., Nelson, M.I., Kilian, M.L., Anderson, T.K., Koster, L., Culhane, M.R., Vincent, A.L., 2013. Genotype patterns of contemporary reassorted H3N2 virus in US swine. *Journal of General Virology* 94, 1236-1241.
- Kyriakis, C.S., Gramer, M.R., Barbé, F., Van Doorselaere, J., Van Reeth, K., 2010. Efficacy of commercial swine influenza vaccines against challenge with a recent European H1N1 field isolate. *Veterinary Microbiology* 144, 67–74.
- Lamb, J.R., Woody, J.N., Hartzman, R.J., Eckels, D.D., 1982. In vitro influenza virus-specific antibody production in man: Antigen-specific and HLA-restricted induction of helper activity mediated by cloned human T lymphocytes. *Journal of Immunology* 129, 1465-1470.
- Lamb, R. A., Zebedee, S. L., Richardson, C. D., 1985. Influenza virus M2 protein is an integral membrane protein expressed on the infected cell surface. *Cell* 40, 627-633.
- Lamb, R. A., Holsinger, L. J., Pinto, L. H., 1994. The influenza A virus M2 ion channel protein and its role in the influenza virus life cycle. In: *Receptor-Mediated Virus Entry into Cells*, Eerste Edn. Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp. 303-321.
- Landolt, G.A., Karasin, A.I., Phillips, L., Olsen, C.W., 2003. Comparison of the Pathogenesis of Two Genetically Different H3N2 Influenza A Viruses in Pigs. *Journal of Clinical Microbiology*, 1936-1941.
- Larsen, D.L., Karasin, A., Zuckermann, F., Olsen, C.W., 2000. Systemic and mucosal immune responses to H1N1 influenza virus infection in pigs. *Veterinary Microbiology* 74, 117–131.

- Larsen, D.L., Karasin, A., Olsen, C.W., 2001. Immunization of pigs against influenza virus infection by DNA vaccine priming followed by killed-virus vaccine boosting. *Vaccine* 19, 2842–2853.
- Laver, W.G., Valentine, R.C., 1969. Morphology of the isolated hemagglutinin and neuraminidase subunits of influenza virus. *Virology* 38, 105-119.
- Lewis, N.S., Anderson, T.K., Kitikoon, P., Skepner, E., Burke, D.F., Vincent, A.L., 2014. Substitutions near the hemagglutinin receptor-binding site determine the antigenic evolution of influenza A H3N2 viruses in U.S. swine. *Journal of Virology* 88, 4752–4763.
- Li, G.M., Chiu, C., Wrammert, J., McCausland, M., Andrews, S.F., Zheng, N.Y., Lee, J.H., Huang, M., Qu, X.Y., Edupuganti, S., et al., 2012. Pandemic H1N1 influenza vaccine induces a recall response in humans that favors broadly cross-reactive memory B cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(23), 9047-9052.
- Loving, C.L., Lager, K.M., Vincent, A.L., Brockmeier, S.L., Gauger, P.C., Anderson, T.K., Kitikoon, P., Perez, D.R., Kehrli, M.E., 2013. Efficacy in pigs of inactivated and live attenuated influenza virus vaccines against infection and transmission of an emerging H3N2 similar to the 2011-2012 H3N2v. *Journal of Virology* 87, 989-903.
- Lu, S., 2009. Heterologous Prime-Boost Vaccination. *Current Opinion in Immunology* 21(3), 346-351.
- Markowska-Daniel, I., Pomorska-Mol, M., Pejsak, Z., 2011. The influence of age and maternal antibodies on the postvaccinal response against swine influenza viruses in pigs. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 142, 81– 86.
- Meurens, F., Summerfield, A., Nauwynck, H., Saif, L., Gerdts, V., 2012. The pig: a model for human infectious diseases. *Trends in Microbiology* 20, 50-57.
- Miller, M. S., Gardner, T.J., Krammer, F., Aguado, L.C., Tortorella, D., Basler, C.F., Palese, P., 2013. Neutralizing antibodies against previously encountered influenza virus strains increase over time: a longitudinal analysis. *Science Translational Medicine* 5, 198ra107.
- Myers, K.P., Olsen, C.W., Gray, G.C., 2007. Cases of swine influenza in humans: A review of the literature. *Clinical Infectious Diseases* 44(8), 1084-1088.
- Nakanishi, Y., Lu, B., Gerard, C., Iwasaki, A., 2009. CD8(+) T lymphocyte mobilization to virus-infected tissue requires CD4(+) T-cell help. *Nature* 462, 510-513.
- Nicholson, K.G., Wood, J.M., Zambon, M., 2003. Influenza. *Lancet* 362, 1733-1745.
- Ohmit, S.E., Petrie, J.G., Cross, R.T., Johnson, E., Monto, A.S., 2011. Influenza Hemagglutination-Inhibition Antibody Titer as a Correlate of Vaccine-Induced Protection. *The Journal of Infectious Diseases* 204(12), 1879–1885.
- Ottis, K., Sidoli, L., Bachmann, P.A., Webster, R.G., Kaplan, M.M., 1982. Human influenza A viruses in pigs: isolation of a H3N2 strain antigenically related to A/England/42/72 and evidence for continuous circulation of human viruses in the pig population. *Archives of Virology* 73, 103-108.
- Qiu, Y., van der Meulen, K., Van Reeth, K., 2013. Prior infection of pigs with a recent human H3N2 influenza virus confers minimal cross-protection against a European swine H3N2 virus. *Influenza and Other Respiratory Viruses* 7, 1260-1268.
- Qiu, Y., 2015. Cross-protection studies with swine influenza viruses in pigs and public health aspects. Doctoral thesis, Faculteit Diergeneeskunde, Universiteit Gent, België.
- Rajao, D.S., Gauger, P.C., Anderson, T.K., Lewis, N.S., Abente, E.J., Killian, M.L., Perez, D.R., Sutton, T.C., Zhang, J., Vincent, A.L., 2015. Novel Reassortant Human-Like H3N2 and H3N1 Influenza A Viruses Detected in Pigs Are Virulent and Antigenically Distinct from Swine Viruses Endemic to the United States. *Journal of Virology* 89, 1213-1220.
- Russel, C.A., Jones, T.C., Barr, I.G., Cox, N.J., Garten, R.J., Gregory, V., Gust, I.D., Hampson, A.W., Hay, A.J., Hurt, A.C., et al., 2008. Influenza vaccine strain selection and recent studies on the global migration of seasonal influenza viruses. *Vaccine* 26, D31-D34.

