

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2019

Charlotte K. Hjulsager

September 2020



Denne rapport beskriver resultaterne der er opnået i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2019". Overvågningen er udført af Dansk Veterinærkonsortium (DK-VET) i samarbejde med Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum (SNM).

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. Private borgere takkes for så vidt angår døde fugle til den passive overvågning for fugleinfluenza.

Endvidere takkes laboranter og dyrlæger i VOF på SSI for omhyggelig udførelse af laboratorieundersøgelserne, og patologer på KU og DTU takkes for håndtering af kadavere af døde vilde fugle.

Endelig skal det bemærkes at AI beredskabet inkl. overvågningsaktiviteter flyttede til SSI pr. 1. marts 2019, og hovedparten af laboratorieanalyserne er derfor udført på DK-VET.

DK-VET rapport, endelig version 24.06.2021, (udkast udarbejdet pr. september 2020).

Overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark 2019

Projektdeltagere:

Charlotte K Hjulsager, Statens Serum Institut

Jesper S Krog, Statens Serum Institut

Lise K Kvisgaard, Københavns Universitet

Jesper J Madsen, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Kasper Thorup, Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet

Lars E Larsen, Københavns Universitet

Udarbejdet af Charlotte K. Hjulsager

Udarbejdet i henhold til den veterinære myndighedsaftale mellem Miljø- og Fødevarerministeriet og Københavns Universitet i samarbejde med Statens Serum Institut; Dansk veterinær Konsortium (DK-VET).

Projektperiode 01-01-2019 – 31-12-2019

Udgivet af Statens Serum Institut, Artillerivej 5, 2300 København S

Sammenfatning

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 2019 blev der udført EU lovomfattet passiv overvågning af døde vilde fugle, der blev fundet i naturen. Der blev testet 111 fugle. Der blev påvist højpatogen aviær influenza (HPAI) H5N6 virus i en musvåge fundet død den 4. januar 2019 i Odsherred. Dette var det eneste fund af HPAI virus på dansk grund i 2019. Forud for dette fund var der påvist HPAI H5N6 virus i 42 døde vilde fugle i Danmark som led i den passive overvågning for AI virus i 2018.

Molekylærphylogenetisk analyse af HA gener fra HPAI H5N6 virus fundet i Danmark i 2018 og 2019 har vist, at disse virus er nært beslægtede med hinanden og med samtidige HPAI H5 clade 2.2.4.4b virus fra andre europæiske lande. Virus adskiller 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.

Ud over det ene tilfælde af HPAI virus, blev der påvist influenza A virus af anden subtype end H5/H7 i en sangsvane, fundet død i februar 2019 ved Silkeborg, og i en sølvmåge fra juli 2019 ved Vordingborg.

Der blev udført en aktiv overvågning af AI virus i raske vilde fugle i Danmark i 2019. Denne blev udført i samarbejde med Fødevarestyrelsen (FVST) og Statens Naturhistoriske Museum, Københavns Universitet (SNM) i henhold til "Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2019". Omfanget af overvågningen var 900 fugle og primært med fokus på H5/H7 virus.

Der blev i alt testet 892 fugle som 238 pools af kloaksvabere fra op til 5 fugle af samme art, fundet på samme sted og på samme tid. Prøverne blev udtaget fra enkelt dyr og sendt til laboratoriet (SSI), hvor de blev poollet inden test. Prøverne blev indsamlet i Jylland, på Fyn, Falster, Sjælland og i Hovedstadsregionen. SNM forestod indsamlingen af prøver fra 422 levende vilde fugle. FVST varetog udtagelse af prøver fra 470 fugle fra nedlagte ænder og fasaner, der var indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt.

I alt 70 pools (29 %) blev fundet positive for AI virus ved PCR. Af disse var kun fire lavpatogen AI (LPAI) H5, hvilket er usædvanligt få, men tilsvarende resultatet i 2018, hvor der kun blev påvist H5 LPAI i én pool. De foregående år er der påvist H5 LPAI virus i op til 28 % af de influenza A virus PCR positive pools, svarende til op 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. Der har været udbrud af HPAI H5 i vilde fugle i store dele af Europa, herunder Danmark, fra november 2016 til 2019, hvilket 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. Andelen og antallet af positive pools i 2019 var i øvrigt 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 11%, hvilket er noget lavere end de foregående år. Årsagen hertil kendes ikke, men det kan fx skyldes suboptimal opbevaring af prøverne under transport til laboratoriet.

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.

Overvågningen i Danmark tilvejebringer værdifuld information om de virus, der er udbredt i de danske fuglebestande. Baseret på sekvenser fra de påviste danske H5 virus er udført en PCR assay fitness-analyse af de H5 subtypnings assays, der anvendes til både AI mistanker og overvågning. Mens EURL overvåger de EU-anbefalede assays anvendelighed på europæisk plan, er vores analyse målrettet de LPAI H5 virus, der er udbredt lokalt i de danske fuglebestande.

Analysen indikererede, 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 blev afsløret ved fuldlængde HA sekventering og molekylærfylogenetisk analyse. Men analysen viste også, at det er nødvendigt med den nuværende strategi for subtypning, der involverer samtidig anvendelse af både "H5" og "H5CS" real-time assays for at opnå 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. Det er 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 anmeldtepligtige AI virus til gavn for både dyresundheden og samfundsøkonomien.

I 2019 var der udbrud af LPAI H5/H7 virus i tre danske fjerkræbesætninger. H5N1 LPAI virus og LPAI H7N7 virus blev påvist i hhv. en hønseflok og en gråandeflok efter forudgående fund af H5/H7 antistoffer i forbindelse med den serologiske rutineovervågning for AI. Ydermere blev der påvist LPAI H5N1 virus i et gråandehold i forbindelse med den virologiske overvågning for AI i fjervildt opdræt.

