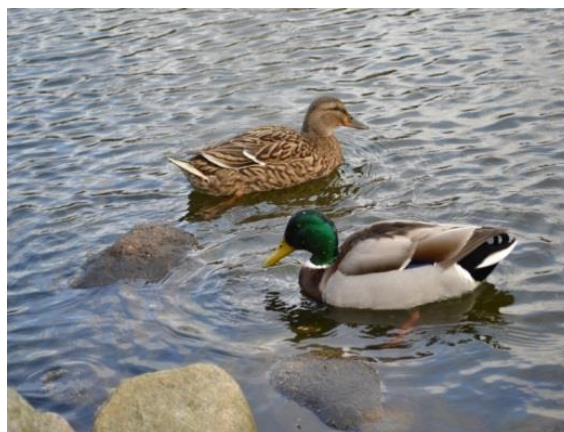
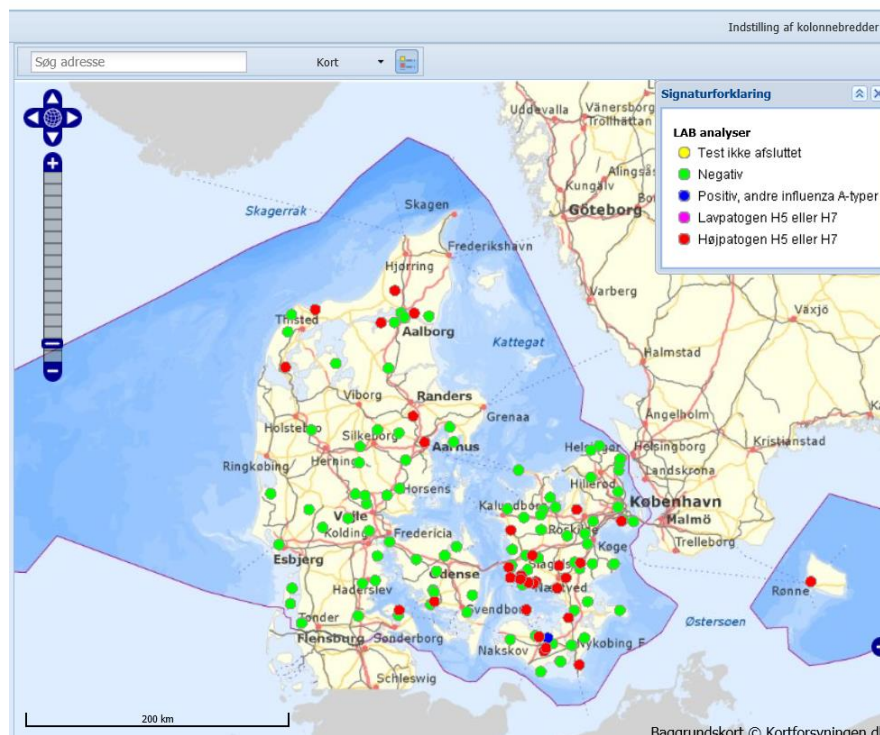


Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2018



September 2019

Charlotte K. Hjulsgaard

Denne rapport beskriver resultaterne der er opnået i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2018". Overvågningen er udført af DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) i samarbejde med Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum (SNM).

2018 var ligesom 2016 og 2017 været et specielt år, i det der var udbrud af højpatogen fugleinfluenza i vilde fugle i Europa inkl., Danmark. Nærværende rapport indeholder ikke en uddybende karakterisering af udbruddet, men data fra 2018 er beskrevet.

En stor tak rettes til indsamlerne af prøver fra vilde fugle i naturen, herunder de frivillige ringmærkere. Vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Klosterheden Vildt og Alpevej Vildtbehandling takkes for nedlagt fjervildtprøver. Tak til Mariann Chriél for indsamling af kadavere fra flyvestation Karup og Aalborg. Private borgere takkes for så vidt angår døde fugle til den passive overvågning for fugleinfluenza.

Endvidere takkes laboranter og dyrlæger i PCR-diagnostik, virologi, serologi og patologi, Afdeling for Diagnostik og Beredskab, DTU-VET, for omhyggelig udførelse af laboratorieundersøgelserne.

Endelig skal det bemærkes at AI beredskabet inkl. overvågningsaktiviteter flyttede til SSI pr. 1. marts, og rapporten er skrevet på SSI mens hovedparten af laboratorieanalyserne er udført på DTU-VET.

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2018

Rapport, final version 09. oktober 2019.

Af

Charlotte K Hjulsager, DTU Veterinærinstituttet og Statens Serum Institut
Jesper S Krog, DTU Veterinærinstituttet og Statens Serum Institut
Lise K Kvisgaard, DTU Veterinærinstituttet
Jesper J Madsen, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet
Kasper Thorup, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet
Lars E Larsen, DTU Veterinærinstituttet og Københavns Universitet

Copyright: Hel eller delvis gengivelse af denne publikation er tilladt med kildeangivelse.
Forsidefotos: Oversigt over resultater fra den passive overvågning 2018, <https://ai.fvst.dk/>.
Gråænder, Nana Hjulsager Mathiesen.
Udgivet af: Statens Serum Institut, Artillerivej 5, 2300 KBH S, Danmark.

Sammenfatning og konklusion

Overvågning af fugleinfluenza, aviær influenza (AI), på EU niveau går tilbage til 2002, og Danmark følger EU kommissionens bestemmelser for udformning af overvågningen, der har skiftet gennem årene i takt med indhøstede erfaringer.

I 2018 blev der udført EU lovomfattet passiv overvågning af døde vilde fugle, der blev fundet i naturen. Der blev testet 148 fugle, som var fundet døde i naturen. Der blev påvist HPAI H5N6 i 42 fugle. Hovedparten af de positive fund var i perioden 12. februar til 17. april (13 musvåger, 9 havørne, 2 gråkrager, 2 knopsvaner, 1 hættemåge, 1 sølvmåge, 1 skarv). Herefter fandtes sporadiske H5N6 HPAI positive fugle den 11. juli (1 ederfugl), 10. august (1 knopsvane), 27. august (2 gråænder, 2 fasaner), 3. september (1 ederfugl, 1 knopsvane), 5. september (1 grågåse) og 19. september (3 fasaner). Alle disse sene fund var i området omkring Smålandsfarvandet. Efter yderligere 3 måneder blev der påvist HPAI H5N6 i en havørn fundet den 22. december ved Næstved. Endvidere blev HPAI H5N6 virus påvist i en dødfunden musvåge fundet 4. januar 2019 i Odsherred. Disse fund indikerer tilstedeværelsen af HPAI H5N6 helt frem til slutningen af 2018. De sene fund i Danmark sås ikke i de øvrige europæiske lande. Der blev ikke påvist HPAI H5N6 virus i danske fjerkræbesætninger.

Molekylærphylogenetisk analyse af HA gener i HPAI H5N6 virus fundet i Danmark i 2018 viste, at disse virus var nært beslægtede med hinanden og med samtidige HPAI H5 clade 2.2.4.4b virus fra andre europæiske lande. Virus adskilte sig genetisk fra H5N6 virus, der har smittet mennesker i Asien, og fra HPAI H5N1 subtype virus, der var årsag til udbrud i vilde fugle i 2006. Fuldstændig sekvensanalyse af 15 danske HPAI H5N6 subtype virus indikerer, at det er det samme HPAI virus, der har cirkuleret i vilde fugle i Danmark i 2018.

Der blev også udført en aktiv overvågning af AI virus i vilde fugle i Danmark i 2018. Denne blev udført i samarbejde mellem Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet (DTU-VET), Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet (SNM) i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2018". Omfanget af overvågningen var som i 2017, dvs. reduceret til 900 fugle i forhold til de foregående år og kun med fokus på H5/H7 virus.

Der blev i alt testet 866 fugle som 251 pools af kloaksvabere fra op til 5 fugle af samme art, fundet på samme sted og på samme tid. I lighed med proceduren i 2013-2017, blev prøverne udtaget fra enkelt dyr og sendt til laboratoriet (DTU-VET), hvor de blev poollet inden test. Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Falster, Sjælland og i Hovedstadsregionen. FVST varetog udtagelse af prøver fra 394 fugle fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt. Ti nedskudte fugle fra flyvestation Karup og Aalborg indgik også i overvågningen. Statens Naturhistoriske Museum (SNM) koordinerede indsamling af prøver fra 462 vildtlevende fugle.

I alt 57 pools (23 %) blev fundet positive for AI virus ved PCR. Af disse var kun én lavpatogen AI (LPAI) H5, hvilket er helt usædvanligt. De tidligere år er der påvist H5 LPAI virus i op til 28 % af de influenza A virus PCR positive pools, svarende til 5 til 20 H5 LPAI positive pools. Det er uvist, om det er en tilfældighed, at der kun er påvist én H5 LPAI virus i 2018-overvågningen, men det faktum at der ikke er ændret nævneværdigt ved designet af overvågningen i forhold til de foregående år, peger i retning af en anden forklaring. Udbruddet af HPAI H5 virus i vilde fugle fra november 2016 til 2018 har været en usædvanlig hændelse, og denne kan have induceret en øget immunitet overfor H5 virus i betanden af vilde fugle. Dette kan være en forklaring på at der ikke er H5 virusudskillelse i samme grad som tidligere, og dermed forklare at vi ikke har fundet H5 LPAI virus i samme udstrækning som sædvanligvis. Andelen og antallet af positive pools i 2018 var på niveau med tidligere år. Der blev ikke påvist LPAI H7 i prøverne fra vilde fugle, hvilket ikke er usædvanligt. Materiale fra positive pools blev podet i æg med henblik på at isolere AI virus, succesraten var 30 %, hvilket er højere end de foregående år.

I 2018 var der udbrud af LPAI H5 virus i to danske fjerkræbesætninger. De påviste virus indgik en molekylær karakteriseringsanalyse, og dette bidrog til en dybere og mere præcis karakterisering af virus, så vi ret præcist ved hvilke virus varianter, vi har påvist. Dermed er opnået en god indikation af hvilke AI virus, der cirkulerer i Danmark, og en viden om at disse virus pt. ikke udgør en øget trussel mod den humane sundhed. Overvågningen viser dog, at der til stadighed cirkulerer influenzavirus i den vilde fauna, som potentielt kan true dyresundheden, så der er fortsat et behov for at overvåge forekomsten af AI virus i fjerkræflokke. Fylogenetisk analyse af LPAI H5 gener fra virus påvist i fjerkræ i 2018 viste, at disse var nært beslægtede med H5 gener fra virus i prøver fra vilde fugle, der blev indsamlet i Danmark de foregående år, samt med virus fra vilde fugle og fjerkræ i Europa

Sekventering af LPAI H5 generne gav også mulighed for at undersøge, hvor godt de anvendte RT-PCR assays, som er de samme der anvendes til diagnostisk undersøgelse af AI mistanker, matcher nutidige AI virus. Resultatet af analysen af de tre H5 specifikke RT-PCR assays viste, at de overordnet set er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, på trods af den drift i sekvenserne, som afsløres af fuldlængde HA sekventeringen. Men analysen viste også, at det er nødvendigt med en strategi, der involverer samtidig anvendelse af flere af disse subtypningsassays for en sensitiv påvisning af LPAI H5 virus.

Fitness-analysen understregede vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov. Da EU referencelaboratoriet sjældent har adgang til LPAI sekvenser fra vilde fugle i real-time, og da der endvidere kun sker et meget begrænset fund/offentliggørelse af fund af LPAI H5/H7 virus i vilde fugle, kan EU referencelaboratoriet ikke udføre en fyldestgørende analyse af driften i H5/H7 virus. Det er derfor nødvendigt, at vi selv holder øje med situationen under danske forhold, via en fortsat overvågning af driften i H5/H7 virus. På den måde kan vi bedst sikre, at vi har det rette værktøj til at påvise H5/H7 virus med høj sensitivitet, når der opstår mistanke om AI virus i danske fjerkræbesætninger, og således hurtigt få kontrol over de anmeldte AI virus til gavn for både dyresundheden og samfundsøkonomien.

2018 har på europæisk plan især været præget af udbrud med HPAI H5N6 i vilde fugle, dette gælder også i Danmark. HPAI H5N6 blev ikke påvist i fjerkræ, men der var udbrud af LPAI H5N2 virus i en gråandeflok påvist i forbindelse virologisk screening af rutine overvågningsprøver i fjervildtopdræt. Endvidere blev LPAI H5 virus påvist i ænder sfa. mistanke om cirkulerende AI virus efter påvisning af influenzaantistoffer i rutineovervågningsprøver.

Indholdsfortegnelse

Sammenfatning og konklusion	3
Indholdsfortegnelse.....	5
Introduktion.....	6
Baggrund	6
Formål.....	9
Materialer og metoder	10
Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle.....	10
Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle	10
PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse	10
Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse	10
Resultater og diskussion.....	11
Passiv overvågning - døde vilde fugle.....	11
Aktiv overvågning – levende vilde fugle	13
Prøver	13
PCR resultater	14
Virusisolater.....	16
Sammenligning med resultater fra tidligere år	17
Molekylær karakterisering af AI virus.....	18
H5 evaluering af diagnostiske assays	18
H5 LPAI diversitet	19
H5 HPAI diversitet.....	21
H7 diversitet	21
H9 virus.....	22
AI virus i fjerkræ.....	23
Referencer	25
Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning	27
Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning	30
Bilag 3. Virusisolatoversigter	31
Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 RT-PCR assays.....	32
Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2018.	35

Introduktion

Baggrund

Aviær influenza (AI) er en smitsom virusinfektion, som kan angribe alle fuglearter, og som er forårsaget af influenza A virus. Influenza A virus tilhører *Orthomyxoviridae* virusfamilien og har et negativ-sense, enkeltstrengt, segmenteret RNA genom. Influenza A virus kan inficere mange dyrearter inkl. mennesker, grise, heste og fugle. Vilde fugle af ordenerne *Anseriformes* (ænder, gæs og svaner) og *Charadriiformes* (måger, terner og vadefugle) menes at udgøre det naturlige reservoir for influenza A virus (Verhagen et al. 2011).

Influenza A virus udviser en stor diversitet. Mest udtalt er den genetiske og antigene variation af overfladeproteinerne hæmagglutinin (HA) og neuraminidase (NA). Virus klassificeres ud fra den antigene variation af disse HA og NA proteiner. I fugle kendes 16 hovedvarianter af HA og 9 varianter af NA. De findes i mange kombinationer, og disse såkaldte virussubtyper (f.eks. H1N1, H5N1 og H7N3) anvendes i influenza A virus klassifikation og nomenklaturen. AI virus kan yderligere klassificeres på baggrund af deres patogene fænotype i kyllinger. Højpatogen aviær influenza (HPAI) er en akut systemisk sygdomstilstand i fjerkræ, hvor mortaliteten kan være op til 100 %. HPAI er med meget få undtagelser begrænset til virus af subtyperne H5 og H7, men det er ikke alle H5 og H7 virus, der er højpatogene. Alle andre aviære influenzavirus er lavpatogene (LPAI), og forvolder mildere eller ingen sygdom (Verhagen et al. 2011). Udvikling af sygdom efter infektion med AI virus er værtsafhængig, således at et givent virus i nogle arter giver kliniske symptomer, mens det i andre arter giver mildere symptomer eller slet ingen. LPAI virus forekommer enzootisk hos vilde fugle, mens kun få HPAI virus er enzootisk forekommende og kun udenfor Europa (f.eks. H5N1) (Alexander, 2000a).

LPAI virus kan mutere til HPAI virus. Aminosyre sekvensen omkring HA kløvningsstedet er afgørende for patogeniteten, men konstellationen af de øvrige gener og individuelle genmutationer spiller ligeledes en rolle (Hatta et al. 2001; Stech et al. 2009). De faktorer der medfører transition fra LPAI til HPAI kendes ikke. I nogle tilfælde ser det ud til at virus har muteret fra LPAI til HPAI umiddelbart efter introduktion af LPAI til fjerkræ, mens LPAI virus i andre tilfælde har cirkuleret i månedsvis før den/de nødvendige mutationer er sket (Banks et al. 2001). Det er således rimeligt at antage, at risikoen for, at ændringen fra LPAI til HPAI vil ske, afhænger af hvor længe og hvor mange LPAI virus der cirkulerer i en flok (Alexander, 2007). Dermed er det en uønsket situation at have LPAI H5/H7 virus cirkulerende i fjerkræflokke, og således er det vigtigt at undgå introduktion af LPAI H5/H7 virus. Hvis introduktion sker, er en hurtig diagnose og effektiv bekæmpelse, f.eks. ved de-population (aflivning), af yderste vigtighed. Vilde fugle er i nogle tilfælde identificeret som en mulig kilde til introduktion af virus til fjerkræflokke (Alexander, 2007). Dette kan ske enten ved direkte kontakt eller indirekte kontakt, hvor andre dyrearter, mennesker eller utensilier mekanisk har båret virus ind i flokken. Denne sekundære transmission af virus er i nogle større udbrud af AI, kædet sammen med bevægelse af personale og materiel mellem besætninger. Virus er stabilt i miljøet og kan overleve i længere tid i f.eks. overfladevand, som dermed udgør en kilde til virus og bidrager til cirkulation af virus i bestanden af vilde fugle, især svømmefugle (Alexander, 2007).