- Salk, J.E., 1944. A simplified procedure for titrating hemagglutinating capacity of influenza virus and the corresponding antibody. *Journal of Immunology* 49, 87–98.
- Sanders, B., Koldijk, M., Schuitemaker, H., 2015. Inactivated Viral Vaccines. *Vaccine Analysis: Strategies, Principles and Control* 10, 45-80.
- Shope, R.E., 1931. Swine Influenza. Filtration experiments and etiology. *The Journal of Experimental Medicine* 54(3), 373-385.
- Shu, B., Garten, R., Emery, S., Balish, A., Cooper, L., Sessions, W., Deyde, V., Smith, C., Berman, L., Klimov, A., et al., 2012. Genetic analysis and antigenic characterization of swine origin influenza viruses isolated from humans in the United States, 1990-2010. *Virology* 422, 151-160.
- Smith, D.J., Lapedes, A.S., de Jong, J.C., Bestebroer, T.M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2004. Mapping the Antigenic and Genetic Evolution of Influenza Virus. *Science* 305, 371-376.
- Song, D., Kang, B., Lee, C., Jung, K., Ha, G., Kang, D., Park, S., Park, B., Oh, J., 2008. Transmission of avian influenza virus (H3N2) to dogs. *Emerging Infectious Diseases* 14, 741-746.
- Strutt, T.M., McKinstry, K.K., Dibble, J.P., Winchell, C., Kuang, Y., Curtis, J.D., Huston, G., Dutton, R.W., Swain, S.L., 2010. Memory CD4(+) T cells induce innate responses independently of pathogen. *Nature Medicine* 16(5), 558-U91.
- Suarez, D.L., 2008. Influenza A virus. In: *Avian Influenza*, Eerste Edn. Blackwell Publishing, Oxford, UK, pp. 3-23.
- Sullivan, N.J., Sanchez, A., Rollin, P.E., Yang, Z., Nabel, G.J., 2000. Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature* 408, 605-609.
- Summerfield, A., 2009. Special issue on porcine immunology: an introduction from the guest editor. *Developmental and Comparative Immunology* 33, 265-266.
- Tellier, R., 2006. Review of Aerosol Transmission of Influenza A Virus. *Emerging Infectious Diseases* 12(11), 1657-1662.
- Tumova, B., Veznikova, D., Mensik, J., Stumpa, A., 1980. Surveillance of influenza in pig herds in Czechoslovakia in 1974-1979. Introduction of influenza epidemic A (H3N2) viruses into pig herds. *Zentralblatt für Veterinär Medizin B* 27, 517-523.
- van den Berg, T., Lambrecht, L., Marché, S., Steensels, M., Van Borm, S., Bublot, M., 2008. Influenza vaccines and vaccination strategies in birds. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 31, 121-165.
- Van Reeth, K., Nauwynck, H.J., Pensaert, M.B., 1998. Bronchoalveolar interferon- α , tumor necrosis factor- α , interleukin-1 and inflammation during acute influenza in pigs: a possible model for humans? *Journal of Infectious Diseases* 177, 1076–1079.
- Van Reeth, K., De Clerq, S., Pensaert, M., 2001. The significance of antigenic evolution for swine influenza vaccine efficacy: learning from vaccination-challenge studies in pigs. In: *Emergence and control of zoonotic orthopox and paramyxovirus diseases*, Eerste Edn. John Libbey Eurotext, Parijs, Frankrijk, pp. 99-106.
- Van Reeth, K., Labarque, G., Pensaert, M., 2006. Serological Profiles after Consecutive Experimental Infections of Pigs with European H1N1, H3N2, and H1N2 Swine Influenza Viruses. *Viral immunology* 19, 373-382.
- Van Reeth, K., 2007. Avian and swine influenza viruses: our current understanding of the zoonotic risk. *Veterinary Research* 38(2), 243-260.
- Van Reeth, K., Brown, I.H., Olsen, C.W., 2012. Swine Influenza. In: *Diseases of swine*, Tiende Edn. Wiley-Blackwell Publishing Company, Hoboken, België, pp. 557-572.
- Van Reeth, K., Ma, W., 2013. Swine Influenza Virus Vaccines: To Change or Not to Change- That's the Question. *Current Topics in microbiology and immunology* 370, 173-200.
- Van Reeth, K., 2014. In: *Algemene virologie*, Gent, België, pp. 18.

