

Belgische H3N1 Epizoötie

M. Steensels¹, P. Gelaude², T. Van Den Berg³, S. Van Borm¹, D. Fretin⁴, V. Roupie¹, F. Rauw¹ and B. Lambrecht¹

¹ Sciensano, Avian Virology and Immunology, Groeselenberg 99, 1180 Ukkel

² Dierengezondheid Vlaanderen, Industrielaan 29, Torhout

³ Sciensano, Head of the scientific direction Animal Health, Groeselenberg 99, 1180 Ukkel

⁴ Sciensano, Veterinary Bacteriology, Groeselenberg 99, 1180 Ukkel

In januari 2019, werd een eerste maal het H3N1 aviair influenza (AI) virus geïsoleerd in een leghennenbedrijf met buitenloop. Deze toom werd geruimd. Drie maanden na deze detectie, begin april, werd hetzelfde bedrijf opnieuw H3N1 positief bevestigd. Sindsdien wordt België, en meer specifiek de regio West- en Oost-Vlaanderen, geconfronteerd met een explosie van H3N1 AI uitbraken in de professionele pluimveesector.

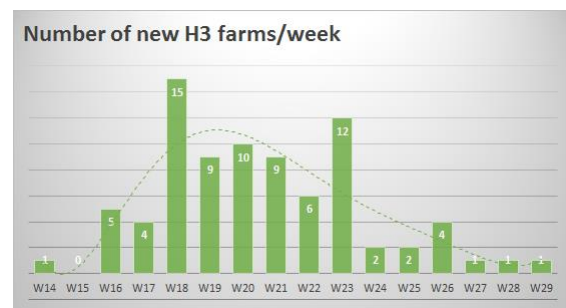
Volgens de EU-richtlijnen zijn de H5/H7-subtypes, onafhankelijk van het pathotype, meldingsplichtig, terwijl voor alle andere AI-subtypes enkel deze met een officieel hoog pathogeen pathotype gemeld dienen te worden.

Om het pathotype van een AI virus te bepalen dient een *in vivo* studie volgens strikte richtlijnen uitgevoerd te worden. Deze pathogeniciteitsstudie wordt uitgevoerd op 4 tot 6 weken oude specifiek pathogeen vrije (SPF) kippen. Tien dieren worden intraveneus geïnoculeerd en vervolgens 10 dagen klinisch opgevolgd. Een dagelijkse score wordt toegekend op basis van de waargenomen kliniek (0: geen symptomen, 1: beperkte kliniek, 2: meerdere klinische symptomen, 3: sterfte). Het gemiddelde, of de intraveneuze pathogeniciteits index (IVPI), wordt berekend over deze periode. De maximale score bedraagt 3, wat overeenkomt met een 100% sterfte de dag na infectie. Een AI virus wordt als laag pathogeen beschouwd met een IVPI lager dan 1.2. De IVPI voor het H3N1 virus werd bepaald voor twee stammen, het eerste isolaat van begin april (3497) en een isolaat van eind mei (5597).

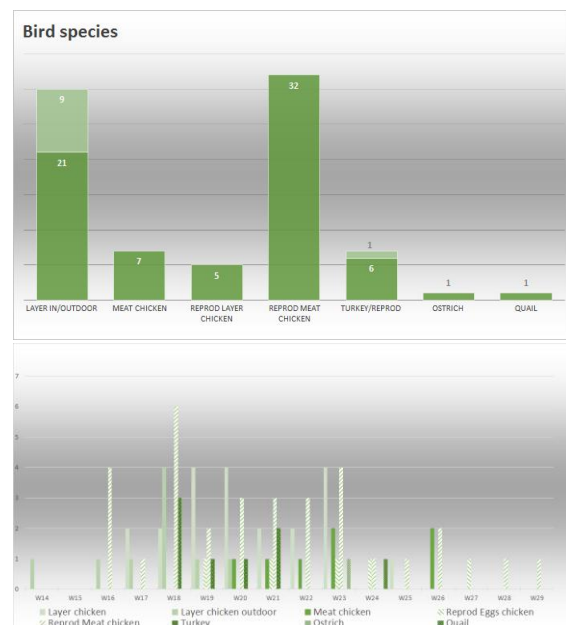
| Strain | IVPI |
|--------|------|
| 3497 | 0.13 |
| 5597 | 0.28 |

Volgens de EU-richtlijnen wordt dit virus beschouwd als een laag pathogeen, niet meldingsplichtig virus.