LPAI virus kan inddeles i to fylogenetiske hovedlinjer: den eurasiske og den amerikanske linje. Denne opdeling af influenzavirus kan forklares ud fra den geografiske og økologiske adskillelse af fugle, der benytter trækruter enten over Europa/Asien/Afrika/Australien eller Amerika (Munster and Fouchier, 2009; Verhagen et al. 2011). Ud over den geografiske opdeling af AI virus ses også en opdeling baseret på værtspopulationer. Et eksempel herpå er H13 og H16 subtyper der primært isoleres fra måger og terner (*Charadriiformes*)

(Fouchier et al. 2005). Disse AI virus har udviklet sig til separate genetiske linjer, der er forskellige fra AI virus af subtyperne H1 – H12 der primært findes i ænder (*Anseriformes*) (Munster et al. 2007).

Udbrud af HPAI i fjerkræ kendes tilbage til 1959, hvor det første udbrud med HPAI H5N1 blev påvist i høns i Skotland. Frem til omkring 2003 var der ca. 20 udbrud i tamfjerkræ med HPAI H5 eller H7 virus på verdensplan. Frekvensen af udbrud har siden været stigende. De fleste udbrud har været i høns og har typisk involveret fra tusindvis til millioner af dyr (Alexander, 2007). I 2003 ændrede situationen sig imidlertid dramatisk, idet HPAI H5N1 af asiatisk oprindelse blev enzootisk forekommende i dele af Asien og bredte sig til Europa og Afrika, hvor virus har været årsag til udbrud i vilde fugle og/eller fjerkræ i over 60 lande, heraf 24 europæiske (Cattoli et al. 2009). Udover at være et problem i fjerkræproduktionen, anses HPAI H5N1 virus for at være en betydelig human trussel med mere end 400 fatale tilfælde og en frygt for, at dette virus vil kunne udvikle sig til et virus med pandemisk potentiale (Capua og Alexander, 2007).

Ved udbrud af HPAI i fjerkræ, især i tamænder der opdrættes på friland, vil der være risiko for overførsel til vildfugle populationen (Alexander 2007) og virus kan potentielt spredes over store afstande af vilde fugle, især hvis de ikke eller kun i ringe grad er klinisk syge (Keawcharoen et al. 2008).

De seneste år har der været udbrud af HPAI H5 virus i vilde fugle og fjerkræ i Europa. I 2014-15 med HPAI H5N8. I vinteren 2014/2015 blev dette virus rapporteret fra både vilde fugle og fjerkræ i EU (Tyskland, Holland, UK, Sverige, Italien, Ungarn). Disse virus tilhører clade 2.3.4.4.a HPAI H5 virus. Genetiske undersøgelser af virus fra både vilde fugle og fjerkræ peger på en rolle for vilde fugle i spredningen af virus. H5N8 viruset blev også fundet i USA, og reassorterede efterfølgende med amerikansk linje NA gener. Reassorterede HPAI H5 clade 2.3.4.4a virus med andre N typer end N8 (H5N5, H5N6) er ligeledes fundet i Asien.

I 2016-2017 blev der igen rapporteret om HPAI H5N8 virus i Europa i vilde fugle og fjerkræ. H5 fra denne periode adskilte sig genetisk lidt fra 2014-15 virus og tilhører clade 2.3.4.4b. Det første fund var 27. oktober 2016 i en vild fugl i Ungarn. Viruset spredte sig herefter hurtigt til de fleste europæiske lande, herunder Danmark 7. november 2016.

Genetiske analyser har indikeret, at det er sandsynligt, at virus er introduceret med vilde fugle fra Rusland via hhv. en nord- og en centraleuropæisk rute. Virus er tæt beslægtet med virus, der blev påvist tidligere i 2016 i Tyva, Rusland. FAO (The Food and Agriculture Organization) advarede i september 2016 om, at der var stor risiko for spredning af HPAI H5N8 vest og syd for Tyva med trækfugle, på baggrund af dette fund og ved sammenligning med dynamikken af tidligere introduktioner af HPAI virus til Europa (Sims et al. 2016).

Udover H5N8, er der i 2016-17 mindre omfang påvist HPAI reassortments H5N5 og H5N6 i Europa. Disse virus er sandsynligvis opstået ved reassortment mellem H5N8 HPAI og lokale lavpatogene virus. De er således ikke nært beslægtede med humanpatogene H5N6 virus fra Sydøstasien, der siden 2014 har krævet 7 dødsfald i Kina, blandt 24 laboratoriebekræftede tilfælde (WHO No. 707, 2019).

H9N2 virus er enzootisk forekommende i forskellige typer af terrestrisk fjerkræ flere steder på det euroasiatiske kontinent, nogle gange med øget sygelighed. Dette virus blev første gang påvist i Guangdong provinsen i Kina i 1994. Smitte til mennesker med dødelig udgang er forekommet og virus har doneret interne gener til zoonotiske influenzavirus Asian H7N9 og H10N8.

Virus med subtypen H7N9 kendes fra tidligere, men i marts 2013 blev en særlig H7N9 variant, i det efterfølgende benævnt "Asian H7N9", fundet i Kina. Dette specifikke virus menes at være opstået ved multiple reassortment events af virus fra asiatiske fugle; H7N9 viruset har formodentlig fået sit HA gen fra domesticerede ænder, NA genet fra vilde fugle og de resterende gener fra H9N2 virus fra domesticeret

fjerkræ. Virusset er udbredt i fjerkræ i Kina. Virusset kendtes i begyndelsen kun i en lavpatogen form i fjerkræ, som dog kunne forårsage alvorlig sygdom i mennesker. Siden februar 2017 er der også påvist HPAI H7N9 virus i fjerkræ. Dette virus kan også smitte mennesker og forårsagede en stigning i antallet af humane tilfælde under den 5. bølge af H7N9 epidemien (oktober 2016 - september 2017) og en geografisk spredning af tilfældene. Pr. 19. september 2019 har der været 6 bølger af H7N9 virus og 1568 laboratoriebekræftede humane tilfælde er indrapporteret til WHO siden starten af 2013 (WHO No. 707, 2019). De humane cases relateres til kontakt med smittede levende eller døde fugle eller inficeret miljø. Der har været 616 dødsfald pr. 4. september 2019. Sideløbende med de humane cases er nye tilfælde i fjerkræ og omgivelserne (http://www.fao.org/ag/againfo/programmes/en/empres/H7N9/situation_update.html).

I perioden fra januar 2003 – 24. juni 2019 er 861 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af smitte med asian lineage HPAI H5N1 virus fra 17 lande indrapporteret til WHO, heraf 454 med dødelig udgang (WHO No. 707, 2019). De fleste tilfælde er fra Asien, især Indonesien og Vietnam, og Egypten. Siden 2016 har der kun været få eller ingen rapporterede tilfælde. De humane cases relateres til kontakt med smittede levende eller døde fugle eller inficeret miljø.

I februar 2018 er der rapporteret om et tilfælde af human smitte med aviær influenza virus A subtype H7N4 (WHO No. 707, 2019).

På europæisk plan var 2016 og 2017 især præget af udbrud med HPAI H5N8 i vilde fugle og fjerkræ i en lang række lande, og udveksling af virus mellem disse segmenter. Dette gjaldt også Danmark. I 2018 var det primært HPAI H5N6 virus, der har været årsag til udbrud i vilde fugle og fjerkræ i Europa, om end i lavere målestok end H5N8 udbruddene i 2016-2017. I Danmark blev HPAI H5N6 påvist i vilde fugle i 2018 men ikke i fjerkræ.

Formål

Formålet med AI overvågningen i vilde fugle i Danmark er at sikre en tidlig påvisning af HPAI (passiv overvågning) og at belyse vilde fugles rolle i spredningen af AI virus (aktiv overvågning). Overvågningen udføres som en virologisk screening, der primært er rettet mod AI virus med subtyperne H5 og H7. Fund af andre AI virus i vilde fugle subtypes så vidt muligt. Via den molekylære karakterisering af de virus, der påvises i vilde fugle i den danske fauna, og fjerkræ der opdrættes på dansk grund, opnås en mere præcis karakterisering af virus end blot på subtype niveau, fx til hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af Asian H7N9 like virus og andre varianter af AI virus med zoonotisk potentiale. De molekylære analyser frembringer ligeledes værdifulde data til en løbende evaluering af egnetheden af de molekylærdiagnostiske assays, der anvendes til at undersøge mistanker om AI i fjerkræ. Dette er en stadig nødvendighed, da AI virus konstant muterer.

AI overvågningen i vilde fugle i Danmark i 2018 bestod af:

1) Passiv overvågning.

Overvågning for HPAI i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens afgørelse af 25. juni 2010 (2010/367/EU), bilag II. Målgruppen af fugle er angivet i artslisten (<https://eur-lex.europa.eu/legal-content/en/ALL/?uri=CELEX:32010D0367>).

FVST indberettede laboratorieresultaterne fra den passive overvågning til EU kommissionen.

2) Aktiv overvågning.

En national aktiv overvågning for LPAI virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.

3) Molekylær karakterisering.

Udvalgte virus og gener fra 1) + 2), samt virus i fjerkræbesætninger påvist i forbindelse med AI mistanker og virologisk overvågning af opdrættet fjervildt, blev karakteriseret molekylært med fokus på karakterisering af H5 og H7 virus.

Materialer og metoder

Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle

Kadavere af fugle fundet døde i naturen blev indsendt til DTU-VET, hvor der blev udtaget kloaksvabere og trachealsvabere i AI kloak(flerstyrke)medie til analyse for AI virus, således at hver fugl blev testet som 'en pool kloak- og svælgsvaber. Laboratoriesvar blev sendt til indsender med kopi til FVST, Dyresundhed. Fuglene og de tilhørende laboratorieresultater blev ligeledes løbende registreret i FVST's offentligt tilgængelige fugleinfluenza database (<https://ai.fvst.dk/>).

Prøveindsamling, aktiv overvågning - raske vilde fugle

Til den aktive overvågning af raske vilde fugle blev der indsamlet kloaksvaberprøver fra vilde fugle, som i det efterfølgende er opdelt i to kategorier baseret på indsamlingsmetoden:

1) Nedlagt fjervildt. FVST varetog udtagelse af prøver fra nedlagte ænder og gæs, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt, i alt 394 fugle. Prøverne blev udtaget i perioden 12. september - 19. november 2018, og indsendt på køl til DTU-VET med FVST's kurerservice. Ti fugle nedskudt på Flyvestation Karup og Aalborg indgik også i denne kategori af vilde fugle.

2) Levende fugle. SNM koordinerede udtagelse af prøver fra vildtlevende fugle, der enten blev fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning eller nedlagt ved jagt samme dag, som prøverne blev taget. Prøverne blev udtaget som kloaksvabere i kloak(flerstyrke)medie og indleveret eller indsendt med PostNord til DTU-VET på køl. Der blev indsendt prøver fra 462 fugle, indsamlet 13. februar og i perioden 1. september - 13. december 2018.

Prøver fra op til 5 fugle af samme art og udtaget på samme tid og sted, blev poollet på laboratoriet før test. Alle pools blev undersøgt på DTU-VET med laboratoriemetoder udført i henhold til den diagnostiske manual for aviær influenza, EU direktiv 2005/94/EF, med mindre andet er angivet.

PCR-screening, -subtypning og patogenicitetsbestemmelse

Alle pools blev indledningsvist screenet for tilstedeværelsen af Influenza A virus med real-time RT-PCR målrettet matrix-genet. Influenza A virus positive pools blev subtypet med specifik RT-PCR (real-time og/eller konventionel RT-PCR) mod H5 og H7 subtyperne. H5 og H7 positive pools blev ligeledes konfirmeret ved sekventering henover HA-kløvningsstedet, og sekvensen blev anvendt til bestemmelse af patogeniciteten som hhv. lavpatogen AI virus (LPAI) eller højpatogen AI virus (HPAI).

Dyrkning og subtypning af isolater samt patogenicitetsbestemmelse

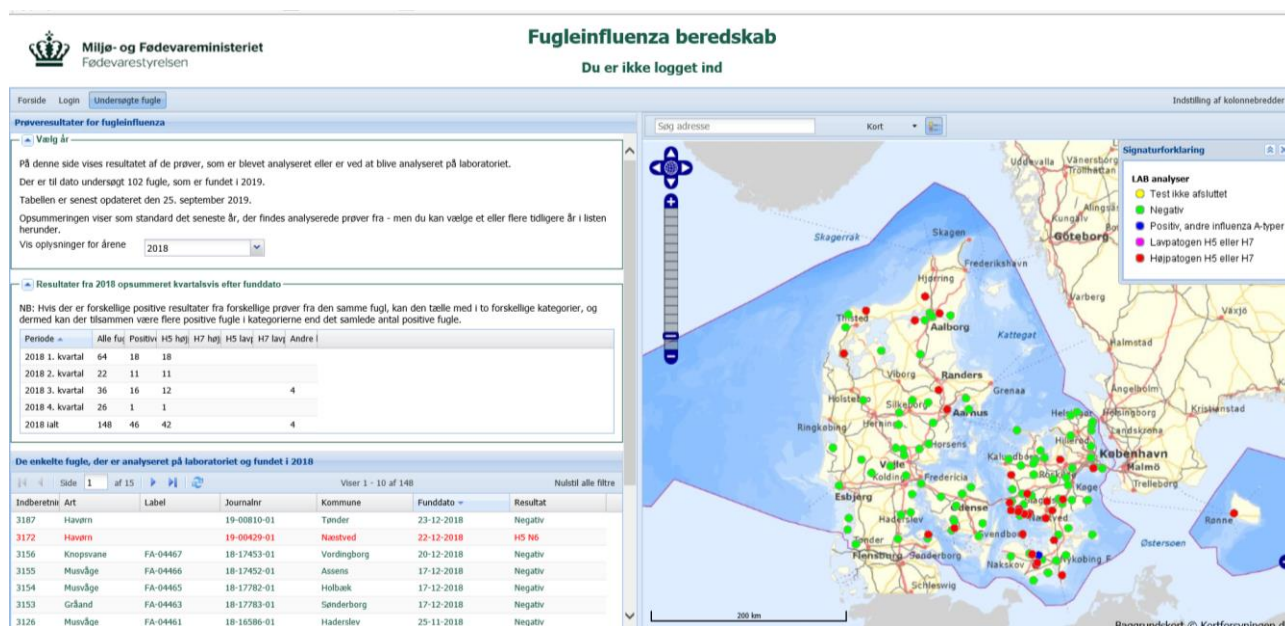
Alle pools, der var PCR positive for AI virus, blev podet i embryonerede hønseæg med det formål at isolere virus. AI virusisolater blev bekræftet med real-time RT-PCR målrettet matrix-genet, og H og N subtypet ved anvendelse af hæmagglutinations inhibitionstest (HI-test) og neuraminidase inhibitionstest (N-test), og/eller ved Sangersekventering af HA og NA generne med in-house protokoller med primere modificeret fra Hofmann et al. (2001) eller ved inhouse Next-generation sequencing (NGS) på OneTube PCR produkter genereret med MBTuni12R og MBTuni13 primere (modificeret fra Zhou et al. 2009). I de fleste tilfælde hvor virusisolaterne ikke var AI virus, blev isolaterne testet med RT-PCR for PMV1 og evt. ved HI-test overfor aviær paramyxovirus type PMV1-9 antisera.