- Van Reeth, K., Gracia, J.C.M., Trus, I., Sys, L., Claes, G., Versnaeyen, H., Cox, E., Krammer, F., Qiu, Y., 2017. Heterologous prime-boost vaccination with H3N2 influenza viruses of swine favors cross-clade antibody responses and protection. *Nature Partner Journal: Vaccines* 2(11), 10.1038/s41541-017-0012-x.
- Vincent, A.L., Ma, W., Lager, K.M., Janke, B.H., Richt, J.A., 2008. Swine influenza viruses: a North American perspective. *Advances in Virus Research* 72, 127–154.
- Vincent, A.L., Ciacchi-Zanella, J.R., Lorusso, A., Gauger, P.C., Zanella, E.L., Kehrli Jr., M.E., Janke, B.H., Lager, K.M., 2010. Efficacy of inactivated swine influenza virus vaccines against the 2009 A/H1N1 influenza virus in pigs. *Vaccine* 28, 2782-2787.
- Wang, T.T., Tan, G.S., Hai, R., Pica, N., Petersen, E., Moran, T.M., Palese, P., 2010. Broadly protective monoclonal antibodies against H3 influenza viruses following sequential immunization with different hemagglutinins. *PLoS Pathogen*, 6:e1000796.
- Webby, R.J., Swenson, S.L., Krauss, S.L., Gerrish, P.J., Goyal, S.M., Webster, R.G., 2000. Evolution of swine H3N2 influenza viruses in the United States. *Journal of Virology* 74, 8243-8251.
- Westgeest, K.B., Russel, C.A., Xudong, L., Spronken, M.I.J., Besteboer, T.M., Bahl, J., van Beek, R., Skepner, E., Halpin, R.A., de Jong, J.C., et al., 2014. Genomewide Analysis of Reassortment and Evolution of Human Influenza A (H3N2) Viruses Circulating between 1968 and 2011. *Journal of Virology* 88, 2844-2857.
- Wilkinson, K., Wei, Y., Szwajcer, A., Rabbani, R., Zarychanski, R., Abou-Setta, A.M., Mahmud, S.M., 2017. Review: Efficacy and safety of high-dose influenza vaccine in elderly adults: A systematic review and meta-analysis; *Vaccine* 35, 2775-2780.
- Wilson, I.A., Cox, N.J., 1990. Structural basis of immune recognition of influenza virus hemagglutinin. *Annual Review of Immunology* 8, 737–771.
- Wood, J.M., Williams, M.S., 1998. History of inactivated influenza vaccines. In: *Textbook of Influenza*, Tweede Edn. Blackwell Science, Oxford, VK, pp. 324-345.
- Woodland, D.L., Hogan, R.J., Zhong, W.M., 2001. Cellular immunity and memory to respiratory virus infections. *Immunologic Research* 24, 53-67.
- World Health Organization Influenza, 1980. A revision of the system of nomenclature for influenza viruses: a WHO Memorandum. *Bulletin of World Health Organization* 58(4), 585-591.
- World Health Organization Influenza. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs211/en/> laatst geconsulteerd op 1 november 2017a.
- World Health Organization Influenza. Influenza vaccines: <http://www.who.int/influenza/vaccines/use/en/> laatst geconsulteerd op 3 december 2017b.
- World Health Organisation Influenza. Vaccine recommendations: <http://www.who.int/influenza/vaccines/virus/recommendations/en/> laatst geconsulteerd op 28 april 2018.
- Wright, P.F., Neumann, G., Kawaoka, Y., 2007. Orthomyxoviruses. In: *Fields Virology*, Vijfde Edn. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia, VSA, hoofdstuk 47.
- Wu, Y., Wu, Y., Tefsen, B., Shi, Y., Gao, G.F., 2014. Bat-derived influenza-like viruses H17N10 and H18N11. *Trends in Microbiology* 22(4), 183-191.
- Zhu, J., Paul, W.E., 2010. Heterogeneity and plasticity of T helper cells. *Cell Research* 20, 4-12.