I to andre gråandehold blev påvist hhv. H10N7 og H4N2 i forbindelse med den virologiske overvågning for AI i fjervildt opdræt.

Indholdsfortegnelse

Sammenfatning	3
Indholdsfortegnelse.....	5
Formål og afgrænsning	6
Baggrund, relevans og perspektiv	7
Metode	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	12
Prøver	12
PCR resultater	14
Virusisolater.....	15
Sammenligning med resultater fra tidligere år	16
Molekylær karakterisering af AI virus.....	17
H5 evaluering af diagnostiske assays mangler opdatering	17
H5 LPAI diversitet	17
H5 HPAI diversitet.....	18
H7 diversitet	19
H9 virus.....	20
AI virus i fjerkræ.....	21
Referencer	23
Bilag 1. Oversigt over den passive overvågning	25
Bilag 2. Oversigt over den aktive overvågning	27
Bilag 3. Virusisolat-oversigter	28
Bilag 4. Match mellem virus sekvenser og primere og prober i diagnostiske H5 RT-PCR assays.....	29
Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2019.	32

Formål og afgrænsning

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 2019 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 (EFSA et al. 2017).

FVST indberettede laboratorieresultaterne fra den passive overvågning til EFSA.

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.

Baggrund, relevans og perspektiv

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 kan give mildere eller slet ingen symptomer. 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 ser ud til at have cirkuleret i månedsvi 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 subtype virus, 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 vinteren 2014/2015 blev HPAI H5N8 virus rapporteret fra både vilde fugle og fjerkræ i EU (Tyskland, Holland, UK, Sverige, Italien, Ungarn). Disse virus tilhørte 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 fra 2014-15 HPAI H5N8 virus og tilhørte clade 2.3.4.4b. Det første fund var 27. oktober 2016 i en vild fugl i Ungarn. Virusset spredte sig herefter hurtigt til de fleste europæiske lande, herunder Danmark 7. november 2016.

Genetiske analyser har indikeret, at det er sandsynligt, at viruset blev introduceret med vilde fugle fra Rusland via hhv. en nord- og en centraleuropæisk rute. Det 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, blev der i 2016-17 i mindre omfang påvist HPAI reassortments H5N5 og H5N6 i Europa. Disse virus er sandsynligvis opstået ved reassortment mellem HPAI H5N8 og lokale lavpatogene virus.

I 2018-19 var der udbrud af HPAI H5N6 i flere europæiske lande. Udover Danmark, var der fund af dette virus i Finland, Sverige, Holland, Tyskland, Irland, Slovakiet og Storbritannien, primært i første halvår af 2018. Hovedparten af de positive fund i Danmark var i vilde fugle indsamlet i perioden 12. februar til 17. april 2018, herefter fandtes sporadiske H5N6 HPAI positive vilde fugle i juli, august og september 2018. Efter yderligere 3 måneder blev der påvist HPAI H5N6 i en havørn fundet den 22. december 2018 ved Næstved. Sådanne sene fund i 2018 sås ikke i de øvrige europæiske lande (Liang et al. 2021).

Influenza er en zoonose, men de HPAI H5N6 virus fundet i Europa i 2016-2019, er ikke nært beslægtede med de humanpatogene H5N6 virus fra Sydøstasien, der siden 2014 har krævet 7 dødsfald i Kina, blandt 24 laboratoriebekræftede tilfælde (WHO update No. 753, 07. August 2020).

I perioden fra januar 2003 – 6. august 2020 er der indrapporteret 861 laboratoriediagnosticerede humane tilfælde af infektion med asian lineage HPAI H5N1 virus fra 17 lande til WHO, heraf 455 med dødelig udgang (WHO No. 753, 2020). De fleste tilfælde er fra Asien 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.

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. Indtil 6. august 2020 er der rapporteret om 1568 laboratoriebekræftede humane tilfælde af H7N9 infektion til WHO siden starten af 2013 (WHO No. 753, 2020). De humane cases relateres til kontakt med smittede levende eller døde fugle eller inficeret miljø. Der er ikke vedvaren smitte mellem mennesker.

I februar 2018 er der rapporteret om et tilfælde af human smitte med aviær influenza virus A subtype H7N4 (WHO update No. 753, 07. August 2020).

H9N2 virus er enzootisk forekommende i forskellige typer af terrestrisk fjerkræ flere steder på det eurasiske 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 flere gange og virus har doneret interne gener til zoonotiske influenzavirus Asian H7N9 og H10N8. I 2020 er der rapporteret om fem humane tilfælde i Kina og dermed er der totalt rapporteret om 33 tilfælde af human infektion med H9N2 i Kina siden december 2005 (WHO update No. 753, 07. August 2020).

Der har generelt været meget lavere aktivitet for så vidt angår fund af HPAI virus i vilde fugle og fjerkræ på europæisk plan i 2019 end i de foregående år med først HPAI H5N8 og dernæst HPAI H5N6. I Polen var der flere udbrud med HPAI H5N8 i fjerkræ i slutningen af 2019 og starten af 2020, og fylogenetiske analyser viste at disse virus var tættere beslægtet med virus fra Afrika (Nigeria) end med europæiske HPAI H5Nx virus fra 2016-2018. I starten af 2020 var der også rapporter om HPAI H5N8 fra Tyskland, Ungarn, Rumænien, Slovakiet og Tjekkiet. De involverede virus var tæt beslægtet med de polske "Nigeria-like" HPAI H5N8 virus ifølge EURL.