Resultater og diskussion

Passiv overvågning - døde vilde fugle

Som led i den passive overvågning for AI virus i 2018, blev der testet 148 fugle, som var fundet døde i naturen (bilag 1). Der blev påvist HPAI H5N6 i 42 fugle. Hovedparten af de positive fund var i fugle indsamlet i perioden 12. februar til 17. april (13 musvåger, 9 havørne, 2 gråkrager, 2 knopsvaner, 1 hættemåge, 1 sølvmåge, 1 skarv). Herefter fandtes sporadiske H5N6 HPAI positive fugle den 11. juli (1 ederfugl), 10. august (1 knopsvane), 27. august (2 gråænder, 2 fasaner), 3. september (1 ederfugl, 1 knopsvane), 5. september (1 grågås) og 19. september (3 fasaner). Alle disse sene fund var i området omkring Smålandsfarvandet. Efter yderligere 3 måneder blev der påvist HPAI H5N6 i en havørn fundet den 22. december ved Næstved. Endvidere blev HPAI H5N6 virus påvist i en dødfunden musvåge fundet 4. januar 2019 i Odsherred. Disse fund indikerer tilstedeværelsen af HPAI H5N6 helt frem til slutningen af 2018. De sene fund i Danmark sås ikke i de øvrige europæiske lande.

Udover HPAI virus blev der påvist influenza A virus ikke H5/H7 subtype i 4 knopsvaner fundet 25. august. Den geografiske fordeling af fugle indsendt til undersøgelse i 2018 fremgår af figur 1. De testede fugle er fundet fordelt over hele landet. En stor andel af de positive fund er koncentreret omkring Smålandsfarvandet.



Figur 1. Passiv overvågning af AI, Danmark 2018. Detaljerede oplysninger fremgår af <https://ai.fvst.dk/> og bilag 1.

Foruden de danske fund af HPAI H5N6 blev denne subtype påvist i Finland, Sverige, Holland, Tyskland, Irland, Slovakiet og Storbritannien, primært i første halvår af 2018 (https://ec.europa.eu/food/animals/animal-diseases/control-measures/avian-influenza_en). De sene fund i Danmark sås ikke i de øvrige europæiske lande.

Det første fund af HPAI H5N6 på dansk grund var i en havørneunge ved Slagelse, der bar en GPS-sender, hvoraf det fremgik, at den ikke havde været udenfor Sjælland på noget tidspunkt (DOF, 2018). Dermed må den være blevet smittet i Danmark. Der blev efterfølgende indleveret to havørne, der var observeret døde den 9. og 12. februar i hhv. Næstved og Guldborgsund kommune, hvori der også blev påvist HPAI H5N6 virus. Hvorvidt disse specifikke fugle bragte virus til Danmark fra udlandet er uvist, men genetiske analyser har vist

at HPAI H5N6 virus i de danske fugle er nært beslægtet med HPAI H5N6 virus, der er påvist i de andre europæiske lande.

I 2016-2017 var der udbrud af HPAI H5N8 subtype i vilde fugle og fjerkræ i mange Europæiske land herunder i Danmark. Genetiske analyser viser at de danske HPAI H5N6 virus er beslægtet med de europæiske HPAI H5N8 virus fra 2016-2017. Se i øvrigt afsnit om HPAI H5 diversitet.

Tabel 1. Oversigt over den passive overvågning af AI i Danmark 2009-2018.

Døde vilde fugle	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Antal fugle testet	83	56	33	18	10	10	37	204	154	148
AI virus PCR positive	1	3	1	2	0	0	1	66	22	46
H5/H7 LPAI positive	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
H5/H7 HPAI positive*	0	0	0	0	0	0	0	*65	*17	**42

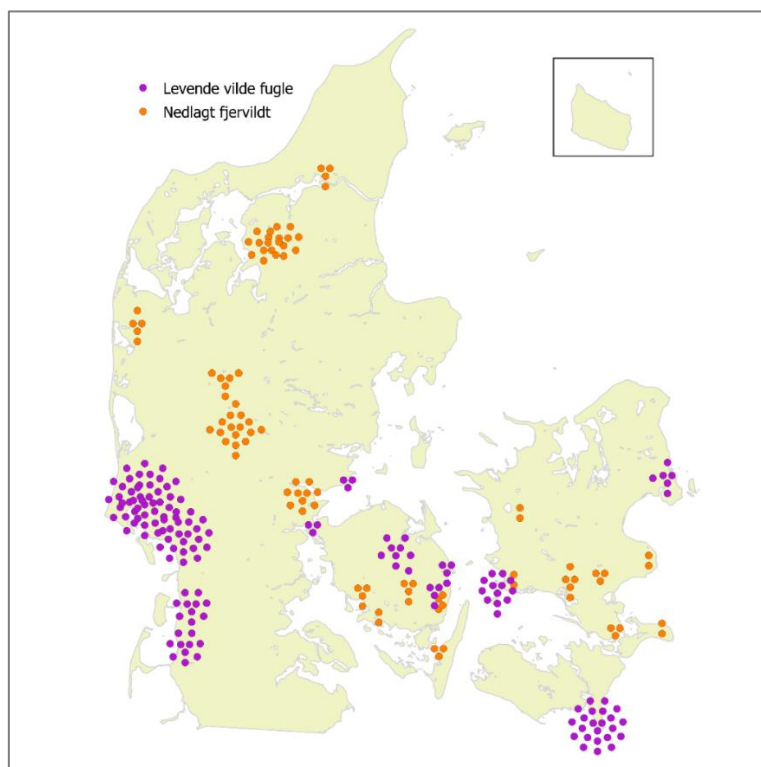
*HPAI H5N8, **HPAI H5N6.

Aktiv overvågning – levende vilde fugle

Prøver

Indsamlingen var målrettet de arter, som bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle prøver fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. Der blev indsamlet prøver fra vilde fugle indleveret på vildthåndteringsvirksomheder ("Nedlagt fjervildt") og fra raske vilde fugle i naturen ("Levende fugle").

Kategorien "nedlagt fjervildt" omfattede 382 gråænder og 12 krikænder skudt ved jagt og indleveret på vildthåndteringsvirksomheder, hvor der blev udtaget prøver. I samme kategori indgik også 10 regulerede fugle skudt på Flyvestation Karup og Aalborg (4 sangsvaner, 3 stormmåger, 1 grågås, 1 gråkrage og 1 musvåge). Kadavere af disse blev kørt til DTU Veterinærinstituttet hvor der blev taget prøver ud.



Figur 2. Indsamlingssteder på postnr.-niveau for fugle i den aktive overvågning for aviær influenza 2018. Både nedskudssteder for fugle i kategorien "nedlagt fjervildt", der omfattede fugle hvorfra der blev udtaget prøver på vildthåndteringsvirksomheder og nedskudte fugle fra Flyvestation Aalborg og Karup, og indsamlingslokaliteter for kategorien "levende fugle", der dækker over prøver indsamlet af Statens Naturhistoriske Museum (SNM), er vist på kortet. Hvert punkt repræsenterer én pool, punkterne er distribueret i koncentriske cirkler med oprindelse i centrum af disse cirkler.

Kategorien "levende fugle" omfattede 462 fugle. Ringmærkere fra Ringmærkningscentralen, Statens Naturhistoriske Museum, indsamlede kloaksvabere fra vildtlevende fugle på flere lokaliteter (figur 2). De "levende fugle" blev enten fanget og frigivet i forbindelse med ringmærkning, eller nedlagt ved jagt samme dag som prøverne blev taget.

Der blev i alt undersøgt 251 pools af kloaksvabere fra 866 fugle fordelt på 25 arter og de fleste landsdele (figur 2, tabel 2). Geografisk fordelte fuglene sig med 65 % fra Jylland og 2 % fra Hovedstadsområdet. Dermed blev målet om at få inddraget en stor andel af vilde fugle fra Jylland, og kun en mindre del fra Hovedstadsområdet, nået.

Tabel 2. Antal fugle fordelt på arter og landsdele, 2018.

Art	Jylland	Fyn	Sjælland	Hovedstadsområdet	Sum (antal fugle)
Allike			5		5
Blishøne		9		5	14
Bramgås	79		19		98
Fasan			10		10
Fjeldvåge			1		1
Grønbenet rørhøne	1	4		1	6
Gråand, levende fugle	48	42		5	95
Gråand, nedlagt fjervildt	238	69	75		382
Grågås	1		11		12
Gråkrage	1				1
Hættemåge	3	3		1	7
Knarand	1				1
Knopsvane		7	2		9
Krikand, levende fugle	139		2		141
Krikand, nedlagt	12				12
Musvåge	1				1
Måge				1	1
Pibeand	15		2		17
Sangsvane	4				4
Skeand	3				3
Skovdue			3		3
Skovsneppe	8				8
Spidsand	7				7
Spurvehøg			20		20
Stormmåge	3			1	4
Sølvmåge			1		1
Tårnfalk			3		3
Sum (antal fugle)	564	134	154	14	866

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, postnr. 3xxx, 4xxx; Fyn, postnr. 5xxx; Jylland, postnr. 6xxx, 7xxx, 8xxx, 9xxx. Fangstmetode: Nedlagt, nedlagt fjervildt fra vildthåndteringsvirksomheder; Levende, levende ved prøveudtagelse eller skudt ved jagt umiddelbart forinden.

Indsamlingen af prøver var koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenzavirus er størst i denne periode. I 2018 blev der indsamlet prøver fra 13 fugle i 1. kvartal. De var alle fra Hovedstadsområdet og negative for influenzavirus. Prøver fra de resterende fugle blev indsamlet i perioden 1. september – 13. december og fordelte sig med 182 fugle i 3. kvartal og 671 i 4. kvartal. Der blev testet i alt 866 fugle fordelt i 251 prøver, heraf var 194 pools af mere end én prøve og 57 var enkeltprøve-pools (tabel 3). De nedlagte fugle fra Flyvestationerne udgør de 10 enkeltfugle ”pools”.

Tabel 3. Oversigt over antal fugle i de testede prøver (pools), 2018.

Antal fugle pr. pool	Antal pools testet		Antal fugle
	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	
1	47	10	57
2	18	0	36
3	22	12	102
4	22	17	156
5	45	58	515
I alt	154	97	866

PCR resultater

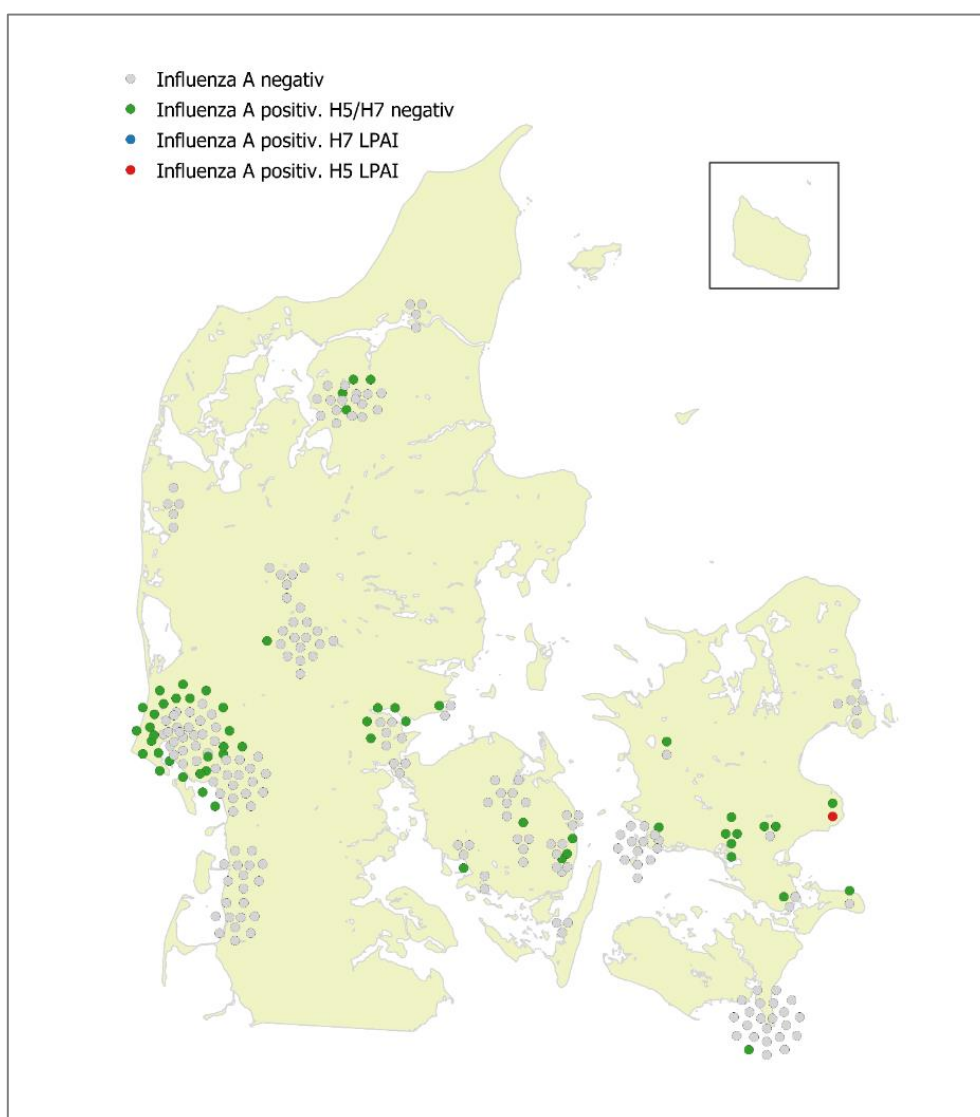
De poolede prøver blev indledningsvist testet med PCR for influenza A virus. I alt var 57 pools positive, svarende til 23 % (tabel 4). De positive pools blev testet med specifikke subtypnings PCR metoder, for om de

var H5 eller H7 subtyper. Kun én pool blev subtypet til H5 og patogenicitetsbestemt ved sekventering til LPAI H5; der var ingen HPAI H5 positive pools, og der blev ikke påvist H7 virus.

Antallet af de positive pools fordelte sig ligeligt på kategorierne "nedlagt fjervildt" og "levende fugle", men frekvensen af positive prøver var væsentlig højere for nedlagt fjervildt end for levende fugle (tabel 4). Det kan skyldes at nedlagt fjervildt næsten udelukkende består af gråænder der anses som naturlig vært for AI virus og/eller at der generelt indgår flere fugle pr. pool i denne kategori.

Godt halvdelen af de undersøgte pools bestod af prøver fra gråænder, og de bidrog med 58 % af de positive pools. Gråænder og krikænder stod tilsammen for 62 % af de testede pools, heraf var 34 % positive for influenza A virus. Dermed var 93 % af de positive pools fra gråænder eller krikænder. De øvrige influenzavirus positive pools var fra blishøne (n=1), skeand (n=1), spidsand (n=1) og spurvehøg (n=1).

Resultatet er i overensstemmelse med både europæiske (Munster et al. 2007) og danske overvågningsresultater fra tidligere år (Hjulsager et al. 2012a,b) samt den generelt anerkendte opfattelse af andefugles (primært svømmefugles) rolle som de primære bærere af AI virus (Munster et al. 2007).



Figur 3. Geografisk fordeling på postnr.-niveau af prøver indsamlet i den aktive overvågning af AI i Danmark 2018. Hvert punkt repræsenterer en pool, som er distribueret i koncentriske cirkler med oprindelse i centrum af disse cirkler.

Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Lolland, Sjælland og herunder i Hovedstadsregionen. Der blev fundet influenzavirus i pools fra næsten alle landsdele (figur 3). De fleste positive pools var fra Jylland (n=38). Frekvensen af positive pools fra Jylland og Sjælland var 25 %, mod 14 % på Fyn og 0 % i Hovedstadsområdet.

Der blev udtaget prøver i 1. kvartal og 3.-4. kvartal af 2018. Som nævnt var ingen af prøverne fra 1. kvartal positive for influenzavirus. Derimod var 44 % af pools fra 3. kvartal positive for influenzavirus (n=24), mens 17 % af pools fra 4. kvartal var positive (n=33). Andelen af pools der var positive fordelte sig tilsvarende i 2017 og 2016.

Tabel 4. PCR resultater for de testede pools fra den aktive overvågning af AI 2018.

	I alt	Levende fugle (pools)	Nedlagt fjervildt (pools)	Gråænder (pools)	Krikænder (pools)
Antal pools	251	154	97	112 (45 %)**	43 (17 %)
AI PCR positiv	57 (23 %)	30	27	33 (58 %)**	20 (35 %)
H5 LPAI	1 (0.02 %)*	0	1	1 (100 %)**	0
H7 LPAI	0	0	0	0	0

*H5/H7 resultater er angivet i % af antal positive pools; **for gråænder og krikænder er angivet % af hhv. antal pools, samt AI PCR og H5 LPAI positive pools.