11 Bijlagen

Tabel 9. Virustiters in neusswabs van de individuele dieren na inoculatie met A/Nanchang/933/1995 (NC95).

Immunisatie groep	Nummer Varken	Virustiters in neusswabs op... dagen post inoculatie					
		0	2	4	6	8	10
Infectie NC95	V-17-2785	<1.7	4.3	3.5	4.5	1.7	<1.7
	V-17-2786	<1.7	<1.7	5.0	5.5	<1.7	<1.7
	V-17-2787	<1.7	5.7	4.8	4.2	1.7	<1.7
	V-17-2788	<1.7	4.5	6.0	3.8	<1.7	<1.7
	V-17-2791	<1.7	5.6	6.2	5.5	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	4.2	5.1	4.7	1.2	0.9
Infectie NC95- vaccinatie G08-G08	V-17-2774	<1.7	4.8	5.5	5.7	<1.7	<1.7
	V-17-2775	<1.7	3.8	5.5	4.3	2.0	<1.7
	V-17-2776	<1.7	4.2	7.0	5.5	<1.7	<1.7
	V-17-2777	<1.7	4.5	5.7	5.5	<1.7	<1.7
	V-17-2778	<1.7	3.5	4.7	4.2	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	4.2	5.7	5.0	1.1	0.9
Infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10	V-17-2779	<1.7	3.8	5.7	3.6	<1.7	<1.7
	V-17-2780	<1.7	4.5	6.2	2.2	<1.7	<1.7
	V-17-2781	<1.7	5.3	6.6	5.3	<1.7	<1.7
	V-17-2782	<1.7	5.3	4.8	4.7	<1.7	<1.7
	V-17-2783	<1.7	3.8	2.8	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	4.5	5.2	3.3	0.9	0.9
Infectie NC95- vaccinatie G08-PA10	V-17-2760	<1.7	1.7	5.5	3.3	<1.7	<1.7
	V-17-2761	<1.7	5.5	5.3	3.7	<1.7	<1.7
	V-17-2762	<1.7	4.0	5.7	4.7	2.7	<1.7
	V-17-2763	<1.7	<1.7	<1.7	1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2764	<1.7	2.0	3.7	3.0	2.0	<1.7
	Gemiddelde	0.9	2.8	4.2	3.3	1.5	0.9
Infectie NC95- vaccinatie PA10-G08	V-17-2769	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
	V-17-2770	<1.7	4.5	6.5	3.0	<1.7	<1.7
	V-17-2771	<1.7	2.6	6.5	5.5	<1.7	<1.7
	V-17-2772	<1.7	5.5	5.7	3.7	3.2	<1.7
	V-17-2773	<1.7	4.5	5.7	4.7	4.2	<1.7
	Gemiddelde	0.9	4.3	6.1	4.2	2.3	0.9

n.a.= niet afleesbaar

Tabel 10. Evolutie van hemagglutinatie inhibitie (HI)-antistoftiters tegenover de drie virussen gebruikt voor immunisatie in de verschillende groepen.