Metode

Prøveindsamling, passiv overvågning - døde vilde fugle

Kadavere af fugle fundet døde i naturen blev indsendt til DK-VET eller 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 af en kloak- og en svælgsvaber på SSI. Fjerfaldvildt indsendt til faldvildtundersøgelser på DTU, Center for Diagnostik, indgik også i overvågningen, idet prøver blev udtaget på DTU og indleveret til test på SSI. Laboratoriesvar blev sendt til FVST, Dyresundhed og med kopi til DTU for så vidt angår fjerfaldvildt. 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 (Sjælland), Alpevej Vildtbehandling (Fyn) og Klosterheden Vildt (Jylland), i alt 470 fugle. Prøverne blev udtaget i perioden 9. september - 18. november 2019, og indsendt på køl til SSI med FVST's kurerservice.

2) Levende fugle. SNM koordinerede udtagelse af prøver fra vildtlevende fugle ud fra en prioriteret liste (bilag 5) med fokus på vandfugle, 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 422 fugle, indsamlet 12. februar og i perioden 1. september - 16. december 2019.

Prøver fra op til 5 fugle af samme art og udtaget på samme tid og sted, blev poolet på laboratoriet før test. Alle pools blev undersøgt på SSI 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 tilfælde hvor virusisolaterne ikke var AI virus, blev isolaterne testet med RT-PCR for PMV1 og HI-test overfor et panel af aviær paramyxovirus type PMV1-2 og PMV4-9 antisera.

Resultater og diskussion

Passiv overvågning - døde vilde fugle

Som led i den passive overvågning for AI virus i 2019, blev der testet 111 fugle, som var fundet døde i naturen (bilag 1). Der blev påvist HPAI H5N6 i en musvåge fundet død 4. januar 2019 i Odsherred. Dette var det eneste fund af HPAI virus på dansk grund i 2019. Forud for dette fund var der påvist HPAI H5N6 virus i 42 døde vilde fugle i Danmark som led i den passive overvågning for AI virus i 2018. Genetiske analyser viser at de danske HPAI H5N6 virus er beslægtet med de europæiske HPAI H5N6 virus fra 2018 og H5N8 virus fra 2016-2017 (Liang et al. 2021).

Udover det ene tilfælde med HPAI virus, blev der påvist influenza A virus af anden subtype end H5/H7 i en sangsvane, fundet død i februar 2019 ved Silkeborg, og i en sølvmåge fra juli 2019 ved Vordingborg.

Den geografiske fordeling af fugle indsendt til undersøgelse i 2019 fremgår af figur 1. De testede fugle er fundet fordelt over hele landet med undtagelse af Bornholm.



Figur 1. Passiv overvågning af AI, Danmark 2019. Detaljerede oplysninger fremgår af <https://ai.fvst.dk/> og bilag 1.

Tabel 1. Oversigt over den passive overvågning af AI i Danmark 2009-2019.

Døde vilde fugle	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Antal fugle testet	83	56	33	18	10	10	37	204	154	148	111
AI virus PCR positive	1	3	1	2	0	0	1	66	22	46	3
H5/H7 LPAI positive	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
H5/H7 HPAI positive*	0	0	0	0	0	0	0	*65	*17	**42	**1

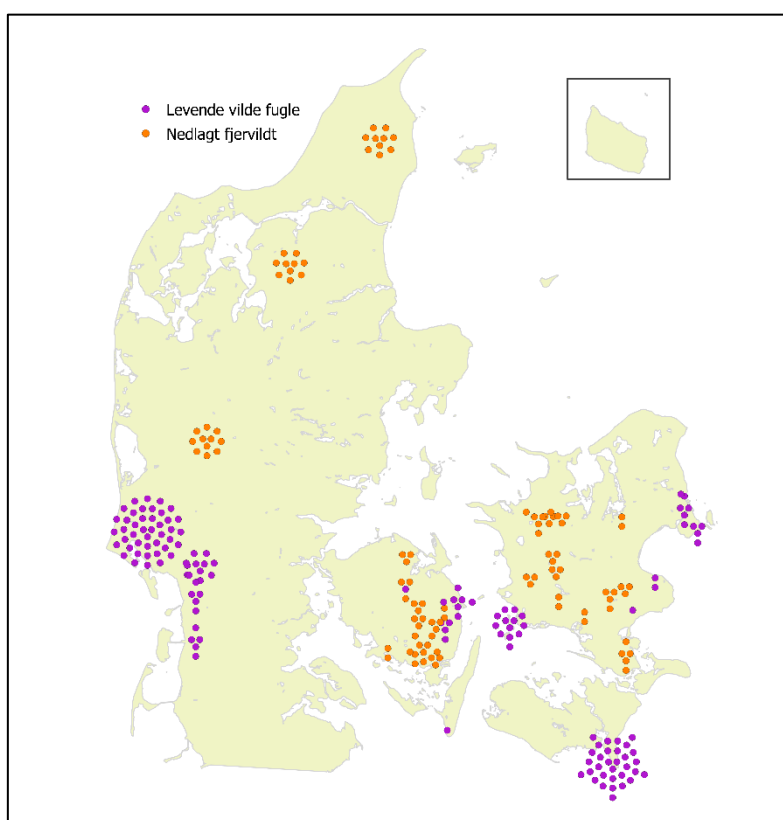
*HPAI H5N8, **HPAI H5N6.