Virusisolater

Hæmagglutinerende virus (virusisolater) kunne isoleres efter podning i embryonerede hønseæg fra 23 pools fra levende vilde fugle i den aktive overvågning, 17 var AI virus og 8 var avian paramyxovirus (PMV) (bilag 3). Fire H5N6 HPAI isolater blev dyrket fra organmateriale fra fire udvalgte H5N6 HPAI positive fugle fra den passive overvågning for AI virus.

Aviær influenza

Ved subtypning af AI virusisolaterne fra den aktive overvågning i vilde fugle blev der fundet virus med følgende subtyper: H1N8 (n=1), H3N2 (n=1), H3N8 (n=3), H4N6 (n=5), H6N2 (n=2), H6N6 (n=1), H8N2 (n=2), H11N2 (n=1) og H11N9 (n=1) (Bilag 3). Alle isolaterne var fra svømmeænder, og bortset fra H1N8, H6N6 og H8N2 er subtypekombinationerne tidligere påvist i Danmark (Hjulsager et al. 2012b). De nye kombinationer består imidlertid af HA og NA subtyper der er almindeligt forekommende i andre kombinationer jf. fundene i de foregående års AI vildfugle overvågningsprojekter.

Succesraten for isolation af AI virus i æg var 30 % af de PCR positive pools, hvilket er over niveauet for de seneste 4 år, hvor den gennemsnitligt lå på 21 %.

Paramyxovirus

Overvågningen var ikke rettet mod påvisning af aviær paramyxovirus (PMV), og der blev derfor ikke foretaget en systematisk screening af alle prøver for PMV. Både AI virus og PMV er imidlertid hæmagglutinerende virus, derfor testes virusisolater, der ikke kan subtypes som AI virus, rutinemæssigt for PMV-1, og i de fleste tilfælde også for de øvrige PMV typer.

Der blev påvist avirulent PMV-1 virus (n=4), PMV-4 (n=1), PMV-6 (n=1) og PMV-2/-6 (n=1), hvor det ikke kunne afgøres om virus var PMV-2 eller PMV-6 eller om der var en blanding af de 2 PMV typer (bilag 3). PMV-1 og PMV-6 er blandt de hyppigst påviste typer i de foregående år. Alle isolaterne var fra svømmeænder. Det tyder på at svømmeænderne ofte er inficerede med paramyxovirus, og ænder betragtes da også som naturlig vært for de fundne PMV typer (Alexander, 2000b). Da andefugle både betragtes som naturlig vært for AI og PMV virus, er fundet af PMV i AI overvågningsprøverne forventet.

Sammenligning med resultater fra tidligere år

Nøgletallene fra den aktive overvågning af AI i 2014-18 er angivet i tabel 5. Det var et krav at prøver der indgik i overvågningen blev modtaget indenfor 5 dage efter udtagelse. Målet på 900 fugle blev knap nået, andelen og antallet af positive pools i 2018 var på niveau med de foregående år. Successraten for isolering af virus i æg var højere end de foregående år.

Antallet og andelen af H5 positive pools var markant lavere end de foregående år. Helt usædvanligt blev der kun fundet én pool med H5 LPAI virus. Det var en pool af prøver fra 5 gråænder, der var nedlagt ved St. Heddinge på Sydøstsjælland i september måned. De tidligere år er der påvist H5 LPAI virus i op til 28 % af de influenza A virus PCR positive pools, svarende til 5 til 20 H5 LPAI positive pools. Disse har været basis for at vi har kunnet udføre en vurdering af egnetheden af de diagnostiske RT-PCR assays der anvendes til afklaring af AI mistanker (se afsnit om Molekylær karakterisering af AI virus) og fylogenetiske analyser til at belyse H5 diversiteten i danske vilde fugle. Det er uvist, om det er en tilfældighed, at der kun er påvist én H5 LPAI virus i 2018-overvågningen, men det faktum at der ikke er ændret nævneværdigt ved designet af overvågningen i forhold til de foregående år, peger i retning af en anden forklaring. Udbruddet af HPAI H5 virus i vilde fugle fra november 2016 til 2018 har været en usædvanlig hændelse, og denne kan have induceret en øget immunitet overfor H5 virus i bestanden af vilde fugle. Dette kan være en forklaring på at der ikke er H5 virusudskillelse i samme grad som tidligere, og dermed forklare at vi ikke har fundet H5 LPAI virus i samme udstrækning som sædvanligvis. En anden mulighed kunne være at cirkulerende LPAI H5 virus var muteret så de ikke kunne detekteres med de anvendte PCR subtypningsassays, men det har der ikke været forlydender om på europæisk plan og vi har endvidere testet et udvalg af prøverne en ekstra gang med H5 konv. Assay der er mindst følsomt overfor mutationer. Endvidere har vi ikke påvist H5 i prøver hvor der er anvendt alternative metoder, dyrkning og NGS sekventering, som ville forventes at kunne detektere nye varianter af H5 virus, om end disse ikke er anvendt på alle prøver.

Fuglearten/familien synes at være den afgørende faktor for sandsynligheden for indsamling af en AI virus positiv pool. Forskelle i indsamlingsstrategierne, nedlagt fjervildt kontra ringmærkning, og deraf følgende håndtering af prøverne undervejs til laboratoriet synes af mindre betydning i denne sammenhæng. De anvendte indsamlingsmetoder har suppleret hinanden, således at overvågningen har indbefattet flere forskellige arter, samtidig med at der blev påvist relativt mange AI virus.

Tabel 5. Sammenligning af AI overvågning 2014-18 i vilde fugle, aktiv overvågning. PCR screenings-resultater på primærmateriale og succesrate for dyrkning af AI virus i æg.

	2014		2015		2016		2017		2018	
	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]
Nedlagt fjervildt*	499	101	494	100	377	80	445	96	404	97
Levende fugle**	513	185	479	164	544	163	451	152	462	154
I alt	1012	286	973	264	921	243	896	248	866	251
PCR positive	-	50 (17 %)	-	72 (27 %)	-	50 (21 %)	-	73 (29 %)	-	57 (23 %)
H5 LPAI	-	5 (10 %)	-	20 (28 %)	-	12 (24 %)	-	15 (21 %)	-	1 (0.02 %)
H7 LPAI	-	3 (6 %)	-	1 (1 %)	-	1 (2 %)	-	0	-	0
AI VI positive	-	13 (26 %)	-	11 (15 %)	-	11 (22 %)	-	14 (19 %)	-	17 (30 %)

[#] Prøver er pools af 1-5 kloaksvabere udtaget fra samme art, på samme sted (postnr.) og tid. *Prøver fra nedlagt fjervildt er indsamlet på vildthåndteringsvirksomheder eller fra fugle skudt på flyvestationer. **Prøver fra Levende fugle er indsamlet via SNM og er enten levende vilde fugle genudsat efter prøveudtagelse eller nedlagt ved jagt og samlet samme dag.

Molekylær karakterisering af AI virus

H5 evaluering af diagnostiske assays

EU referencelaboratoriet har vurderet egnetheden af de diagnostiske RT-PCR assays til detektion af clade 2.3.4.4b HPAI H5 virus der cirkulerede i Europa siden oktober 2016, som værende god. I analysen indgik også det første danske virus, A/tufted duck/Denmark/17740-1/2016(H5N8). HA genet i HPAI H5N6 virus fra 2018 er tæt beslægtet med 2.3.4.4b HPAI og de anvendte H5 subtypningsassays vurderes også at have god egnethed. HPAI H5 2.3.4.4b sekvenser indgår ikke i vores egen analyse af assay fitness, som i stedet er målrettet de LPAI H5 virus, der er udbredt i de danske fuglebestande.

Der blev kun påvist H5 LPAI virus i én pool fra vilde fugle i 2018, og denne var ikke tilstrækkeligt positiv til at der kunne generes tilstrækkelig sekvens til at indgå i analysen. Der blev påvist H5 LPAI virus i en gråandebesætning og en andebesætning, og HA sekvensen fra disse virus er blevet analyseret i en assay fitness analyse for match til relevante primer- og probesekvenser for de assays der anvendes rutinemæssigt (bilag 4). Et LPAI H5 virus fra en hønsebesætning påvist i februar 2019 er inkluderet i analysen for at få flere sekvenser med i analysen. Til subtypning og patogenicitetsbestemmelse af H5 virus anvendes de EU anbefalede specifikke RT-PCR assays (Slomka et al. 2007a; Slomka et al. 2007b; Slomka et al. 2012) rutinemæssigt til AI diagnostik og overvågning på SSI og tidligere på DTU-VET.

Matrix-genet er det mest konserverede gen i influenzavirus, mens HA, inkl. H5, varierer mere pga. større mutationsrate. Man vil derfor generelt forvente et godt match mellem matrix PCR primere og probe, og dermed en sensitiv detektion af langt de fleste influenza A virus, som primært afhænger af hvor meget virus der er i den pågældende prøve. EU referencelaboratoriet har adgang til et bredt udvalg af nye influenzavirus, og hermed potentielt nye varianter der kunne tænkes at blive introduceret til Europa og dermed kompromittere den diagnostiske formåen, så de overvåger fitness af de anbefalede matrixassays. H5 har en højere mutationsrate, så for dette gen er der større sandsynlighed for at der opstår mere lokale/nationale varianter. Data fra overvågningen i vilde fugle giver normalt et godt materiale til vurdering af assay-performance overfor H5 virus under danske forhold. Dog er styrken i analysen ikke så god for 2018, da der kun blev fundet få H5 virus. For hvert RT-PCR assay blev H5 Ct værdien for hver prøve korreleret til pan influenza detektions assay resultatet ("AI-matrix" Ct-værdien). Jo større forskellen er på Ct-værdien for H5 i forhold til matrix, jo mindre sensitivt er H5 assayet overfor det pågældende virus.

For det EU anbefalede "konventionel H5 KHA" assay, der anvendes til sekventering af kløvningsstedet for patogenicitetsbestemmelse, er der i 2018 sekvenserne ét mismatch i hver af de 2 primere. Det er de samme mismatch, der er i alle sekvenserne, og de findes også i alle virus fra de tidligere år, hvoraf enkelte virus fra 2015 har yderligere 1-2 mismatches til primersekvenserne. Fitness for dette assay overfor 2018-virus må derfor forventes at være den samme som overfor de ældre H5 virus i analysen, og bedre i forhold til de 2015-virus der havde flere mismatches. Man kan overveje at opdatere dette assay til perfect match overfor 2018-virus, da samme mismatch trend nu er vist siden 2012.

For "H5" assayet, der er det EU anbefalede real-time assay til screening for H5 virus, er der 3 mismatches til den ene primer. Der ses en forskel på ca. 4 - 6 Ct-værdier mellem AI-matrix og H5 Ct-værdierne for 2018-2019 prøverne. H5 virus i tre prøver fra 2017 bliver slet ikke detekteret med dette assay (H5 Ct=0), hvilket kan forklares af mismatches til primeren i kombination med et lavt indhold af virus (AI-matrix Ct= 32, 33, 36). Situationen er den samme for virus fra øvrige år, hvor der også var mange H5 virus positive prøver, der ikke kunne detekteres med dette assay. Det EU anbefalede H5 real-time screeningsassay er dermed ikke tilstrækkeligt sensitivt overfor nuværende cirkulerende virus, til at man kan forvente, at det kan påvise H5 virus i svagt positive prøver. På denne baggrund anvender SSI og tidligere DTU-VET dette assay til screening

for H5 i kombination med et andet H5 assay, "H5CS" real-time assayet, for at opnå en bedre sensitivitet overfor cirkulerende H5 virus.

"H5CS" real-time assayet, er ikke et officielt EU anbefalet assay, men det tidligere EU referencelaboratorie i England anbefalede det som real-time assay til sekventering af H5 kløvningssstedet til patogenicitetsbestemmelse. AI-matrix og H5CS Ct-værdierne stemmer generelt bedre overens for de danske prøver fra 2017-2019 end i forhold til det andet H5 assay, der er dog også enkelte mismatches, men typisk kun til den ene primer. For prøverne fra de foregående år er der perfect match for næsten alle prøverne til både primere og probe, og forskellen i Ct til AI-matrix er typisk 0-1 Ct-værdi, eller ligefrem negativ (H5CS Ct < AI-matrix Ct). Der er således akkumuleret mismatches til primersekvenserne, og det er formodentligt det, der afspejles i den marginalt dårligere sensitivitet, der observeres overfor H5 i 2017-2018 prøverne i sammenligning med prøverne fra de tidligere år. Analysen indikerer at "H5CS" assayet er bedre egnet til sensitiv detektion af nuværende cirkulerende LPAI H5 virus, og at det er vigtigt at fortsætte overvågning af LPAI H5 virus evolutionen, med henblik på en eventuel opdatering af H5 real-time screeningsstrategien, hvis trenden fortsætter.

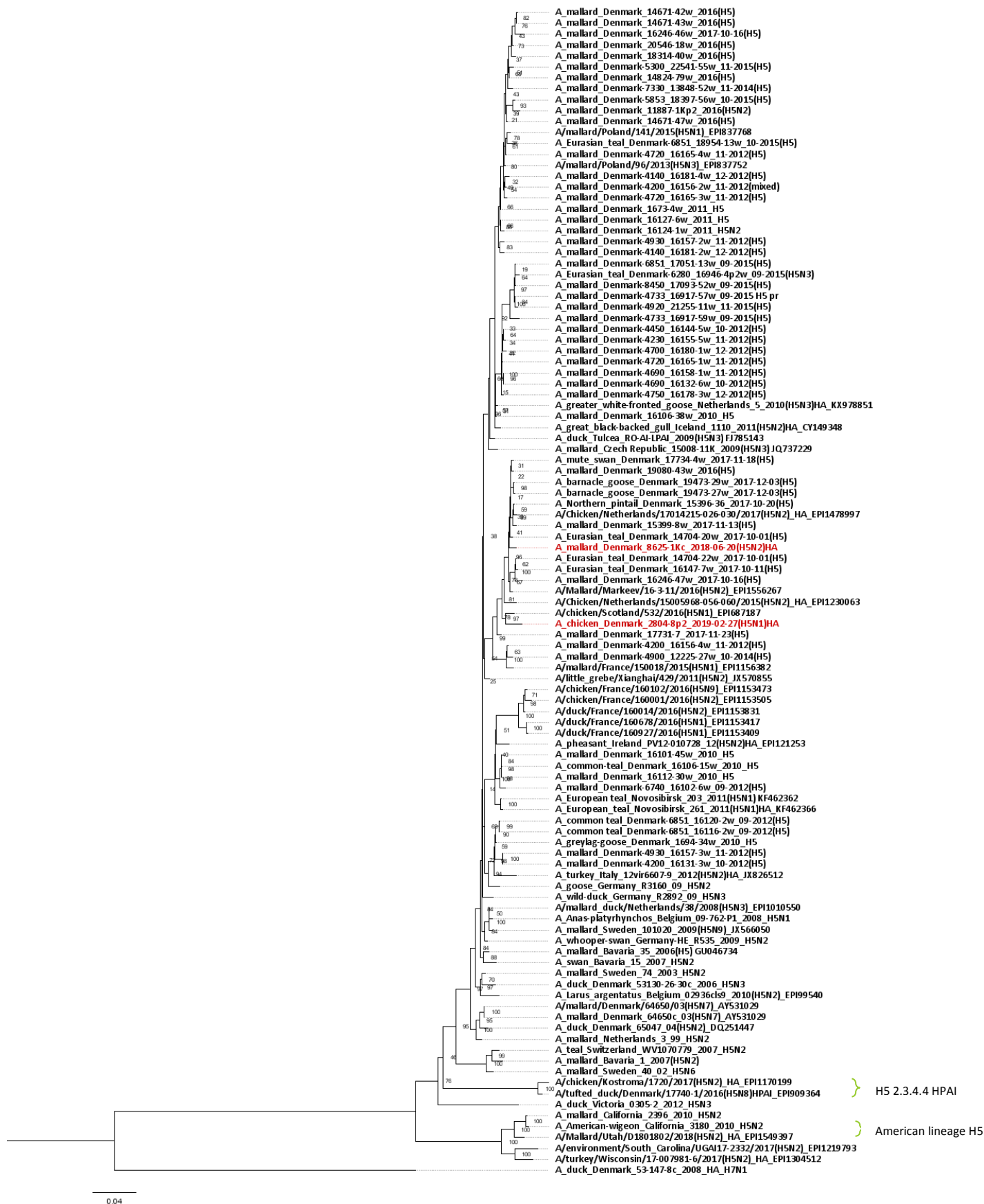
Analysen indikerer, at de assays, der anvendes til subtypning af H5, er anvendelige overfor de virus, der cirkulerer i Danmark i dag, på trods af den drift i sekvenserne, som afsløres af fuldlængde HA sekventeringen. Men analysen viste også, at det er nødvendigt med en strategi, der involverer samtidig anvendelse af både "H5" og "H5CS" real-time assays for at opnå en sensitiv påvisning af LPAI H5 virus. Da de danske virus jo i første omgang er fanget af disse assay, er der naturligvis en bias i resultatet. Der er dog ikke fundet yderligere H5 virus ved sekventering af isolater, som er en alternativ metode der er uafhængig af de primere og prober der indgår i H5 og H5CS assays.