Vanaf begin april (week 14) tot op 24.07.2019 (week 29), werden 82 bedrijven positief H3-AI gedetecteerd.

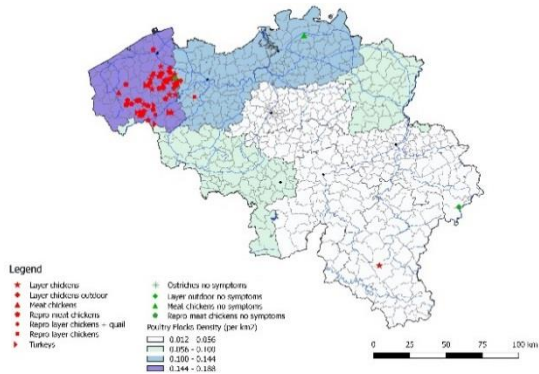


Bij de getroffen bedrijven bevinden zich zowel verschillende types van bedrijven als verschillende species en dit verspreid in de tijd.



De getroffen bedrijven bevinden zich voornamelijk in een beperkte geografische regio in het noordwesten van het land. Het enige klinisch positief bedrijf, gelokaliseerd in het zuiden van het land, had een directe link met een positief bedrijf uit de getroffen regio. Daarnaast bevonden zich nog 3 H3 positieve

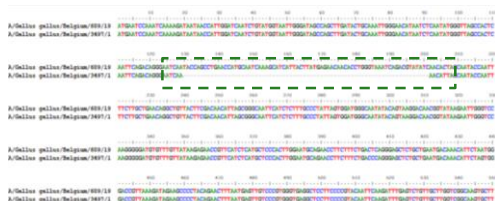
bedrijven buiten de getroffen regio, 2 in de provincie Antwerpen en 1 in de provincie Luik. Deze drie bedrijven vertoonden echter geen klinische verschijnselen.



Onder de 82 H3-positieve bedrijven zijn er in totaal 5 bedrijven waar geen kliniek werd waargenomen (groene symbolen op de kaart) en dit zonder link met de categorie van bedrijf: 2x vleeskippen, 1x outdoor-leghennen, 1x struisvogel en 1x vleeskippen vermeerdering.

Ook in Frankrijk werden 3 bedrijven H3N1-positief gedetecteerd, waarvoor het index- en het tweede bedrijf een directe link met een Belgisch bedrijf uit de getroffen zone aangetoond werd (<https://www.platforme-esa.fr/article/foyers-h3n1-en-france-nord-et-en-belgique-situation-au-14-juin-2019>).

Genetische karakteristieken van het virus toonde aan dat het initieel gedetecteerde virus van januari 2019, van een typisch wilde vogel AI virus evolueerde tot een aan pluimvee aangepaste stam begin april 2019, met een karakteristieke deletie van een stukje van het neuraminidase gen. Deze mutatie duikt op bij een circulatie in pluimvee, en bevordert de replicatie in en transmissie tussen pluimvee.

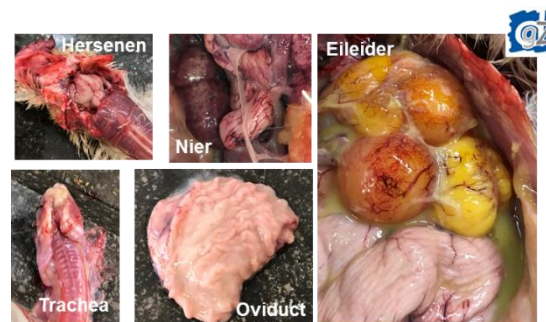


De genetische analyse van het H3N1_3497 isolaat¹ toonde aan dat alle 8 genen een genetische link vertoonden met in wilde vogel circulerende AI-virussen.

| | |
|-----|--|
| PB2 | A/tufted duck/Georgia/1/2012 (H2N3) |
| PB1 | A/duck/Hubei/ZYSYG3/2015 (H6N2) |
| PA | A/mallard duck/Netherlands/56/2015 (H3N2) |
| NA | A/mallard duck/Georgia/7/2015 (H6N1) |
| NP | A/duck/Mongolia/543/2015 (H4N6) |
| HA | A/Mallard/Netherlands/37/2015 (H3N8) |
| M | A/mallard/Netherlands/89/2017 (H4N6) |
| NS | A/mallard_duck/Netherlands/31/2013 (H10N7) |

In het veld gaf het virus in eerste instantie aanleiding tot het verkleuren van de eieren, gevolgd door een verhoogde sterfte tot 60% bij moederdieren en 40% bij leghennen. Daarnaast werd een verminderde eileg waargenomen, die kon oplopen tot 100%. Dieren die herstelden van de kliniek, hernamen echter nooit volledig de leg. Vervolgens kon een tweede sterftegolf opgemerkt worden ten gevolge van secundaire infecties.