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 350 gråænder og indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food (n=60), Alpevej Vildtbehandling (n=140) og Klosterheden Vildt (150), hvor der blev udtaget prøver. Ligeledes blev der udtaget prøver fra fasaner indleveret hos Kivan (n=120), i et forsøg på at forfølge en hypotese om at fasaner omkring Smålandsfarvandet kan udgøre et symptomfrit reservoir for HPAI H5N6 virus.



Figur 2. Indsamlingssteder på postnr.-niveau for fugle i den aktive overvågning for aviær influenza 2019. Både nedskudssteder for fugle i kategorien "nedlagt fjervildt", der omfattede fugle hvorfra der blev udtaget prøver på vildthåndteringsvirksomheder, 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 422 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 238 pools af kloaksvabere fra 898 fugle fordelt på 23 arter og de fleste landsdele (figur 2, tabel 2). Geografisk fordelte fuglene sig med 44 % fra Jylland, 18 % fra Fyn, 33 % fra Sjælland og 5 %

fra Hovedstadsområdet. Der er taget relativt flere prøver på Fyn og Sjælland end de senere år, på bekostning af prøver fra Jylland, hvilket kan tilskrives indsatsen på nedlagte fasaner centreret omkring Smålandsfarvandet. Det blev taget lidt flere prøver i Hovedstadsområdet end de foregående år.

Tabel 2. Antal fugle fordelt på arter og landsdele, 2019. Antal AI viruspositive pools ().

Art	Jylland	Fyn	Sjælland	Hovedstadsområdet	Sum (antal fugle)
Blishøne				2 (0)	2
Bramgås			48 (1)		48
Dværgfalk			1 (1)		1
Fasan, nedlagt		40 (0)	80 (0)		120
Gråand	31 (3)	6 (1)	2 (0)	4 (0)	43
Gråand, nedlagt	150 (18)	100 (5)	100 (13)		350
Grågås				30 (0)	30
Hættemåge		7 (0)		5 (0)	12
Knarand	1 (0)				1
Knopsvane		7 (0)			7
Krikand	64 (12)	2 (1)			66
Mosehornugle			1 (0)		1
Musvåge			1 (0)		1
Pibeand	73 (11)		2 (0)		75
Råge			8 (0)		8
Skeand	4 (1)				4
Skovsneppe	2 (0)				2
Spidsand	3 (0)		1 (0)		4
Spurvehøg			31 (2)		31
Stor præstekrave			1 (0)		1
Stormmåge	48 (0)		15 (0)		63
Sølvmåge	17 (1)				17
Troldand				4 (0)	4
Vandrefalk		1 (0)			1
Sum (antal fugle)	393	163	291	45	892

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 2019 blev der indsamlet prøver fra 9 fugle i 1. kvartal. De var alle fra Hovedstadsområdet og negative for influenzavirus. Prøver fra de resterende fugle blev indsamlet i perioden 1. september – 16. december og fordelte sig med 217 fugle i 3. kvartal og 666 i 4. kvartal. Der blev testet i alt 892 fugle fordelt i 238 pools/prøver, heraf var 201 pools af mere end én prøve og 37 var enkeltprøve-pools (tabel 3).

Tabel 3. Oversigt over antal fugle i de testede prøver (pools), 2019.

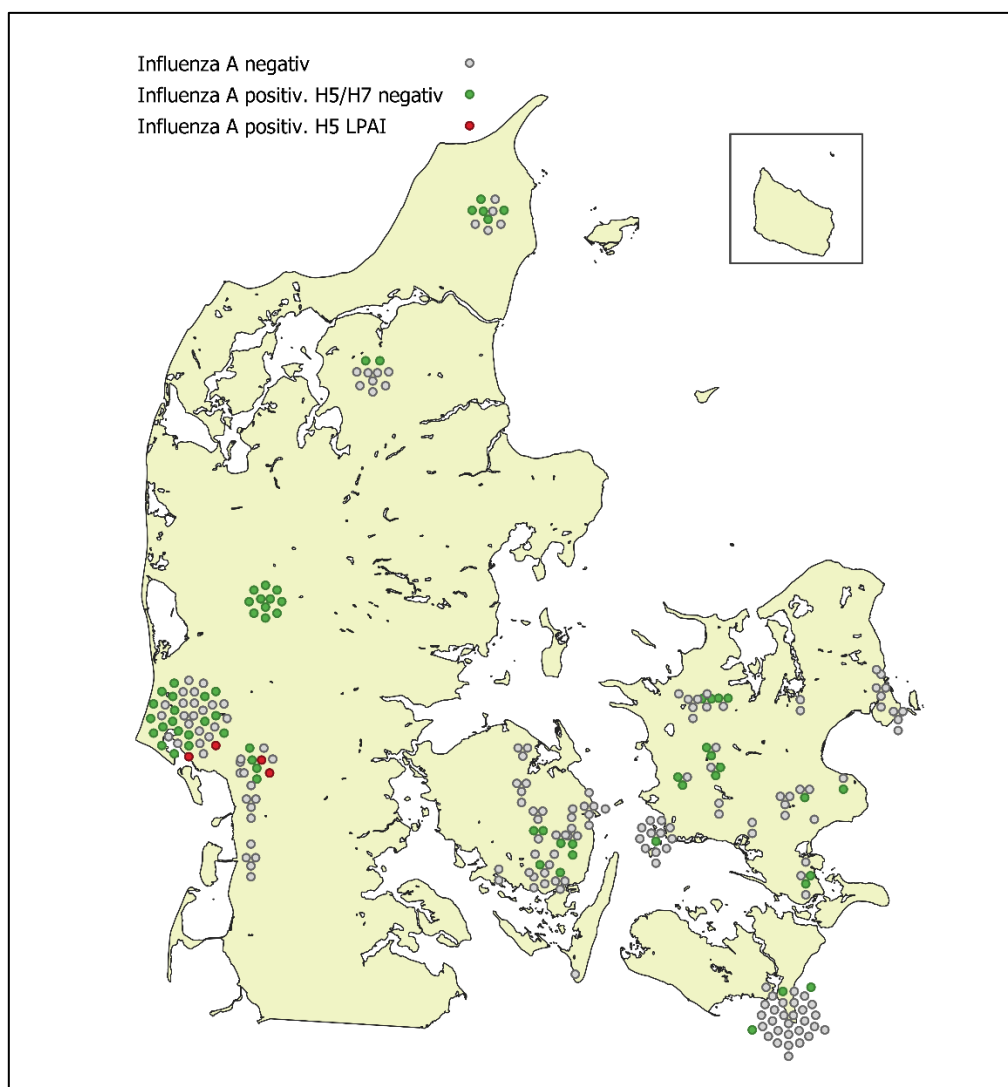
Antal fugle pr. pool	Antal pools testet		Antal fugle
	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	
1	37	0	37
2	19	1	40
3	11	3	42
4	31	31	248
5	38	67	525
I alt	136	102	892