		HI-titer over																				
Dagen post inoculatie NC95...		0 (week 0)			28 (week 4)			46 of 48 (week 7) 0			64 (week 9) 13 of 15			77 of 79 (week 11) 28 0			92 (week 13) 41 of 43 13 of 15			106 (week 15) 55 of 57 27 of 29		
Dagen post 1 ^e vaccinatie...																						
Dagen post 2 ^e vaccinatie...																						
Immunisatie groep	Nummer Varken	NC95	G08	PA10	NC95	G08	PA10	NC95	G08	PA10	NC95	G08	PA10	NC95	G08	PA10	NC95	G08	PA10	NC95	G08	PA10
Challenge controle groep	V-17-2751	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2752	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2753	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2754	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2755	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Gemiddelde	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Infectie NC95	V-17-2785	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	20	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2786	<10	<10	<10	160	<10	<10	20	<10	<10	160	<10	<10	80	<10	<10	160	<10	<10	320	<10	<10
	V-17-2787	<10	<10	<10	160	<10	<10	10	<10	<10	80	<10	<10	20	<10	<10	40	<10	<10	20	<10	<10
	V-17-2788	<10	<10	<10	80	<10	<10	10	<10	<10	40	<10	<10	10	<10	<10	40	<10	<10	80	<10	<10
	V-17-2791	<10	<10	<10	640	<10	<10	40	<10	<10	160	<10	<10	20	<10	<10	160	<10	<10	160	<10	<10
	Gemiddelde	5	5	5	160	5	5	13	5	5	80	5	5	23	5	5	69	5	5	52	5	5
Infectie NC95- vaccinatie G08-G08	V-17-2774	<10	<10	<10	40	<10	<10	10	<10	<10	640	80	80	160	20	10	640	1280	40	160	160	10
	V-17-2775	<10	<10	<10	320	<10	<10	10	<10	<10	5120	1280	320	1280	2560	160	10240	10240	1280	2560	1280	160
	V-17-2776	<10	<10	<10	640	<10	<10	40	<10	<10	10240	640	160	1280	320	40	2560	2560	80	2560	1280	20
	V-17-2777	<10	<10	<10	80	<10	<10	10	<10	<10	640	80	40	320	40	10	320	1280	20	320	1280	20
	V-17-2778	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10	<10	640	160	160	320	40	20	320	5120	40	160	320	10
	Gemiddelde	5	5	5	121	5	5	12	5	5	1689	243	121	485	121	26	1114	2941	80	557	640	23
Infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10	V-17-2779	<10	<10	<10	80	<10	<10	<10	<10	<10	640	80	160	320	20	80	5120	640	2560	1280	80	640
	V-17-2780	<10	<10	<10	80	<10	<10	10	<10	<10	2560	80	640	320	10	40	640	80	2560	320	10	320
	V-17-2781	<10	<10	<10	80	<10	<10	20	<10	<10	2560	160	640	640	20	160	10240	640	10240	2560	160	5120
	V-17-2782	<10	<10	<10	160	<10	<10	40	<10	<10	10240	320	640	1280	40	640	10240	640	5120	2560	160	2560
	V-17-2783	<10	<10	<10	80	<10	<10	10	<10	<10	2560	160	640	640	20	320	10240	1280	5120	2560	160	1280
	Gemiddelde	5	5	5	91	5	5	13	5	5	2560	139	485	557	20	160	5120	485	4457	1470	80	1280
Infectie NC95- vaccinatie G08-PA10	V-17-2760	<10	<10	<10	320	<10	<10	80	<10	<10	2560	160	80	320	40	10	1280	160	40	80	40	10
	V-17-2761	<10	<10	<10	320	<10	<10	40	<10	<10	5120	640	160	640	160	40	10240	2560	1280	1280	640	320
	V-17-2762	<10	<10	<10	160	<10	<10	20	<10	<10	5120	640	80	640	160	20	10240	2560	1280	1280	320	160
	V-17-2763	<10	<10	<10	40	<10	<10	20	<10	<10	1280	160	40	320	80	10	1280	2560	640	320	320	160
	V-17-2764	<10	<10	<10	40	<10	<10	20	<10	<10	640	160	40	160	40	10	640	320	80	320	160	40
	Gemiddelde	5	5	5	121	5	5	30	5	5	2229	279	70	368	80	15	2560	970	320	422	211	80
Infectie NC95- vaccinatie PA10-G08	V-17-2769	<10	<10	<10	80	<10	<10	10	<10	<10	1280	160	640	320	10	160	5120	2560	2560	5120	1280	2560
	V-17-2770	<10	<10	<10	160	<10	<10	20	<10	<10	10240	80	2560	2560	10	320	20480	2560	2560	5120	640	1280
	V-17-2771	<10	<10	<10	160	<10	<10	20	<10	<10	10240	80	2560	1280	10	320	2560	320	640	1280	80	320
	V-17-2772	<10	<10	<10	320	<10	<10	20	<10	<10	5120	80	1280	1280	10	320	10240	2560	2560	2560	640	1280
	V-17-2773	<10	<10	<10	640	<10	<10	80	<10	<10	2560	40	320	640	10	160	2560	320	640	640	80	160
	Gemiddelde	5	5	5	211	5	5	23	5	5	4457	80	1114	970	10	242	5881	1114	1470	2229	320	735