Det kan være umuligt at designe et enkelt assay bestående af to primere og en probe, som sensitivt kan detektere alle varianter af H5. Det er derfor relevant at anvende flere assays i rutinediagnostikken for at opnå en bedre sensitivitet, ligesom det gøres i dag på SSI, hvor vi rutinemæssigt altid anvender både "H5" og "H5CS" samtidigt til subtypning af H5. Fitness-analysen understreger vigtigheden af, at der foretages en løbende monitorering af drift i sekvenserne, så de anvendte assays kan opdateres ved behov. Da EU referencelaboratoriet sjældent har adgang til LPAI sekvenser fra vilde fugle i real-time, og da der endvidere kun sker en meget begrænset offentliggørelse af fund af H5/H7 LPAI virus i vilde fugle, kan EU referencelaboratoriet ikke udføre en fyldestgørende analyse af driften i H5/H7 virus. Det er derfor nødvendigt at vi holder øje med situationen under danske forhold med en fortsat overvågning af driften i H5/H7 virus, for på den måde at være i stand til at påvise H5/H7 virus med høj sensitivitet når der opstår mistanke om AI virus i danske fjerkræbesætninger.

H5 LPAI diversitet

Der blev kun påvist én prøve med H5 LPAI virus, og den var for svag positiv til at der kunne udføres HA fuldlængde sekventering til fylogenetisk analyse. Der er påvist H5 LPAI virus, A/mallard/Denmark/8625-1kc/2018-06-20(H5N2,) i en gråandebesætning i 2018 og HA sekvensen af denne er sammenlignet med H5 LPAI virus sekvenser fra danske og udenlandske virus fra tidligere år, både fra vilde fugle og fjerkræ, og med en sekvens fra H5 LPAI udbrud i høns i 2019, A/chicken/Denmark/2804-8p2/2019-02-27(H5N1), (figur 5).

Den fylogenetiske analyse viser, at H5 generne fra prøverne fra de to udbrud er tæt beslægtet med danske og europæiske virus fra vilde fugle og fjerkræ. Tættest slægtskab synes der at være til virus fra vilde fugle i 2017 (figur 5).



Figur 4. Fylogenetisk analyse af danske LPAI H5 virus fra vilde fugle og fjerkræ. Sekvenser fra H5 virus fra Danmark 2018-19 er med rød tekst. Træet er baseret på ca. 1500 bp fragment fra HA-genet. HPAI angiver højpatogen AI. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ.

H5 HPAI diversitet

Der er udført fuldlængde sekventering af HA genet fra 19 HPAI H5N6 virus fra vilde fugle. Molekylærfylogenetisk analyse (figur 6) viste, at disse virus var nært beslægtede med hinanden og med samtidige HPAI H5 clade 2.2.4.4b virus fra andre europæiske lande. Virus adskilte sig genetisk fra H5N6 virus, der har smittet mennesker i Asien, og fra HPAI H5N1 subtype virus, der var årsag til udbrud i vilde fugle i 2006. Fuldgenom sekvensanalyse af 15 danske HPAI H5N6 subtype virus indikerer, at det er det samme HPAI virus der har cirkuleret i vilde fugle i Danmark i 2018 (Hjulsager et al. 2019).



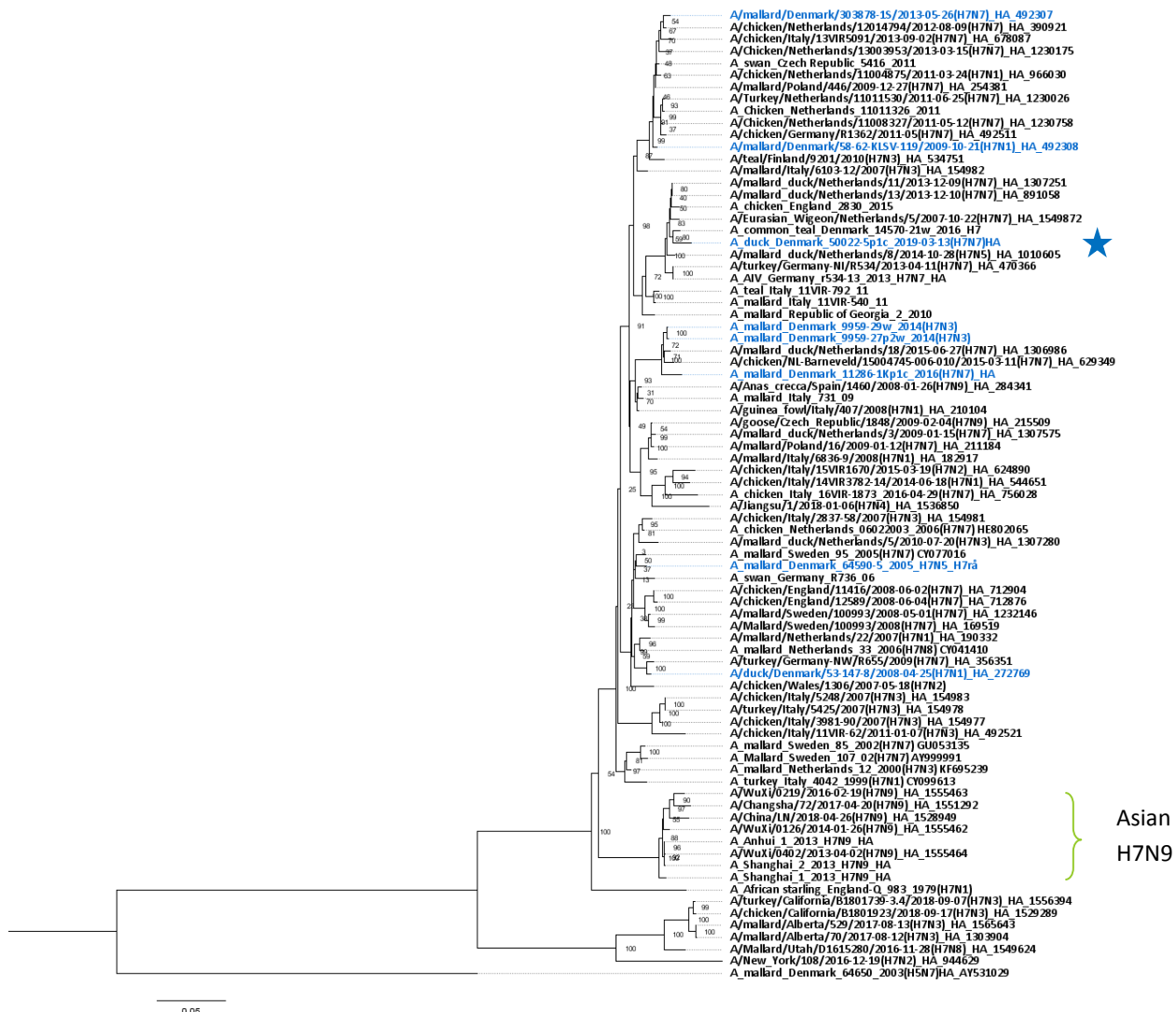
Figur 5. Fylogenetisk analyse af danske fuldlængde HPAI H5 gensekvenser fra vilde fugle. Sekvenser af HA-genet fra et repræsentativt udvalg af H5N6 HPAI virus fra vilde fugle i Danmark 2018 er fremhævet med blå tekst. Træet er baseret på 1697 bp fragmenter fra HA-genet.

H7 diversitet

Der er ikke påvist H7 virus i vilde fugle i 2017 eller 2018. De foregående år er der typisk fundet ganske få, ofte bare én, H7 LPAI viruspositiv prøve i vilde fugle, så på den baggrund er det ikke overraskende at der ikke er påvist H7 virus i 2018. Fylogenetisk analyse af de danske H7 virus viser at ikke er nært beslægtede med den humanpatogene H7N9 virus variant fra Asien, der kan smitte fra fugle til mennesker. Danske LPAI H7 virus fundet i vilde fugle og fjerkræ de senere år er imidlertid nært beslægtede med hinanden og med LPAI H7 virus fra øvrige Europa (figur 7).

LPAI H7 virus påvises med meget lavere frekvens end H5 LPAI virus i vilde fugle i Danmark. Ikke desto mindre er det netop H7 LPAI virus, der har givet anledning til flest udbrud i fjerkræ de senere år, senest i 2016 og

2019, og før det i 2013, 2010 og 2008. Der sker tilsyneladende en udveksling af virus mellem vilde fugle og fjerkræ, idet de virus, der bliver fundet i fjerkræ, er nært beslægtede med virus fra vilde fugle i Danmark. Fylogenetisk analyse af tilgængelige danske H7 virus HA sekvenser indikerer et tæt slægtskab mellem virus i vilde fugle og virus fra udbrud i fjerkræ, i overensstemmelse med teorien om at virus introduceres til fjerkræ via vilde fugle.



Figur 6. Fylogenetisk analyse af danske LPAI H7 gener fra vilde fugle og fjerkræ. H7 virus fra Danmark er med blå tekst. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ. Neighbour-Joining træ baseret på 1612 bp HA-gen sekvenser. ★ = LPAI H7N7 fra udbrud af AI i farmede gråænder 2019.

H9 virus

Der er en stigende bevågenhed overfor AI virus med H9 subtypen, da denne subtype har opnået enzootisk udbredelse i flere dele af verden, herunder Kina og Mellemøsten, og også optræder i Europa. Der er ligeledes rapporter om, at H9N2 virus kan være mere patogene i fjerkræ end andre LPAI, og så har de også vist zoonotisk potentiale både ved smitte af H9N2 virus til mennesker, men især fordi H9N2 virus også menes at have doneret en del af generne til den humanpatogene LPAI Asian H7N9 virus, samt til HPAI H5N8.

Alle AI virusisolater fra overvågningen i vilde fugle 2018 er subtypet ved sekventering af HA og NA generne. Ingen AI virus isolater var H9 subtype (bilag 3). Baseret på HA sekvenserne, er de danske H9N2 virus, der

tidligere er påvist, nærmest beslægtede med dem, der er fundet i vilde fugle i Skandinavien og landene omkring os. De er ikke tæt beslægtet med enzootisk forekommende H9N2 fra Asien.

AI virus i fjerkræ

Der har været udbrud af LPAI H5 virus i to danske fjerkræbesætninger i 2018, der er intet der tyder på at disse var relaterede. Desuden er der påvist influenza A virus andre end H5/H7 i en rutine overvågningsindsendelse, i en kontaktbesætning til en H5 LPAI smittet besætning og i to AI mistanker sfa. påvisning af H5/H7 antistoffer i rutine overvågningsprøver.

I den virologiske screening af rutine overvågningsprøver fra fjervildtopdræt i 2018 blev i alt undersøgt 268 indsendelser (tabel 7). Hver indsendelse blev undersøgt for AI virus med PCR på en pool af kloaksvabere og på en pool af trachealsvabere fra 10 kadavere indsendt til DTU-VET. Formålet var at påvise LPAI H5/H7 virus, for at undgå udslip til den vilde fauna og for at undgå at disse skal udvikle sig til HPAI. Der blev påvist Influenza A virus i to indsendelser fra gråandeopdræt. Virus fra det ene opdræt blev subtypet til H5N2 LPAI (besætning A, tabel 8) og virus fra det andet opdræt blev subtypet til H1N3.

Tabel 7. Oversigt over antal indsendelser til den virologiske overvågning af opdrættet fjervildt i perioden 2006-2018. Modificeret fra Hjulsager et al. 2012b.

Indsendelser	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018
Antal	ca. 250	395	362	333	307	258	272	267	255	256	260	274	268
AI virus positive	7	2	4	7	0	4	0	3	6	2	4	2	2
AI H5/H7* positive	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1

*alle er LPAI.

Der har været 18 AI laboratoriemistanker sfa. påvisning af H5 og/eller H7 antistoffer i rutineovervågningsprøver med HI-test ved reaktion med H5/H7 referenceantigener. Disse fordelte sig over hele året: januar (n=2), februar (n=1), marts (n=2), maj (n=1), juni 8 (n=2), september (n=2), december (n=2). Flere af de seropositive indsendere var gengangere, dvs. der var gentagne påvisninger af H5/H7 antistoffer over tid i den samme besætning. Disse gentagne påvisninger kan skyldes persisterende antistoffer, hvis det er den samme flok af individer der testes gentagne gange, eller introduktion af nye virus, som kan inducere dannelsen af nye antistoffer. Hvorvidt der er cirkulerende virus i flokken afgøres ved at teste for virus med PCR på svaberprøver, i henhold til den gængse opfølgende mistanke procedure ved H5/H7 antistofpåvisning.

De 18 serologiske mistanker fordelte sig på 9 besætninger med hhv. 6 (n=1), 3 (n=1), 2 (n=2) eller 1 (n=5) indsendelser. Besætningen med 6 seropositive indsendelser havde indsendt de seropositive rutineovervågningsblodprøver i perioden 10. januar til 14. december og prøverne repræsenterede minimum 2 forskellige huse. De to indsendere med hver to seropositive indsendelser havde indsendt prøverne i hhv. januar+marts og september+december.

Der blev påvist både H5 LPAI virus og influenza A virus, der ikke var H5/H7 subtype, i ænder i opfølgende svaberprøver til en af de serologiske mistanker (besætning C, tabel 8). Endvidere blev der påvist influenzavirus, der ikke var H5/H7 subtype, i både ænder og fasaner i en besætning (besætning D, tabel 8), i opfølgende svaberprøver til en seropositiv indsendelse.

Yderligere blev der påvist influenzavirus, men ikke H5 subtype, i to besætninger sfa. mistanke om AI pga. potentiel kontakt til LPAI H5 smittede besætninger.

Tabel 8. AI virus positive indsendelser fra fjerkræbesætninger i 2018.

Besætnings-ID	Indsendelse	Udtagelsesdato for svaberprøver	Fugleart	Indsendelsesårsag	Virus	AI positiv prøve
A	18-7747	06.06.2018	Gråand	Fjervildt	H1N3	K
B	18-8625	20.06.2018*	Gråand	Fjervildt	H5N2 LPAI	K
C	18-6504, hold 1 18-6504, hold 2	03.05.2018	Ænder	Antistofpåvisning	H5 LPAI H1 Ikke H5/H7	S S,K
D	18-6505	04.05.2019	Ænder Fasan	Antistofpåvisning	Ikke H5/H7 Ikke H5/H7	K K
E	18-9292	28.06.2018	Gråand	Kontakt til B	Ikke H5/H7	S,K
F	18-6602	06.05.2018	Ænder	Kontakt til C	Ikke H5/H7	S,K

K=kloaksvaber; S=trachealsvaber/svælgsvaber (der er undersøgt både K og S fra hver indsendelse).

Indsendelsesårsag, fjervildt er fra den virologiske overvågning i fjervildtopdræt; Antistofpåvisning er i forbindelse med den serologiske AI fjerkræovervågning. *modtagelsesdato, da udtagelsesdato ikke var oplyst.

I forhold til 2017 og 2016, hvor der var hhv. 5 og 10 seropositive rutineovervågningsindsendelser, er 18 seropositive indsendelser en markant stigning, som dog i hvert tilfælde til dels, kan skyldes flere seropositive gengangere. Viruspåvisninger i de seropositive indsendelser i 2018 var på samme niveau som tidligere, med hhv. 2 og 3 tilfælde i 2017 og 2016, respektivt.