PCR resultater

De poolede prøver blev indledningsvist testet med PCR for influenza A virus. I alt var 70 pools positive, svarende til 29 % (tabel 4). De positive pools blev testet med specifikke subtypnings PCR metoder for H5 og H7. Kun fire pools blev subtypet til H5 og patogenicitetsbestemt ved sekventering til LPAI H5. Disse var pools af svabere fra hhv. gråænder, krikænder, pibeænder og skeænder fra levende vilde fugle fra Sydvestjylland. 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 (tabel 4). Godt halvdelen af de undersøgte pools bestod af prøver fra gråænder, og de bidrog med 58 % af de influenza A virus positive pools. Gråænder, krikænder og pibeænder stod tilsammen for 92 % af de positive pools.

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 2019. 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, Falster, 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=46) (tabel 2).

Der blev udtaget prøver i 1. kvartal og 3.-4. kvartal af 2019. Som nævnt var ingen af prøverne fra 1. kvartal positive for influenzavirus. Derimod var 58 % af pools fra 3. kvartal positive for influenzavirus (n=34), mens 20 % af pools fra 4. kvartal var positive (n=36). Andelen af pools der var positive fordelte sig tilsvarende i 2016-2018.

Tabel 4. PCR resultater for de testede pools fra den aktive overvågning af AI 2019.

	I alt	Levende fugle	Nedlagt fjervildt	Gråænder	Krikænder	Pibeænder
Antal pools	238	136	102	93 (39 %)**	20 (8 %)**	20 (8 %)**
AI PCR positiv	70 (29 %)	34	36	40 (57 %)**	13 (19 %)**	11 (16 %)**
H5 LPAI	4 (6 %)*	4	0	1 (25 %)**	1 (25 %)**	1 (25 %)**
H7 LPAI	0	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. H5 LPAI blev påvist i pools fra hhv. skeænder, gråænder, krikænder og pibeænder.

Virusisolater

Hæmagglutinerende virus (virusisolater) kunne isoleres efter podning i embryonerede hønseæg fra 22 pools fra levende vilde fugle i den aktive overvågning 2019. Otte virus var AI virus og 14 var aviær paramyxovirus (PMV) (bilag 3).

Virus kunne endvidere isoleres fra to indsendelser med mistanke om AI virus som følge af påvisning af H5/H7 antistoffer i rutineovervågningsprøver, og bekræftede dermed påvisning af hhv. H5N1 og H7N7 LPAI virus med PCR og sekventering direkte på mistankeprøverne. Endvidere kunne hhv. H4N6 og H10N7 virus isoleres fra indsendelser af gråænder til den virologiske rutineovervågning af AI virus i fjervildt opdræt (bilag 3).

Aviær influenza

Ved subtypning af AI virusisolaterne fra den aktive overvågning i vilde fugle blev der fundet virus med følgende subtyper: H1N1 (n=1), H4N6 (n=1), H6N2 (n=1), H6N5 (n=2), H10N7 (n=1) og H13N8 (n=1) (Bilag 3). H13N8 blev isoleret fra en sølvmåge og var nært beslægtet med måge virussekvenser. De øvrige virus blev isoleret fra svømmeænder og er almindeligt forekommende subtyper. H10N7 var beslægtet med aviære virus fra fugle og fra sæludbruddet med H10N7 i 2014.

Succesraten for isolation af AI virus i æg var 10 % ud af de PCR positive pools, hvilket er lidt under niveau for de seneste år, hvor succesraten har været omkring 20-25 %. Årsagen til den lavere succes er ukendt.

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 de øvrige PMV typer.

Der blev påvist avirulent PMV-1 virus (n=2), PMV-4 (n=8) og PMV-6 (n=4) i prøver fra den aktive overvågning i vilde fugle (bilag 3). Alle typer 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 2015-19 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, men andelen og antallet af AI viruspositive pools i 2019 var på niveau med de foregående år. Succesraten for isolering af virus i æg var noget lavere end de foregående år.

Antallet og andelen af H5 positive pools var ligesom i 2018 markant lavere end de foregående år. Der blev kun fundet 4 pools med H5 LPAI virus, fra hhv. skeænder, gråænder, krikænder og pibeænder.