Tabel 11. % Overzicht van alle H3N2 influenzavirussen gebruikt in de hemagglutinatie inhibitie (HI)-testen en de genetische verwantschap in het HA1 gedeelte van het hemagglutinine (weergegeven als % aminozuur homologie).

	H3N2 varken EU			H3N2 varken VSA								Seizoensgebonden humane H3N2						
	G84	ENG87	G08	TX98	MN99	ONT05	PA10	IN11	IA11	MO12	MO15	VIC75	ENG88	NC95	WI05	PER09	VIC11	HK14
sw/Gent/1/1984 (G84)	100	86.3	89.4	82.7	82.4	80.9	80.5	79.6	80.5	79.6	79.0	90.6	86.0	84.2	80.2	79.9	79.0	78.4
sw/England/163266/1987 (ENG87)		100	89.4	82.1	81.8	79.6	79.6	79.0	79.6	79.9	79.3	88.1	84.8	83.3	84.8	79.9	79.0	76.1
sw/Gent/172/2008 (G08)			100	82.4	82.9	81.5	81.5	79.6	80.2	80.5	79.6	86.6	85.1	83.3	80.9	80.5	80.2	78.7
sw/Texas/4199-2/1998 (TX98)				100	99.7	89.7	88.8	86.9	90.0	85.1	84.2	86.0	93.6	95.7	86.9	86.3	85.1	82.4
sw/Minnesota/593/1999 (MN99)					100	90.0	88.8	86.6	89.7	85.1	84.2	85.7	93.3	95.4	86.9	86.3	85.1	82.4
sw/Ontario/33853/2005 (ONT05)						100	96.7	95.4	95.1	86.3	85.1	83.3	91.5	93.0	87.5	87.8	86.3	83.2
sw/Pennsylvania/A01076777/2010 (PA10)							100	94.2	93.6	86.6	84.2	83.6	90.0	91.5	86.6	87.6	85.4	84.8
A/Indiana/08/2011 (IN11)								100	93.0	84.5	83.6	83.6	90.0	91.5	86.3	87.6	86.1	81.0
sw/Iowa/A01049750/2011 (IA11)									100	85.4	84.5	83.0	90.3	91.5	86.0	86.6	85.1	81.7
sw/Missouri/A01476459/2012 (MO12)										100	84.2	83.6	86.9	91.5	86.6	95.1	93.6	92.1
sw/Missouri/A01840724/2015 (MO15)											100	81.5	84.8	87.2	91.8	92.7	91.8	90.9
A/Victoria/3/1975 (VIC75)												100	89.1	87.8	84.2	84.5	83.0	82.1
A/England/427/1988 (EN88)													100	95.1	88.4	88.4	86.9	84.2
A/Nanchang/933/1995 (NC95)														100	90.0	90.0	88.1	86.9
A/Wisconsin/67/2005 (WI05)															100	96.0	95.4	93.3
A/Perth/16/2009 (PER09)																100	97.0	94.1
A/Victoria/361/2011 (VIC11)																	100	96.0
A/Hong Kong/4801/2014 (HK14)																		100

Tabel 12. Hemagglutinatine inhibitie (HI)-antistoftiters tegenover heterologe H3N2 influenzavirussen in verschillende antigenen clusters op 2 weken na de laatste immunisatie.