Referencer

- Alexander, D.J., 2007. An Overview of the Epidemiology of Avian Influenza. *Vaccine* 25, 5637-5644.
- Alexander, D.J., 2000a. A Review of Avian Influenza in Different Bird Species. *Vet. Microbiol.* 74, 3-13.
- Alexander, D.J., 2000b. Newcastle disease and other avian paramyxoviruses. *Rev. sci. tech. off. int. Epiz.*, 19 (2), 443-462.
- Arnold, M., Slomka, M., Breed, A., Hjulsager, C., Prits-Verschuren, S., Venema-Kemper, S., Bouwstra, R., Trebbien, R., Zohari, S., Ceeraz, V., Larsen, L., Manvell, R., Koch, G., Brown, I., 2017. Evaluation of ELISA and haemagglutination inhibition as screening tests in serosurveillance for H5/H7 avian influenza in commercial chicken flocks. *Epidemiology & Infection*, accepted.
- Banks, J., Speidel, E.S., Moore, E., Plowright, L., Piccirillo, A., Capua, I., Cordioli, P., Fioretti, A., Alexander, D.J., 2001. Changes in the Haemagglutinin and the Neuraminidase Genes Prior to the Emergence of Highly Pathogenic H7N1 Avian Influenza Viruses in Italy. *Arch. Virol.* 146, 963-973.
- Capua, I., Alexander, D.J., 2007. Animal and Human Health Implications of Avian Influenza Infections. *Biosci. Rep.* 27, 359-372.
- Cattoli, G., Fusaro, A., Monne, I., Capua, I., 2009. H5N1 Virus Evolution in Europe—An Updated Overview. *Viruses* 2009, 1, 1351-1363. *Viruses* 1, 1351-1363.
- DOF, 2018. GPS-havørnen Elna døde af fugleinfluenza. https://www.dof.dk/om-dof/nyheder?nyhed_id=1636
- Dugan, V.G., Chen, R., Spiro, D.J., Sengamalay, N., Zaborsky, J., et al. 2008. The Evolutionary Genetics and Emergence of Avian Influenza Viruses in Wild Birds. *PLoS Pathog* 4(5): e1000076.
- Fouchier, R.A., Munster, V., Wallensten, A., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Smith, D., Rimmelswaan, G.F., Olsen, B., Osterhaus, A.D., 2005. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) obtained from Black-Headed Gulls. *J. Virol.* 79, 2814-2822.
- Fuller, C.M., Collins, M.S., Alexander, D.J., 2009. Development of a real-time reverse-transcription PCR for the detection and simultaneous pathotyping of Newcastle disease virus isolates using a novel probe. *Arch. Virol.* 154, 929-937.
- Hatta, M., Gao, P., Halfmann, P., Kawaoka, Y., 2001. Molecular Basis for High Virulence of Hong Kong H5N1 Influenza A Viruses. *Science* 293, 1840-1842.
- Hjulsager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Handberg, K.J., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Baroch, J.A., DeLiberto, T.J., Larsen, L.E., Jørgensen, P.H., 2012a. Surveillance for Avian Influenza Viruses in Wild Birds in Denmark and Greenland, 2007-10. *Avian Dis.* 56, 992-998.
- Hjulsager, C.K., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., Therkildsen, O.R., Madsen, J.J., Thorup, K., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., 2012b. Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2003-2011. Rapport, 2.udgave pr. 10, juni 2014.
- Hjulsager, C.K., Krog, J.S., Breum, S.Ø., Trebbien, R., Larsen, L.E., 2013. Molekylær karakterisering af influenzavirus fra vilde fugle i Danmark i 2012. Rapport, 31.12.2013..
- Hjulsager, C.K., Gorm, A., Krog, J.S., Larsen, L.E., 2019. Molecular characterization of HPAI H5N6 in wild birds in Denmark. In preparation.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R. 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virology* 146, 2275-2289.

- Keawcharoen, J., van Riel, D., van Amerongen, G., Bestebroer, T., Beyer, W.E., van Lavieren, R., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Kuiken, T., 2008. Wild Ducks as Long-Distance Vectors of Highly Pathogenic Avian Influenza Virus (H5N1). *Emerg. Infect. Dis.* 14, 600-607.
- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenstrom, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A., Fouchier, R., 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLoS Pathog* 3, 630-638.
- Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2009. Avian Influenza Virus: Of Virus and Bird Ecology. *Vaccine* 27, 6340-6344.
- Sims, L., Khomenko, S., Kamata, A., Belot, G., Bastard, J., Palamara, E., Bruni, M., von Dobschuetz, S., Dauphin, G., Raizman, E., Lubroth, J., 2016. H5N8 highly pathogenic avian influenza (HPAI) of clade 2.3.4.4 detected through surveillance of wild migratory birds in the Tyva Republic, the Russian Federation – potential for international spread. *Empres watch* 35, 1-8.
- Slomka, M.J., Coward, V.J., Banks, J., Löndt, B.Z., Brown, I.H., Voermans, J., Koch, G., Handberg, K.J., Jørgensen, P.H., Cherbonnel-Pansart, M., Jestin, V., Cattoli, G., Capua, I., Ejdersund, A., Thorén, P., Czifra, G., 2007a. Identification of Sensitive and Specific Avian Influenza Polymerase Chain Reaction Methods Through Blind Ring Trials Organized in the European Union. *Avian Dis.* 51, 227-234.
- Slomka, M.J., Pavlidis, T., Banks, J., Shell, W., McNally, A., Essen, S., Brown, I.H., 2007b. Validated H5 Eurasian real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction and its application in H5N1 outbreaks in 2005-2006. *Avian Dis.* 51, 373-377.
- Slomka, M.J., To, T.L., Tong, H.H., Coward, V.J., Hanna, A., Shell, W., Pavlidis, T., Densham, A.L.E., Kargiolakis, G., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2012. Challenges for accurate and prompt molecular diagnosis of clades of highly pathogenic avian influenza H5N1 viruses emerging in Vietnam. *Avian Pathol.* 41, 177-193.
- Slomka, M.J., Hanna, A., Mahmooda, S., Govil, J., Krill, D., Manvell, R.J., Shell, W., Arnold, M.E., Banks, J., Brown, I.H., 2013. Phylogenetic and molecular characteristics of Eurasian H9 avian influenza viruses and their detection by two different H9-specific RealTime reverse transcriptase polymerase chain reaction tests. *Vet. Microbiol.* 162, 530-542.
- Stech, O., Veits, J., Weber, S., Deckers, D., Schröder, D., Vahlenkamp, T.W., Breithaupt, A., Teifke, J., Mettenleiter, T.C., Stech, J., 2009. Acquisition of a Polybasic Hemagglutinin Cleavage Site by a Low-Pathogenic Avian Influenza Virus is Not Sufficient for Immediate Transformation into a Highly Pathogenic Strain. *J. Virol.* 83, 5864-5868.
- Verhagen, J.H., Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2011. 28 - Ecology and Evolution of Avian Influenza Viruses. *Genetics and Evolution of Infectious Disease*. Elsevier, London, pp. 729-749.
- WHO No. 707, 2019. WHO Avian influenza weekly update Number 707, 20. september 2019.
https://www.who.int/docs/default-source/wpro---documents/emergency/surveillance/avian-influenza/ai-20190920.pdf?sfvrsn=30d65594_36
- Yang, J.-R., Liu, M.-S., 2017. Human infection caused by an avian influenza A (H7N9) virus with a polybasic cleavage site in Taiwan, 2017. *J. Formosan Med. Ass.* 116, 210-212.
- Zhou, B., Donnelly, M.E., Scholes, D.T., George, K.St., Hatta, M., Kawaoka, Y., Wentworth, D.E., 2009. Single-Reaction Genomic Amplification Accelerates Sequencing and Vaccine Production for Classical and Swine Origin Human Influenza A Viruses. *J. Virol.* 83 (19), 10309-10313.

Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning

AI 2018 – passiv overvågning

Kategori	Tilstand	Art	VET sagsnr.	Fundsted (Kommune)	Indsamlingsdato	Resultat
	Død	Musvåge	18-04238-01	Thisted	01-02-2018	Negativ
	Død	Havørn	18-05921-01	Guldborgsund	12-02-2018	H5N6 HPAI
	Død	Havørn	18-03073-01	Slagelse	13-02-2018	H5N6 HPAI
	Død	Musvåge	18-02837-01	Greve	18-02-2018	Negativ
	Død	Musvåge	18-03567-01	Slagelse	26-02-2018	Negativ
FA-04159	Død	Musvåge	18-03562-01	Herning	05-03-2018	Negativ
FA-04140	Død	Fiskehejre	18-03566-01	Tønder	05-03-2018	Negativ
FA-04151	Død	Musvåge	18-03563-01	Hillerød	06-03-2018	Negativ
FA-04152	Død	Musvåge	18-03565-01	Holbæk	06-03-2018	Negativ
FA-04153	Død	Musvåge	18-03560-01	Lyngby-Taarbæk	06-03-2018	Negativ
FA-04156	Død	Rørdrum	18-03561-01	Slagelse	06-03-2018	Negativ
FA-04158	Død	Fiskehejre	18-03564-01	Slagelse	06-03-2018	Negativ
	Død	Stor Hornugle	18-04239-01	Thisted	06-03-2018	Negativ
FA-04161	Død	Musvåge	18-03682-01	Faaborg-Midtfyn	08-03-2018	Negativ
FA-04178	Død	Musvåge	18-03683-01	Haderslev	08-03-2018	Negativ
FA-04179	Død	Musvåge	18-03681-01	Syddjurs	08-03-2018	Negativ
	Død	Musvåge	18-04110-01	Aabenraa	12-03-2018	Negativ
FA-04180	Død	Tårnfalk	18-04109-01	Vordingborg	13-03-2018	Negativ
	Død	Havørn	18-04241-01	Thisted	14-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04194	Død	Musvåge	18-04236-01	Guldborgsund	15-03-2018	Negativ
FA-04195	Død	Knopsvane	18-04243-01	Guldborgsund	15-03-2018	Negativ
FA-04196	Død	Fiskehejre	18-04237-01	Lolland	15-03-2018	Negativ
	Død	Musvåge	18-04233-01	Stevns	15-03-2018	Negativ
FA-04199	Død	Musvåge	18-04232-01	Fredensborg	16-03-2018	Negativ
FA-04197	Død	Havørn	18-04240-01	Lolland	16-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04200	Død	Havørn	18-04242-01	Thisted	16-03-2018	H5N6 HPAI
FA-02554	Død	Musvåge	18-04229-01	Silkeborg	19-03-2018	Negativ
FA-04202	Død	Musvåge	18-04235-01	Svendborg	19-03-2018	Negativ
FA-04206	Død	Musvåge	18-04231-01	Faxe	20-03-2018	Negativ
	Død	Musvåge	18-04234-01	Stevns	20-03-2018	Negativ
FA-04207	Død	Musvåge	18-04230-01	Vejle	20-03-2018	Negativ
	Død	Musvåge	18-04324-01	Aalborg	20-03-2018	Negativ
FA-04208	Død	Musvåge	18-04325-01	Gribskov	21-03-2018	Negativ
	Død	Havørn	18-04227-01	Næstved	21-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04209	Død	Musvåge	18-04326-01	Syddjurs	21-03-2018	Negativ
FA-04210	Død	Musvåge	18-04323-01	Aalborg	21-03-2018	Negativ
FA-04211	Død	Fiskehejre	18-04327-01	Helsingør	22-03-2018	Negativ
FA-04213	Død	Musvåge	18-04658-01	Odense	22-03-2018	Negativ
FA-04212	Død	Musvåge	18-04659-01	Svendborg	22-03-2018	Negativ
FA-04221	Død	Musvåge	18-05462-01	Bornholm	26-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04219	Død	Musvåge	18-04660-01	Faaborg-Midtfyn	26-03-2018	Negativ
FA-04220	Død	Fiskehejre	18-04643-01	Helsingør	26-03-2018	Negativ
FA-04229	Død	Sølvmåge	18-04653-01	Holbæk	26-03-2018	Negativ
FA-04222	Død	Tårnfalk	18-04654-01	Køge	26-03-2018	Negativ
	Død	Hættemåge	18-04663-01	Slagelse	26-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04232	Død	Musvåge	18-04655-01	Vordingborg	26-03-2018	Negativ
FA-04216	Død	Knopsvane	18-06224-01	Aalborg	26-03-2018	Negativ
FA-04217	Død	Musvåge	18-06225-01	Aalborg	26-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04244	Død	Knopsvane	18-04905-01	Guldborgsund	27-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04237	Død	Musvåge	18-04656-01	Hedensted	27-03-2018	Negativ
FA-04236	Død	Musvåge	18-04644-01	Kolding	27-03-2018	Negativ
FA-04245	Død	Havørn	18-04904-01	Lejre	27-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04233	Død	Skarv	18-04901-01	Lolland	27-03-2018	Negativ
FA-04234	Død	Musvåge	18-04645-01	Mariagerfjord	27-03-2018	Negativ
	Død	Havørn	18-07297-01	Næstved	27-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04241	Død	Skarv	18-04661-01	Slagelse	27-03-2018	H5N6 HPAI
FA-00001	Død	Sølvmåge	18-04662-01	Slagelse	27-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04246	Død	Havørn	18-04903-01	Slagelse	27-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04235	Død	Musvåge	18-04652-01	Sorø	27-03-2018	Negativ
FA-04247	Død	Musvåge	18-04657-01	Slagelse	28-03-2018	Negativ
FA-04248	Død	Musvåge	18-04664-01	Vejle	28-03-2018	Negativ
FA-04251	Død	Musvåge	18-03568-01	Aalborg	28-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04250	Død	Gråkrage	18-04646-01	Aalborg	28-03-2018	H5N6 HPAI
FA-04252	Død	Gråkrage	18-04647-01	Aalborg	28-03-2018	H5N6 HPAI
	Død	Musvåge	18-05463-01	Tårnby	01-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04260	Død	Musvåge	18-04921-01	Kalundborg	03-04-2018	H5N6 HPAI