I de foregående 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 påvisninger 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. Årsagen til nedgangen i påviste LPAI H5 virus er uklar, 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 vildfuglebestanden. En anden mulighed kunne være at cirkulerende LPAI H5 virus ikke kan detekteres tilstrækkeligt sensitivt med de anvendte PCR subtypningsassays. For at undersøge om nedgangen i påvisning af H5 virus skyldtes mutationer i følsomme områder af genomet testede vi i 2018 et større udvalg af prøverne en ekstra gang med et bredt detekterende H5 konventionelt PCR assay, som er mindre følsomt overfor mutationer end de real-time PCR assays, der sædvanligvis bruges til screening for H5 AI virus. Resultatet af de konventionelle tests bekræftede real-time RT-PCR resultaterne og indikerede dermed at nedgangen ikke skyldtes reduceret sensitivitet af testen. Endvidere har der ikke været rapporter på europæisk plan om forekomst af virus med afvigende sekvenser i de områder af virus, der er essentiel for sensitiviteten af de anvendte real time PCR tests.

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 2014-19 i vilde fugle, aktiv overvågning. PCR screeningsresultater på primærmateriale og succesrate for dyrkning af AI virus i æg.

	2015		2016		2017		2018		2019	
	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]	fugle	prøver [#]
Nedlagt fjervildt*	494	100	377	80	445	96	404	97	470	102
Levende fugle**	479	164	544	163	451	152	462	154	422	136
I alt	973	264	921	243	896	248	866	251	892	238
PCR positive	-	72 (27 %)	-	50 (21 %)	-	73 (29 %)	-	57 (23 %)	-	70 (29 %)
H5 LPAI	-	20 (28 %)	-	12 (24 %)	-	15 (21 %)	-	1 (2 %)	-	4 (6 %)
H7 LPAI	-	1 (1 %)	-	1 (2 %)	-	0	-	0	-	0
AI VI positive	-	11 (15 %)	-	11 (22 %)	-	14 (19 %)	-	17 (30 %)	-	8 (11 %)

[#] 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 mangler opdatering

Til subtypning og patogenicitetsbestemmelse af H5 virus anvendes EU anbefalede specifikke RT-PCR assays rutinemæssigt til AI diagnostik og overvågning på SSI. Influenzavirus muterer konstant, og kan mutere i en sådan grad, at de anvendte assays ikke vil kunne detektere virus længere. Ved at overvåge sekvenserne af virus, kan man følge med i om der er virus, der gradvist muterer således at de anvendte assays ikke kan bruges med sikkerhed.

Overvågningen i Danmark tilvejebringer værdifuld information om de virus der er udbredt i flere danske fuglebestande. Baseret på sekvenser fra de påviste danske H5 virus er udført en analyse af de H5 subtypnings assays der anvendes til både beredskab og (Slomka et al. 2007a; Slomka et al. 2007b; Slomka et al. 2012). Mens EURL overvåger de anbefalede assays anvendelighed på europæisk plan, er vores analyse målrettet de LPAI H5 virus, der er udbredt i de danske fuglebestande.

For hvert RT-PCR assay blev H5 Ct værdien for hver prøve korreleret til pan influenza detektions assay resultatet ("AI-matrix" Ct-værdien) (Bilag 4). Jo større forskellen er på Ct-værdien for H5 i forhold til matrix, jo mindre sensitivt er H5 assayet overfor det pågældende virus.

Analysen indikererede, 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 sekventering. 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 selv 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 H5 LPAI virus i vilde fugle fra fire pools af kloaksvabere fra hhv. gråænder, krikænder, pibeænder eller skeænder. Alle var fra den aktive overvågning i levende vilde fugle indsamlet af SNM. Fuldlængde sekventering blev foretaget med NGS teknik på de fire prøver, og sekvenserne er sammenlignet med sekvenser fra H5 LPAI virus fra de tidligere år i figur 4.

I 2019 blev der påvist H5LPAI virus i en hønsebesætning og en gråandebesætning. Sekvenser af HA genet fra disse virus er sammenlignet med HA-sekvenser fra virus fra vilde fugle, tidligere danske udbrud i fjerkræ, H5

LPAI virus fra et udbrud i januar 2020 i en hønsebesætning, og de tættest beslægtede virus med sekvenser der var tilgængelige i offentligt tilgængelige sekvensdatabaser (GenBank og GISAID).

Den fylogenetiske analyse viser, at H5 generne fra prøverne fra de to udbrud i 2019 og udbruddet i 2020 er tæt beslægtet med hinanden, og med danske og europæiske virus fra vilde fugle og fjerkræ.



Figur 4. Fylogenetisk analyse af danske LPAI H5 virus fra vilde fugle og fjerkræ. Sekvenser fra H5 virus fra vilde fugle, Danmark 2019, er med rød tekst. Sekvenser fra virus påvist i fjerkræ 2019-20 er markeret med grønt. Træet er baseret på ca. 1500 bp fragment fra HA-genet. w=vild fugl. c=kommercielt fjerkræ.

H5 HPAI diversitet

Der er udført fuldlængde sekventering af HA genet fra HPAI H5N6 virus der blev påvist i en dødfunden musvåge i januar 2019 i den passive overvågning af AI virus i vilde fugle. Molekylærfylogenetisk analyse (figur 6) viste, at dette virus var nært beslægtet med de danske HPAI H5N6 virus fra 2018 og med samtidige HPAI H5 clade 2.2.4.4b virus fra andre europæiske lande. De danske HPAI H5N6 virus fra 2018-19 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 danske HPAI H5N6 subtype virus indikerer, at det er det samme HPAI virus der har cirkuleret i vilde fugle i Danmark i 2018 (Liang et al. 2021).