Immunisatie groep	Nummer Varken	HI-titer tegenover...																	
		H3N2 varken EU			H3N2 varken VSA								Seizoensgebonden humane H3N2						
		G84	ENG87	G08	TX98	MN99	ONT05	PA10	IN11	IA11	MO12	MO15	VIC75	ENG88	NC95	WI05	PER09	VIC11	HK14
Challenge controle groep	V-17-2751	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2752	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2753	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	V-17-2754	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10
	V-17-2755	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	Gemiddelde	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5.7	5	5
Infectie NC95	V-17-2785	<10	<10	<10	20	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10
	V-17-2786	<10	<10	<10	40	20	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	<10
	V-17-2787	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10
	V-17-2788	<10	<10	<10	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	40	<10	<10	<10	<10
	V-17-2791	<10	<10	<10	20	20	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	160	<10	<10	<10	<10
	Gemiddelde	5	5	5	17	10	5	5	5	6	5	5	5	5	70	5	5	5	5
Infectie NC95- vaccinatie G08-G08	V-17-2774	640	40	1280	80	80	20	40	40	160	40	40	40	80	640	<10	<10	<10	<10
	V-17-2775	5120	640	10240	5120	2560	160	1280	1280	1280	320	640	640	80	10240	<10	10	<10	<10
	V-17-2776	2560	320	2560	640	320	40	80	160	640	320	320	80	80	2560	<10	10	10	<10
	V-17-2777	640	80	1280	160	80	20	20	40	80	80	40	80	160	320	<10	<10	<10	<10
	V-17-2778	1280	160	5120	160	80	40	40	80	80	80	40	160	160	320	<10	<10	<10	<10
	Gemiddelde	1470	160	2941	368	211	40	80	121	243	121	106	121	106	1114	5	7	6	5
Infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10	V-17-2779	320	40	640	1280	640	320	2560	2560	1280	80	640	80	160	5120	<10	10	<10	40
	V-17-2780	20	10	80	320	160	320	2560	1280	640	40	80	<10	160	640	<10	10	10	20
	V-17-2781	80	80	640	2560	1280	2560	10240	10240	10240	640	640	40	80	10240	40	160	10	80
	V-17-2782	160	20	640	2560	1280	2560	5120	10240	10240	640	1280	80	640	10240	20	40	<10	40
	V-17-2783	1280	40	1280	2560	1280	640	5120	2560	5120	320	2560	40	160	10240	<10	10	<10	20
	Gemiddelde	160	30	485	1470	735	845	4457	3880	3378	211	640	35	184	5120	10	23	7	35
Infectie NC95- vaccinatie G08-PA10	V-17-2760	40	10	160	80	40	10	40	20	80	40	40	20	40	1280	<10	<10	<10	<10
	V-17-2761	640	40	2560	320	160	160	1280	1280	1280	640	320	80	320	10240	<10	10	10	<10
	V-17-2762	640	40	2560	640	320	80	1280	640	640	320	320	40	320	10240	<10	10	<10	<10
	V-17-2763	640	160	2560	320	160	80	640	640	640	160	160	80	320	1280	<10	<10	<10	<10
	V-17-2764	160	80	320	160	80	20	80	80	320	80	80	20	80	640	<10	<10	<10	<10
	Gemiddelde	279	46	970	243	121	46	320	243	422	160	139	48	160	2560	5	7	6	5

Infectie NC95- vaccinatie PA10-G08	V-17-2769	640	10	2560	2560	2560	1280	2560	5120	5120	160	320	80	40	5120	<10	10	10	<10
	V-17-2770	1280	160	2560	5120	2560	1280	2560	5120	2560	640	640	160	80	20480	10	40	40	20
	V-17-2771	80	40	320	1280	640	160	640	640	640	160	160	20	320	2560	20	<10	<10	<10
	V-17-2772	1280	20	2560	2560	2560	640	2560	5120	2560	1280	2560	320	640	10240	10	10	20	<10
	V-17-2773	80	<10	320	640	320	160	640	320	640	80	160	20	160	2560	<10	<10	<10	<10
	Gemiddelde	368	23	1114	1940	1280	485	1470	1940	1689	2787	422	70	160	5881	9	10	12	7

Tabel 13. Vergelijking van de serologische respons na homologe en heterologe prime-boost vaccinatie van infectie-immune dieren (deze masterproef) en influenza naïeve dieren (gegeven uit een vorige, gepubliceerde studie).