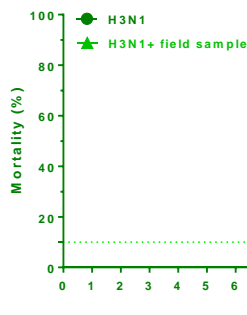
Bij autopsie werden specifieke puntbloedingen waargenomen ter hoogte van de bijmaag, trachea en hersenen, stuwung van de nieren, eierstok en hersenen, en atrofie van de eileider, met het lekken van de eidooier en peritonitis als gevolg (bacteriële infectie).



¹ GenBank accession numbers: MN006980-MN006987

Experimentele *in vivo* infectie studies werden uitgevoerd door het NRL met het 3497-isolaat (begin april). Elf weken oude SPF leggers werden via natuurlijke weg (oculonasaal) geïnoculeerd. Geen enkel klinisch symptoom werd waargenomen tijdens de studie (14 dagen).

Een niet met antibiotica behandeld long/trachea homogenaat, van een H3N1-bevestigd dier, werd gelijktijdig met het H3N1 isolaat geïnoculeerd. Kliniek werd waargenomen voor 40% van de dieren tussen 6 en 11 dagen na de dubbele inoculatie: lethargie, troebele ogen en onverzorgd verderkleed, samen met een beperkte sterfte (10%, 13 dpi). Een synergetisch effect van een 'co-factor' werd vermoed. Bijgevolg werd dit materiaal onderworpen aan een bacteriologisch onderzoek, wat de aanwezigheid van *Escherichia coli*'s aan het licht bracht, waaronder APEC's (aviar pathogene E coli stammen) gekenmerkt door bepaalde antibiotica resistenties.

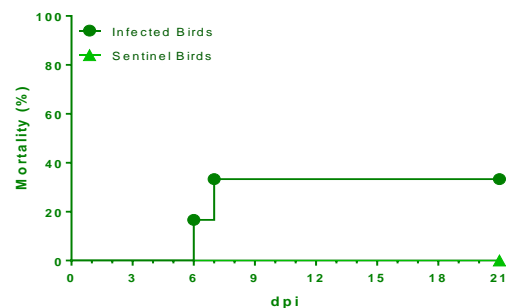


Aangezien de klinische symptomen op het terrein vooral uitgesproken waren bij leggers in productie, werden bijkomende studies uitgevoerd in dieren van hogere leeftijd met dezelfde stam (3497): 16 en 24 weken, respectievelijk.

Bij de studie op 16 weken oude SPF-legkippen, niet in productie, werd opnieuw geen sterfte waargenomen maar konden wel laesies opgemerkt worden ter hoogte van de kam.



Conventionele leggers in de leg van 24 weken, afkomstig van het terrein, werden eerst AI negatief bevestigd. Zes kippen werden geïnfecteerd en in contact gebracht met 6 niet geïnfecteerde dieren op 1 dpi. Twee van de 6 geïnfecteerde kippen stierven op 6 en 7 dpi. Voor de eerste kip die stierf werd op 5 dpi een beperkte lethargie waargenomen, terwijl voor het tweede dier dat een dag later (7dpi) stierf geen enkel voorafgaand klinisch symptoom werd waargenomen. Tijdens autopsie werden de boven aangehaalde laesies, zoals een uitgesproken vascularisatie van de hersenen, nieren en de darm waargenomen. Vervolgens werd geen verdere sterfte of kliniek meer geobserveerd.



Acknowledgements

Dank aan de ScienSano-collega's van het EpiVet team die de uitbrakenmap verzorgden. Onze oprechte dank aan de analisten van het Nationaal RefLab AI/ND voor hun prestaties, flexibiliteit en volhardendheid.