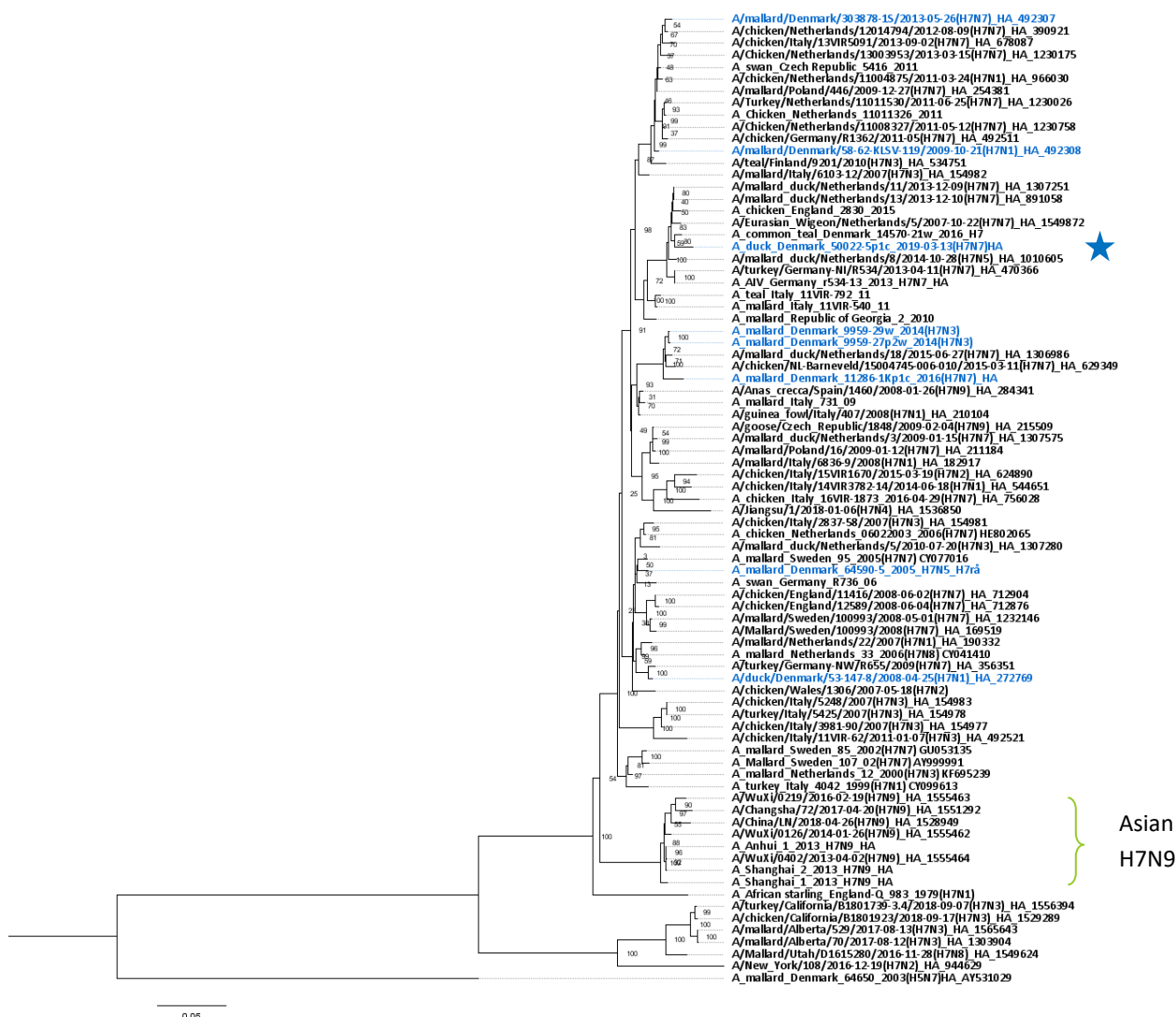
Figur 5. Fylogenetisk analyse af danske fuldlængde HPAI H5 gensekvenser fra vilde fugle. Sekvenser af HA-genet fra et repræsentativt udvalg af H5N6 HPAI virus fra vilde fugle i Danmark 2018-2019 er fremhævet med blå tekst. Træet er baseret på 1697 bp fragmenter fra HA-genet.

H7 diversitet

Der er ikke påvist H7 virus i vilde fugle siden 2016. 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 2019. Fylogenetisk analyse af de danske H7 virus viser at de 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 januar 2019 og før det i 2016, 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.

Der har ikke været fokus på H9 virus i årets overvågning men alle AI virusisolater fra overvågningen i vilde fugle 2019 er subtypet ved sekventering af HA og NA generne. Ingen AI virus isolater var H9 subtype (bilag 3). Baseret på HA sekvenserne, var de danske H9N2 virus, der blev påvist nogle år tilbage, 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 to udbrud af LPAI H5N1 virus og et udbrud med LPAI H7N7 virus i danske fjerkræbesætninger i 2019. I alle tilfælde begrænsede udbruddene sig til index besætningerne. Det ene H5N1 udbrud var i opdrættede gråænder og blev påvist i rutineovervågningsprøver i forbindelse med den virologiske overvågning af fjervildt opdræt, mens de to øvrige udbrud blev påvist ved opfølgning på påvisning af H5/H7 antistoffer i rutineovervågningsprøver fra hhv. høns og farmede gråænder. Der er intet der tyder på at udbruddene var relaterede. Desuden er der påvist influenza A virus andre end H5/H7 i to rutine overvågningsindsendelser fra den virologiske overvågning af fjervildtopdræt, disse virus blev subtypet til hhv. H4N2 og H10N7, begge var fra gråandeopdræt.