Immunisatie groep	Experiment	HI-antistofrespons 2 weken post vaccinatie			
		G08 (GMT)	PA10 (GMT)	Totaal aantal stammen waartegen HI-titer	
				≥40	≥160
Infectie NC95	Exp. 2 masterproef	<10	<10	1/18	0/18
Infectie NC95- vaccinatie G08-G08	Exp. 2 masterproef	2941	80	14/18	7/18
Infectie NC95- vaccinatie PA10-PA10	Exp. 2 masterproef	485	4457	12/18	12/18
Infectie NC95- vaccinatie G08-PA10	Exp. 2 masterproef	970	320	14/18	9/18
Infectie NC95- vaccinatie PA10-G08	Exp. 2 masterproef	1114	1470	13/18	12/18
Vaccinatie G08-G08	Gepubliceerd ¹	640	10	5/18	3/18
Vaccinatie PA10-PA10	Gepubliceerd ¹	13	806	8/18	4/18
Vaccinatie G08-PA10	Gepubliceerd ¹	320	226	9/18	6/18
Vaccinatie PA10-G08	Niet gepubliceerde gegevens	452	905	15/18	9/18

¹ Van Reeth, K., Gracia, J.C.M., Trus, I., Sys, L., Claes, G., Versnaeyen, H., Cox, E., Krammer, F., Qiu, Y., 2017. Heterologous prime-boost vaccination with H3N2 influenza viruses of swine favors cross-clade antibody responses and protection. Nature Partner Journal: Vaccines 2(11), 10.1038/s41541-017-0012-x.

GMT=geometrisch gemiddelde titer

Tabel 14. Virustiters van de individuele dieren in stalen na challenge met sw/Missouri/A01840724/2015 (MO15).

Virustiters op ...					
Immunisatie groep	Nummer varken	0 dpc	3 dpc		
		Neusswabs	Neusswabs	Trachea	Long Rechts
Challenge controle groep	V-17-2751	<1.7	6.3	5.5	6.3
	V-17-2752	<1.7	5.7	n.t.b.	5.5
	V-17-2753	<1.7	6.0	5.7	6.5
	V-17-2754	<1.7	6.5	n.t.b.	5.7
	V-17-2755	<1.7	6.2	6.3	6.7
	Gemiddelde	0.9	6.1	5.8	6.1
Infectie NC95	V-17-2785	<1.7	6.0	2.4	<1.7
	V-17-2786	<1.7	3.3	n.t.b.	6.0
	V-17-2787	<1.7	<1.7	1.8	<1.7
	V-17-2788	<1.7	5.7	n.t.b.	5.2
	V-17-2791	<1.7	3.0	1.9	4.3
	Gemiddelde	0.9	3.8	2.0	3.4
Infectie NC95- vaccinatie G08-G08	V-17-2774	<1.7	2.2	<1.7	2.0
	V-17-2775	<1.7	2.2	n.t.b.	<1.7
	V-17-2776	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2777	<1.7	<1.7	n.t.b.	<1.7
	V-17-2778	<1.7	5.5	<1.7	1.7
	Gemiddelde	0.9	2.3	0.9	1.3
Infectie NC95- vaccinatie P10-PA10	V-17-2779	<1.7	4.4	<1.7	<1.7
	V-17-2780	<1.7	2.4	n.t.b.	<1.7
	V-17-2781	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2782	<1.7	<1.7	n.t.b.	<1.7
	V-17-2783	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	1.9	0.9	0.9
Infectie NC95- vaccinatie G08-PA10	V-17-2760	<1.7	6.3	1.7	5.7
	V-17-2761	<1.7	<1.7	n.t.b.	<1.7
	V-17-2762	<1.7	4.8	<1.7	<1.7
	V-17-2763	<1.7	<1.7	n.t.b.	<1.7
	V-17-2764	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	2.7	1.1	1.8
Infectie NC95- vaccinatie PA10-G08	V-17-2769	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2770	<1.7	<1.7	n.t.b.	<1.7
	V-17-2771	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	V-17-2772	<1.7	<1.7	n.t.b.	<1.7
	V-17-2773	<1.7	<1.7	<1.7	<1.7
	Gemiddelde	0.9	0.9	0.9	0.9

Dpc= dagen post challenge. Virustiters in neusswabs worden uitgedrukt in log₁₀ TCID₅₀/100mg neussecret. In weefselstalen log₁₀ TCID₅₀/g weefsel

n.t.b.= nog te bepalen