FA-04259	Død	Musvåge	18-04922-01	Kalundborg	03-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04253	Død	Musvåge	18-04895-01	Silkeborg	03-04-2018	Negativ
FA-04254	Død	Musvåge	18-04893-01	Skanderborg	03-04-2018	Negativ
FA-04249	Død	Musvåge	18-04894-01	Slagelse	03-04-2018	Negativ
FA-04255	Død	Havørn	18-04896-01	Slagelse	03-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04256	Død	Havørn	18-04897-01	Slagelse	03-04-2018	H5N6 HPAI
	Død	Natugle	18-04902-01	Favrskov	05-04-2018	Negativ
FA-04263	Død	Musvåge	18-05464-01	Favrskov	09-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04266	Død	Musvåge	18-05465-01	Jammerbugt	11-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04267	Død	Musvåge	18-04898-01	Faxe	12-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04268	Død	Knopsvane	18-04906-01	Faaborg-Midtfyn	12-04-2018	H5N6 HPAI
	Død	Havørn	18-07296-01	Kerteminde	12-04-2018	Negativ
FA-04269	Død	Musvåge	18-04899-01	Faaborg-Midtfyn	13-04-2018	Negativ
FA-04272	Død	Musvåge	18-04907-01	Sønderborg	17-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04271	Død	Musvåge	18-05667-01	Aarhus	17-04-2018	H5N6 HPAI
FA-04275	Død	Hættemåge	18-05927-01	Tønder	19-04-2018	Negativ
FA-04279	Død	Grågås	18-05933-01	Ringsted	24-04-2018	Negativ
	Død	Edderfugl	18-06850-01	Esbjerg	09-05-2018	Negativ
	Død	Knopsvane	18-07298-01	Tårnby	22-05-2018	Negativ
FA-04282	Død	Edderfugl	18-07497-01	Kalundborg	28-05-2018	Negativ
FA-04288	Død	Gråand	18-09253-01	Guldborgsund	03-07-2018	Negativ
FA-04289	Død	Musvåge	18-09884-01	Gribskov	09-07-2018	Negativ
FA-04290	Død	Edderfugl	18-09885-01	Lolland	11-07-2018	H5N6 HPAI
FA-04296	Død	Fasan	18-10750-01	Kalundborg	03-08-2018	Negativ
FA-04297	Død	Fasan	18-10751-01	Kalundborg	03-08-2018	Negativ
FA-04298	Død	Fasan	18-10752-01	Kalundborg	03-08-2018	Negativ
FA-04299	Død	Fasan	18-10753-01	Kalundborg	03-08-2018	Negativ
FA-04300	Død	Fasan	18-10754-01	Kalundborg	03-08-2018	Negativ
	Død	Knopsvane	18-12099-01	Guldborgsund	07-08-2018	Negativ
FA-04301	Død	Tårnfalk	18-10767-01	Kolding	07-08-2018	Negativ
FA-04302	Død	Knopsvane	18-10771-01	Slagelse	10-08-2018	H5N6 HPAI
FA-04321	Død	Skarv	18-11537-01	Odsherred	15-08-2018	Negativ
	Død	Fiskeørn	18-12471-01	Vejle	23-08-2018	Negativ
FA-04331	Død	Knopsvane	18-12100-01	Guldborgsund	27-08-2018	AI, ikke H5/H7
FA-04332	Død	Knopsvane	18-12101-01	Guldborgsund	27-08-2018	AI, ikke H5/H7
FA-04330	Død	Knopsvane	18-12102-01	Guldborgsund	27-08-2018	AI, ikke H5/H7
FA-04329	Død	Knopsvane	18-12103-01	Guldborgsund	27-08-2018	AI, ikke H5/H7
	Død	Gråand	18-12106-01	Slagelse	27-08-2018	H5N6 HPAI
	Død	Gråand	18-12106-02	Slagelse	27-08-2018	H5N6 HPAI
	Død	Fasan	18-12106-03	Slagelse	27-08-2018	H5N6 HPAI
	Død	Fasan	18-12106-04	Slagelse	27-08-2018	H5N6 HPAI
FA-04339	Død	Grågås	18-12104-01	Faxe	28-08-2018	Negativ
FA-04363	Død	Edderfugl	18-12292-01	Guldborgsund	03-09-2018	H5N6 HPAI
FA-04362	Død	Knopsvane	18-12293-01	Guldborgsund	03-09-2018	H5N6 HPAI
FA-04360	Død	Knopsvane	18-12230-01	Middelfart	03-09-2018	Negativ
FA-04400	Død	Grågås	18-12294-01	Lolland	05-09-2018	H5N6 HPAI
	Død	Havørn	18-13331-01	Silkeborg	06-09-2018	Negativ
FA-04417	Død	Knopsvane	18-12472-01	Lolland	10-09-2018	Negativ
FA-04416	Død	Sølvmåge	18-12473-01	Varde	11-09-2018	Negativ
FA-04418	Død	Fiskehejre	18-12482-01	Vejle	17-09-2018	Negativ
	Død	Fasan	18-12985-01	Slagelse	19-09-2018	H5N6 HPAI
	Død	Fasan	18-12985-02	Slagelse	19-09-2018	H5N6 HPAI
	Død	Fasan	18-12985-03	Slagelse	19-09-2018	H5N6 HPAI
FA-04421	Død	Sølvmåge	18-13332-01	Faxe	24-09-2018	Negativ
FA-04420	Død	Slørugle	18-13333-01	Ringkøbing-Skjern	24-09-2018	Negativ
FA-04423	Død	Tårnfalk	18-13347-01	Dragør	26-09-2018	Negativ
FA-04425	Død	Sølvmåge	18-13361-01	Køge	05-10-2018	Negativ
FA-04430	Død	Husskade	18-14315-01	København	15-10-2018	Negativ
	Død	Skarv	18-14670-01	Skive	15-10-2018	Negativ
	Død	Skarv	18-14670-02	Skive	15-10-2018	Negativ
	Død	Skarv	18-14670-03	Skive	15-10-2018	Negativ
	Død	Skarv	18-14670-04	Skive	15-10-2018	Negativ
FA-04432	Død	Fiskehejre	18-14316-01	Vejen	16-10-2018	Negativ
FA-04433	Død	Tårnfalk	18-14657-01	Horsens	22-10-2018	Negativ
FA-04437	Død	Knopsvane	18-14683-01	Guldborgsund	25-10-2018	Negativ
FA-04438	Død	Musvåge	18-14682-01	Sorø	26-10-2018	Negativ
FA-04439	Død	Sølvmåge	18-14681-01	Holbæk	31-10-2018	Negativ
FA-04440	Død	Musvåge	18-15132-01	Tønder	05-11-2018	Negativ
FA-04446	Død	Bramgås	18-15942-01	Slagelse	12-11-2018	Negativ
FA-04445	Død	Bramgås	18-15942-02	Slagelse	12-11-2018	Negativ
FA-04448	Død	Bramgås	18-15942-03	Slagelse	12-11-2018	Negativ
FA-04447	Død	Bramgås	18-15942-04	Slagelse	12-11-2018	Negativ
FA-04449	Død	Skovsneppe	18-15969-01	Odense	19-11-2018	Negativ

	Død	Kongeørn	18-16679-01	Aalborg	20-11-2018	Negativ
FA-04460	Død	Musvåge	18-16585-01	Guldborgsund	26-11-2018	Negativ
FA-04461	Død	Musvåge	18-16586-01	Haderslev	26-11-2018	Negativ
FA-04463	Død	Gråand	18-17783-01	Sønderborg	17-12-2018	Negativ
FA-04465	Død	Musvåge	18-17782-01	Holbæk	18-12-2018	Negativ
FA-04466	Død	Musvåge	18-17452-01	Assens	19-12-2018	Negativ
FA-04467	Død	Knopsvane	18-17453-01	Vordingborg	20-12-2018	Negativ
	Død	Havørn	19-00429-01	Næstved	22-12-2018	H5N6 HPAI
	Død	Havørn	19-00810-01	Tønder	23-12-2018	Negativ
Ialt		148				42 H5N6 HPAI

Kategori: Fugle med mistanke om AI indsendt af FVST er angivet med FA-nr. Øvrige fugle er indsendt af FVST eller af borgere i regi af Center for Vildtsundhed, disse kan også være indsendt med mistanke om AI.

Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning

AI 2018 – aktiv overvågning

Kvartal	Lokalitet	Fangst metode	Dyreart	Antal pools	Antal fugle	AI virus positive pools	H5/H7 positive pools	AI virus isolater
1	KBH	Levende	Blishøne	1	5	0	0	0
1	KBH	Levende	Grønbenet_rørhøne	1	1	0	0	0
1	KBH	Levende	Gråand	1	5	0	0	0
1	KBH	Levende	Hættemåge	1	1	0	0	0
1	KBH	Levende	Stormmåge	1	1	0	0	0
3	Jylland	Levende	Gråand	6	16	2	0	1xH6N2
3	Jylland	Levende	Krikand	13	42	8	0	1xH3N8, 1xPMV-6, 1xPMV-7
3	Jylland	Levende	Pibeand	1	1	0	0	0
3	Jylland	Levende	Skeand	2	3	1	0	1xH8N2
3	Jylland	Levende	Spidsand	2	2	0	0	0
3	Jylland	Nedlagt	Gråand	10	50	5	0	1xH3N8, 1xH4N6
3	Jylland	Nedlagt	Grågå	1	1	0	0	0
3	Jylland	Nedlagt	Stormmåge	2	2	0	0	0
3	Sjælland	Levende	Gråand	3	13	0	0	0
3	Sjælland	Levende	Knarand	1	1	0	0	0
3	Sjælland	Levende	Krikand	1	2	1	0	1xH3N2
3	Sjælland	Levende	Spurvehøg	4	8	0	0	0
3	Sjælland	Levende	Tårnfalk	1	1	0	0	0
3	Sjælland	Nedlagt	Gråand	8	40	6	1xH5 LPAI	1xPMV-2/-6
4	Fyn	Levende	Blishøne	3	9	1	0	1xH1N8
4	Fyn	Levende	Grønbenet_rørhøne	2	4	0	0	0
4	Fyn	Levende	Gråand	10	42	0	0	0
4	Fyn	Levende	Hættemåge	2	3	0	0	0
4	Fyn	Levende	Knopsvane	3	7	0	0	0
4	Fyn	Nedlagt	Gråand	17	69	4	0	1xH4N6, 1xPMV-1
4	Jylland	Levende	Bramgå	17	79	0	0	0
4	Jylland	Levende	Grønbenet_rørhøne	1	1	0	0	0
4	Jylland	Levende	Gråand	8	19	3	0	1xH11N2, 1xPMV-1
4	Jylland	Levende	Hættemåge	1	3	0	0	0
4	Jylland	Levende	Krikand	24	95	11	0	1xH3N8, 1xH6N2, 1xH8N2, 1xH11N9, 2xPMV-1, 1xPMV-4.
4	Jylland	Levende	Pibeand	5	14	0	0	0
4	Jylland	Levende	Skovsneppe	3	8	0	0	0
4	Jylland	Levende	Spidsand	4	5	1	0	0
4	Jylland	Nedlagt	Gråand	38	188	5	0	1xH6N6
4	Jylland	Nedlagt	Gråkrage	1	1	0	0	0
4	Jylland	Nedlagt	Krikand	3	12	0	0	0
4	Jylland	Nedlagt	Musvåge	1	1	0	0	0
4	Jylland	Nedlagt	Sangsvane	4	4	0	0	0
4	Jylland	Nedlagt	Stormmåge	1	1	0	0	0
4	KBH	Levende	Måger	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Allike	1	5	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Bramgå	5	19	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Fasan	2	10	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Fjeldvåge	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Grågå	3	11	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Knopsvane	1	2	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Krikand	2	2	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Pibeand	1	2	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Skovdue	1	3	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Spurvehøg	11	12	1	0	0
4	Sjælland	Levende	Sølvåge	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Tårnfalk	2	2	0	0	0
4	Sjælland	Nedlagt	Gråand	11	35	8	0	3xH4N6
I alt				251	866	57	1	25

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, postnr. 3xxx, 4xxx; Fyn, postnr. 5xxx; Jylland, postnr. 6xxx, 7xxx, 8xxx, 9xxx.

Fangstmetode: Nedlagt, nedlagt fjervildt fra vildthåndteringsvirksomheder og Flyvestationer; Levende, levende ved prøveudtagelse eller skudt ved jagt umiddelbart forinden.

H5/H7 LPAI er påvist ved PCR subtypning og HA kløvningssite sekventering. AI virusisolater er virus, der er isoleret i æg og subtypet ved HI-test/N-test og/eller sekventering af HA og NA generne fra virusisolaterne.

Bilag 3. Virusisolatoversigter

AI virusisolater fra den passive og aktive AI overvågning, fjervildtopdræt-overvågningen og AI mistanker 2018. Subtype af isolater er fundet ved HI- og N- test og/eller sekventering. Subtype på originalmateriale er fundet ved PCR og/eller sekventering.

H-type	Subtype	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale
H1	H1N8	Blishøne	18-17347-2	Ikke H5/H7
H3	H3N2	Krikand	18-12806-15	Ikke H5/H7
	H3N8	Gråand	18-12615-52	Ikke H5/H7
	H3N8	Krikand	18-13474-15	Ikke H5/H7
	H3N8	Krikand	18-14229-10	Ikke H5/H7
H4	H4N6	Gråand	18-12615-60	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	18-14716-36	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	18-14716-37	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	18-14716-38	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråand	18-16182-10	Ikke H5/H7
H5	H5N6 HPAI	Havørn ^p	18-4227-1	H5N6 HPAI
	H5N6 HPAI	Havørn ^p	18-4241-1	H5N6 HPAI
	H5N6 HPAI	Havørn ^p	18-4896-1	H5N6 HPAI
	H5N6 HPAI	Havørn ^p	18-4903-1	H5N6 HPAI
H6	H6N2	Gråand	18-13474-14	Ikke H5/H7
	H6N2	Krikand	18-14760-8	Ikke H5/H7
	H6N6	Gråand	18-15487-54	Ikke H5/H7
H8	H8N2	Skeand	18-13036-13	Ikke H5/H7
	H8N2	Krikand	18-14407-16	Ikke H5/H7
H11	H11N2	Gråand	18-17625-17	Ikke H5/H7
	H11N9	Krikand	18-16854-7	Ikke H5/H7

c=fjervildtopdræt, p=passiv overvågning, øvrige er raske vilde fugle fra den aktive overvågning.

Virus fra overvågningen i vilde fugle 2018 der er isoleret i æg og som ikke var influenza A virus. Typning af PMV isolater med HI-test, PMV-1 virulens bestemt ved sekventering af F-gene kløvningssite, samt AI subtype fundet ved PCR direkte på originalmaterialet.

Virus	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale	PMV-1 CS aa seq
PMV-1	Krikand	18-13776-13	AIV påvist, ikke H5/H7	GKQGRL, avirulent
PMV-1	Krikand	18-14059-24	AIV påvist, ikke H5/H7	GKQGRL, avirulent
PMV-1	Gråand	18-14414-22	AIV påvist, ikke H5/H7	ERQERL, avirulent
PMV-1	Gråand	18-15029-12	AIV påvist, ikke H5/H7	GKQGRL, avirulent
PMV-4	Krikand	18-15029-14	AIV påvist, ikke H5/H7	
PMV-6	Krikand	18-12415-13	AIV påvist, ikke H5/H7	
PMV-2 eller -6	Gråand	18-12903-47	AIV påvist, ikke H5/H7	
PMV7	Krikand	18-12805-14	AIV påvist, ikke H5/H7	
PMV-1	Gråænder i opdræt ^c	18-7747-1K	H1N3	GKQGRL, avirulent
PMV-1	Gråænder i opdræt ^c	18-8625-1K	H5N2 LPAI	GKQGRL, avirulent

c=fjervildtopdræt, øvrige er raske vilde fugle fra den aktive overvågning.

Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 RT-PCR assays

Mismatch mellem virussekvens og primere og prober er markeret med rødt. "----" angiver at sekvens ikke er bestemt. Ct-værdierne i pan Influenza A virus real-time RT-PCR "AI-matrix", real-time H5 HA2 og real-time H5CS er angivet for test af primærmateriale.

Konventionel H5 KHA

Ct AI-matrix	Virus/primernavn	KHA-1	KHA-3 rev compl.
	primersekvens	CCTCCAGARTATGCMATAYAAAAATTGTC	CARGGMATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
24,0	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,0	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
24,3	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,3	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,1	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,8	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,9	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGCTGGTA
30,4	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5853/18397-57w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,1	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,4	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
34,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,3	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,3	A/Eurasian_teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,3	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,9	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,0	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
34	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32	A/Eurasian_teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32	A/Northern_pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
36	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,8	A/duck/Denmark/6504-5c/2018-05-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
23,2	A/mallard/Denmark/8625-1Kc/2018-06-20(H5N2)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,3	A/chicken/Denmark/2804-8p2c/2019-02-27(H5N1)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA

H5 HA2

Ct AI-matrix	Ct H5	Virus/primernavn	H5LH1	H5PRO	H5RH1 rev compl.
		primersekvens	ACATATGACTACCCACARTATTTCAG	TCWACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGRTAGCTGGTCT
-	-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	ACATATGACTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
-	-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	ACATATGACTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
24,0	35,9	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC G CA TTAT ACAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,0	33,7	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
24,3	25,7	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC G CA TTAT ACAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,3	38,4	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAAC G GTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,1	32,7	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,8	0,0	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	ACATATGA TA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGT TC CTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,9	16,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	36,7	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	33,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	33,7	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,1	37,9	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	32,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,5	A/Eurasian teal/Denmark-8451/18954-13w/10-2015(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,1	33,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGG TA AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,3	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34,6	38,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,3	37,8	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,3	37,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,6	0,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,3	21,7	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	ACATATGA TT ACCC G CA TTAT TCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,9	0,0	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	ACATATGA TT ACT CG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	ACATATA TA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,0	36,6	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,5	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34	37,4	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33	0	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
32	0	A/Eurasian_teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
27	29	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
33	38,2	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGGTAGCTGGTCT
33	38,4	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
26	31,8	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30	35,0	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
26	33	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	ACATA CA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28	31,4	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32	39	A/Northern_pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
36	0	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	-----	-----
30,8	34,6	A/duck/Denmark/6504-5c/2018-05-03(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	-----	-----
23,2	29,1	A/mallard/Denmark/8625-1Kc/2018-06-20(H5N2)HA	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,3	36,1	A/chicken/Denmark/2804-8p2c/2019-02-27(H5N1)HA	ACATAT AA TTACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGCAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT

H5CS

Ct AI-matrix	Ct H5CS	Virus/primernavn	H5CS-240L	H5CS-240Prolno	H5CS-192R rev compl.
		primersekvens	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	IGAATGCCCCAAATAYGTGA	TATTTGGRGCTATAGCAGGC
-	-	A/mallard/Denmark/64650/2003(H5N7)HA_AY531029	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
-	-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
24,0	25,2	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
29,0	32,5	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
24,3	26,1	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
27,3	33,5	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,1	31,6	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,8	34,1	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
14,9	11,1	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,4	28,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	30,8	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	30,1	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,1	29,3	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,4	29,5	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
27,1	28,6	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	31,5	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	37,6	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
34,6	34,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
35,3	34,2	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGAGCTATAGCAGGC
33,3	34,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
29,6	36,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
32,0	31,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	-----	-----	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
14,3	12,4	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	AACACCAAGTGCCAAACTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,0	29,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	-----	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	34,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	---CCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33,9	34,1	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	-CACCAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	30,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33,0	34,6	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,0	33,2	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
31,0	34,2	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
34	35	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
33	33,4	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
32	34	A/Eurasian teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
27	27	A/Eurasian teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33	33	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
33	34,3	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
26	27,8	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
30	29,8	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	AATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
26	29	A/Eurasian teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
28	28,5	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
32	32	A/Northern pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
36	35	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	-----
30,8	34,8	A/duck/Denmark/6504-5c/2018-05-03(H5)	AATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
23,2	28,1	A/mallard/Denmark/8625-1Kc/2018-06-20(H5N2)HA	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
30,3	30,0	A/chicken/Denmark/2804-8p2c/2019-02-27(H5N1)HA	GACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC

Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2018.



Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2018.

Der er indgået aftale mellem Fødevarestyrelsen (FVST) og DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) vedr. passiv overvågning for aviær influenza i døde vilde fugle i 2018 jf. "Aftale nr. 2 om overvågning af sygdomme og gennemførelse af projekter i 2018 (West Nile Virus, virus i flagermus, resistens, sygdomsdatabase samt overvågningsprogrammer der afregnes efter antal prøver)". Overvågningsprogrammet afregnes efter antallet af prøver.

Der er indgået aftale mellem FVST og DTU-VET om den årlige aktive overvågning for aviær influenza i vilde fugle 2017-19 jf. "Aftale nr. 3 om overvågning af sygdomme og gennemførelse af projekter for 2017-19 (vektorer, svineinfluenza, afrikansk svinepest og fugleinfluenza)". Aftalen er 3-årig, med et årligt budget på 650.000 kr. FVST afholder udgifterne til udtagning af prøver udenfor projektbudgettet i aftalen.

Projektet gennemføres i samarbejde mellem Fødevarestyrelsen (FVST), Statens Naturhistoriske Museum, KU (SNM) og Veterinærinstituttet DTU (DTU-VET).

Vildfugleovervågningen i 2018 omfatter:

- 1) En EU koordineret passiv overvågning for højpatogen aviær influenza (HPAI) virus i vilde fugle fundet døde eller syge, i medfør af Kommissionens Afgørelse 2010/367/EU¹.
- 2) En national aktiv overvågning (screening) for lavpatogen aviær influenza (LPAI) virus i levende vilde fugle, herunder nedlagte fugle.
- 3) Molekylær karakterisering af udvalgte virus og gener fra 1) + 2) og evt. virus fra fjerkræ. Der fokuseres på karakterisering af H5 og H7.

Baggrund

FVST er forpligtet til at overvåge for HPAI virus i døde og syge vilde fugle i medfør af Kommissionens Afgørelse¹ af 25. juni 2010 (2010/367/EU). Overvågningen er en del af det EU-baserede overvågningsprogram for AI, der har været gennemført siden 2003, og som løbende er blevet justeret.

FVST udfører en national aktiv overvågning for LPAI virus i levende/nedlagte vilde fugle. Overvågningen foretages som en screening for LPAI virus i vildt levende fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, herunder undersøgelse af nedlagt vildt (fortrinsvist svømmeænder).

Danmark er i kraft af sin geografiske placering et knudepunkt på efterårstrækket for mange vandfuglearter, der primært yngler nord og nordøst for Danmark. Det er eksempelvis arter som grågås, gråand, krikand, pibeand, troldand, hættemåge, stormmåge m.fl. Enkelte arter kommer dog fra et større område, der strækker sig fra det nordøstlige Canada til Nordsibirien. Det er eksempelvis arter som kortnæbbet gås, knortegås, bramgås og stenvender. De fleste arter overvintrer i Europa og Nordafrika, men især vadefugle trækker længere mod syd. Alene i efterårs- og vintermånederne opholder omkring 3 millioner andefugle sig i de danske farvande. Det samlede antal vandfugle der trækker gennem landet er sandsynligvis langt større.

Hvis syge vandfugle, inficerede med fugleinfluenza, er i stand til at flyve over store afstande, og hvis disse trækfugle kan sprede virus til lokale arter eller omgivelserne, er ophavsområdet til kilde for smitte omfattende.

¹ Kommissionens Afgørelse nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle (2010/367/EU)

I dette projekt er målet at indsamle flest mulige positive fugleinfluenzaprøver. Blandt andet derfor er indsamlingerne koncentreret i efterårshalvåret, ud fra den erfaring at chancen for at finde fugleinfluenza er størst i denne periode. Endvidere er indsamlingen koncentreret om de arter, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til fugleinfluenza (jf. EU kommissionsafgørelsen nr. 367 af 25. juni 2010), hvilket primært er vandfuglearter. I projektet har der derfor i de senere år været fokuseret på svømmeænder (især gråand, krikand, pibeand), gæs, svaner og måger.

Dette projekt er konstrueret på en sådan måde, at både artssammensætningen og den geografiske fordeling er stærkt afhængig af SNM's korps af frivillige ringmærkere og deres allerede eksisterende ringmærkningsaktiviteter. Det er lykkedes i de foregående år at indsamle prøver fra en lang række forskellige lokaliteter på tværs af landet, fra Vestjylland til Østjylland. Dermed vil prøverne sandsynligvis repræsentere de mindre geografiske forskelle der måske er mellem fugle der gæster det vestlige Jylland og dem der gæster Østdanmark.

De enkelte arters træk- og spredningsmønstre er beskrevet i værket Dansk Trækfugleatlas (Bønløkke et. al. 2006).

Fremgangsmåde

Alle prøver, der skal indgå i den passive overvågning (1) og den aktive screening (2), indsendes til DTU-VET førstkommande hverdag efter prøveudtagning.

De sidste prøver i den aktive overvågning skal være modtaget på DTU-VET senest 14. december kl. 10. Der kan maksimalt analyseres ca. 20 pools pr. uge, svarende til max. 100 fugle fra den aktive screening.

1) Passiv overvågning

Fornålet med overvågningen er dels at undersøge døde og syge vilde fugle for HPAI virus, dels at få indberetninger om usædvanlig dødelighed og markante sygdomsudbrud hos vilde fugle, der kan være tegn på smitte med aviær influenza.

Fuglearter omfattet af overvågningen fremgår af bilag 1 til denne aftale.

Veterinærenhederne står for visitering og indsendelse af døde og syge vilde fugle indberettet af borgere.

FVST har etableret en aftale med Naturstyrelsen (NS) om, at der indsamles og indsendes døde vilde fugle fra vildtreservater i fem udvalgte enheder.

Egnede undersøgte fugle indsendt til DTU-VET som faldvildt, indgår også i overvågningen.

Det kan være vanskeligt at sikre det ønskede antal døde vilde fugle, idet antallet varierer meget med årstid, lokalitet og vejrlig, især om vinteren. Ligeledes er det kendt, at døde vilde fugle i løbet af kort tid omsættes i naturen f.eks. af predatorer.

Kadaverne indsendes til DTU-VET og undersøgelsen foretages på en trachealsvaber og en kloaksvaber pr. fugl, disse kan poolles for hver fugl til en samlet prøve pr. fugl.

Tidshorisont, PCR resultat: 3 arbejdsdage efter modtagelse. For faldvildt en samlet maksimal svartid fra fund af en fugl til analyseresultat inkl. patogenicitetsbestemmelse foreligger på 8 arbejdsdage.

Resultatet sigter mod at informere om der påvises HPAI virus.

Tidshorisont, opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver: op til 4-5 uger efter modtagelse. Virusisolationen igangsættes indenfor 4-5 dage, men kan tage op til 4-5 uger.

2) Aktiv overvågning

Der etableres samarbejde med Ringmærkningscentralen under SNM, om indsamling af prøver bl.a. i forbindelse med ringmærkningsaktiviteter i 2018. De arter, der indsamles prøver fra, udvælges, så de bedst muligt tilgodeser ønsket om at indsamle fra fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza, jf. bilag 1. Antallet af fugle/prøver det tilstræbes at indsamle, fremgår af nedenstående tabel. Der tilstræbes en geografisk fordeling af prøver så der i Hovedstadsregionen max. tages 100 prøver.

I fortsættelse af de tidligere års overvågning vil FVST udtage og indsamle prøver fra nedlagte ænder (gråand, krikand, pibeand) og gæs (gerne kortnæbbet gås), fortrinsvist i perioden 1/9 – 1/12 2018. Prøverne vil blive udtaget fra ænder og gæs indleveret på vildthåndteringsvirksomheder (Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling, og Klosterheden Vildt).

Prøverne vil blive indsamlet som kloaksvaber eller evt. fæcesvaber enkeltprøver i kloakmedie (flerstyrkemedie) og poollet i laboratoriet inden undersøgelse. Såfremt der er behov for analyse af enkeltprøver i en positiv pool, kan enkeltprøverne testes; der foretages alene undersøgelse af enkeltprøverne, hvis poolen giver et uklart resultat, hvilket kan være tilfældet ved tilstedeværelse af flere virus i samme pool.

Pooling i laboratoriet foretages således, at en pool kun indeholder max. 5 svabere indsamlet på samme dato, sted (på postnr. niveau) fra samme fugleart.

Fæcesvabere udtages ved at svabe en frisk fæceskat og overføre den til rør med 3 ml AI kloakmedie, hvor der er god sikkerhed for at fuglearten kan afgøres, dvs. klatrer efter flokke af fugle der lige er lettet.

Der vil være mulighed for at inkludere nedskudte fugle fra Ålborg og Karup lufthavn. Herved kan vi sikre flere mågefugle i overvågningen. Omfanget vil være ca 35 måger. Efter nedskud opbevares kadaverne i -20 fryser i lufthavnen indtil de afhentes af DTU-VET. Det tilstræbes at afhente kadaverne to gange i perioden fra 1. september – 1. december 2018. Der testes på en pool af tracheal- og kloaksvaber fra hvert dyr, der pooles max fra 5 fugle af samme art, neskydningssted og tidspunkt. Svartiden tilstræbes at være max 5 uger fra nedskudstidspunktet.

Tidshorisont: Primære resultater i løbet af 5 arbejdsdage (influenza A, H5 og H7, H5/H7 LPAI/HPAI) efter modtagelse. Sekundære resultater (subtypning af virusisolater) indenfor 4-5 uger, hvis der er tale om H5 eller H7 subtype og indenfor ca. 2 måneder, for andre H typers vedkommende. Afrapporteres i slutrapporten.

Resultat: sigter i første omgang mod at informere om der forekommer H5 eller H7 AI virus samt karakterisering af H5/H7 subtyper m.h.t. patogenicitet. Endvidere en kortlægning af forekomsten af andre subtyper AI virus i vilde danske fugle.

3) Molekylær karakterisering

Diversiteten af AI virus er stor og identifikation af specifikke virus-varianter kræver en nærmere karakterisering af virus, som giver mere information end subtypen. Formålet er hurtig karakterisering af H7 virus med henblik på identifikation af H7N9-China like virus, hurtig karakterisering af H5 virus, karakterisering af H5 og H7 virus med henblik på evaluering af egnetheden af de anvendte RT-PCR assays til H5/H7 subtypning, subtypebestemmelse af ikke-H5/H7/H9 virus.

Udover virus fra vilde fugle, kan øvrige AI virus, som er identificeret i fjerkræbesætninger mv. i forbindelse med fx AI mistanker og overvågningen i afkom fra opdrættet fjervildt, karakteriseres.

Endvidere vil der blive foretaget en nærmere molekylærbiologisk karakterisering af virus fra HPAI H5N6 udbruddet i vilde fugle i starten af 2018.

Tidshorisont: identifikation af H7N9-China virus ca. 5 arbejdsdage efter påvisning af H7. Resultatet af øvrige analyser rapporteres i slutrapporten.

Oversigt over antal fugle og prøver i overvågning af AI i vilde fugle i Danmark 2018

Opgave	Antal fugle	Antal prøver (pools)
<i>Aktiv overvågning i levende vilde fugle (inkl. nedlagte)</i>		
SNM	430	146
FVST veterinærenheder (nedlagt fjervildt)	435	87
Nedskudte fugle fra Ålborg og Karup lufthavn	35	7
I alt	900	240
	Antal fugle (estimeret)	Antal prøver (estimeret)
<i>Passiv overvågning i døde vilde fugle</i>		
DTU-VET (faldvildt)		
NS		
FVST, Veterinærenheder		
I alt	100	100

Kontaktpersoner

Charlotte K. Hjulsager og Lars E. Larsen, DTU-VET.

Pernille Dahl Nielsen, FVST.

Jesper Johannes Madsen og Kasper Thorup, SNM.

BILAG 1

Liste² over arter af vilde fugle, der skal gøres til genstand for målrettet prøveudtagning og testning for aviær influenza (målarter)

Nr.	Videnskabeligt navn	Almindeligt anvendt navn
1.	<i>Accipiter gentilis</i>	Duehøg
2.	<i>Accipiter nisus</i>	Spurvehøg
3.	<i>Anas acuta</i>	Spidsand
4.	<i>Anas clypeata</i>	Skeand
5.	<i>Anas crecca</i>	Krikand
6.	<i>Anas penelope</i>	Pibeand
7.	<i>Anas platyrhynchos</i>	Gråand
8.	<i>Anas querquedula</i>	Atlingand
9.	<i>Anas strepera</i>	Knarand
10.	<i>Anser albifrons albifrons</i>	Blisgås (europæisk underart)
11.	<i>Anser anser</i>	Grågås
12.	<i>Anser brachyrhynchus</i>	Kortnæbbet gås
13.	<i>Anser erythropus</i>	Dværgegås
14.	<i>Anser fabalis</i>	Sædgås
15.	<i>Ardea cinerea</i>	Fiskehejre
16.	<i>Aythya ferina</i>	Taffeland
17.	<i>Aythya fuligula</i>	Troldand
18.	<i>Branta bernicla</i>	Knortegås
19.	<i>Branta canadensis</i>	Canadagås
20.	<i>Branta leucopsis</i>	Bramgås
21.	<i>Branta ruficollis</i>	Rødhalset gås
22.	<i>Bubo bubo</i>	Stor hornugle
23.	<i>Buteo buteo</i>	Musvåge
24.	<i>Buteo lagopus</i>	Fjeldvåge
25.	<i>Cairina moschata</i>	Moskusand
26.	<i>Ciconia ciconia</i>	Hvid stork
27.	<i>Circus aeruginosus</i>	Rørhøg
28.	<i>Cygnus columbianus</i>	Pibesvane
29.	<i>Cygnus cygnus</i>	Sangsvane
30.	<i>Cygnus olor</i>	Knopsvane
31.	<i>Falco peregrinus</i>	Vandrefalk
32.	<i>Falco tinnunculus</i>	Tårnfalk
33.	<i>Fulica atra</i>	Blishøne
34.	<i>Larus canus</i>	Stormmåge

² Liste fra Kommissions beslutning nr. 367 af 25. juni 2010 om medlemsstaternes gennemførelse af overvågningsprogrammer vedrørende aviær influenza hos fjerkræ og vilde fugle

35. | *Larus ridibundus* | Hættemåge |
36. | *Limosa limosa* | Stor kobbersneppe |
37. | *Marmaronetta angustirostris* | Marmorand | (findes ikke i DK)
38. | *Mergus albellus* | Lille skallesluger |
39. | *Milvus migrans* | Sort glente | (sjælden i DK)
40. | *Milvus milvus* | Rød glente |
41. | *Netta rufina* | Rødhovedet and |
42. | *Phalacrocorax carbo* | Skarv |
43. | *Philomachus pugnax* | Brushane |
44. | *Pica pica* | Husskade |
45. | *Pluvialis apricaria* | Hjejle |
46. | *Podiceps cristatus* | Toppet lappedykker |
47. | *Podiceps nigricollis* | Sorthalset lappedykker |
48. | *Porphyrio porphyrio* | Sultanhøne | (findes ikke i DK)
49. | *Tachybaptus ruficollis* | Lille lappedykker |
50. | *Vanellus vanellus* | Vibe |