I den virologiske screening af rutine overvågningsprøver fra fjervildtopdræt i 2019 blev i alt undersøgt 255 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 DK-VET. Formålet var at påvise LPAI H5/H7 virus, for at undgå udslip til den vilde fauna og spredning til andre fjerkræbesætninger, og for at undgå at disse skulle udvikle sig til HPAI. Der blev påvist Influenza A virus i tre indsendelser fra gråandeopdræt. Virus blev subtypet til hhv. H5N1 LPAI, H4N2 og H10N7 (tabel 8).

Tabel 7. Oversigt over antal indsendelser til den virologiske overvågning af opdrættet fjervildt i perioden 2006-2019. Modificeret fra Hjulsager et al. 2012b.

Indsendelser	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016	2017	2018	2019
Antal	ca. 250	395	362	333	307	258	272	267	255	256	260	274	268	255
AI virus positive	7	2	4	7	0	4	0	3	6	2	4	2	2	3
AI H5/H7* positive	3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	1	1

*alle er LPAI.

Der har været 13 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=1), februar (n=4), marts (n=1), april (n=1), maj (n=3), juni 8 (n=1), september (n=1), december (n=1). Én besætning fik påvist H5/H7 antistoffer to gange i hhv. februar og juni måned. 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.

Til sammenligning var der 18 AI laboratoriemistanker i 2018, hvoraf flere af de seropositive indsendere var gengangere med gentagne påvisninger af H5/H7 antistoffer over tid i den samme besætning. De 18 serologiske mistanker i 2018 fordelte sig på 9 besætninger med hhv. 6 (n=1), 3 (n=1), 2 (n=2) eller 1 (n=5) indsendelser. I 2017 og 2016, var der hhv. 5 og 10 seropositive rutineovervågningsindsendelser.

Der blev påvist hhv. H5 og H7 cirkulerende virus i to besætninger efter påvisning af antistoffer i rutineovervågningsprøver (Besætning A og B, tabel 8). I 2018 blev der ligeledes påvist cirkulerende H5 LPAI virus i en hønseflok efter påvisning af H5 antistoffer, det er ellers sjældent at det lykkes at påvise cirkulerende H5/H7 virus efter påvisning af H5/H7 antistoffer, muligvis fordi antistofferne ofte skyldes en gammel infektion med H5/H7 virus, som ikke længere udskilles af dyrene.

De viruspositive fjerkræbesætninger blev fundet enten som følge af antistofpåvisning i rutine overvågningsprøver eller som led i den virologiske overvågning af fjervildt opdræt. De er alle gengangere fra tidligere år. Det er de samme besætninger som får påvist virus år efter år.

Tabel 8. AI virus positive indsendelser fra fjerkræbesætninger i 2019.

Besætnings-ID	Indsendelse	Udtagelsesdato for svaberprøver	Fugleart	Indsendelsesårsag	Virus	AI positiv prøve
A	19-2804	27-02-2019	Høns	Antistofpåvisning	H5N1 LPAI	K
B	2019-50022	13-03-2019	Gråænder	Antistofpåvisning	H7N7 LPAI	K
C	2019-50250	25-06-2019	Gråænder	Fjervildt	H5N1 LPAI	K
D	2019-50308	08-07-2019	Gråænder	Fjervildt	H4N2	K+S
E	2019-50383	29-07-2019	Gråænder	Fjervildt	H10N7	K+S

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.

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
- EFSA (European Food Safety Authority), ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), EURL (European Reference Laboratory on Avian Influenza), Brown I, Kuiken T, Mulatti P, Smietanka K, Staubach C, Stroud D, Therkildsen OR, Willeberg P, Baldinelli F, Verdonck F and Adlhoch C, 2017. Scientific report: Avian influenza overview September - November 2017. *EFSA Journal* 2017;15(12):5141, 70 pp. doi:10.2903/j.efsa.2017.5141
- 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.
- 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.

- Liang, Y., Krog, J.S., Ryt-Hansen, P., Pedersen, A.G., Kvisgaard, L.K., Holm, E., Nielsen, P.D., Hammer, A.H., Madsen, J.J., Thorup, K., Larsen, L.E., Hjulsgaard, C.K., 2021. Molecular Characterization of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses H5N6 Detected in Denmark in 2018-2019. *Viruses* 2021, 13, 1052.
- 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. *Emerg. Infect. Dis.* 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 2019 – passiv overvågning

Kategori	Tilstand	Art	VET sagsnr.	Fundsted (Kommune)	Indsamlingsdato	Resultat
FA-04469	Død	Knopsvane	19-00421-01	Næstved	01-01-2019	Negativ
	Død	Musvåge	19-00609-02	Sønderborg	01-01-2019	Negativ
	Død	Rød Glente	19-00609-01	Sønderborg	01-01-2019	Negativ
FA-04492	Død	Tårnfalk	19-00611-01	Faxe	03-01-2019	Negativ
FA-04494	Død	Tårnfalk	19-00610-01	Skanderborg	03-01-2019	Negativ
FA-04493	Død	Musvåge	19-00613-01	Odsherred	04-01-2019	H5N6 HPAI
	Død	Vandrefalk	19-00835-01	Køge	15-01-2019	Negativ
FA-04499	Død	Musvåge	19-00809-01	Gribskov	16-01-2019	Negativ
FA-04501	Død	Musvåge	19-00822-01	Holbæk	17-01-2019	Negativ
FA-04507	Død	Musvåge	19-00828-01	Esbjerg	20-01-2019	Negativ
FA-04504	Død	Musvåge	19-00825-01	Guldborgsund	20-01-2019	Negativ
FA-04506	Død	Svartbag	19-00826-01	Slagelse	21-01-2019	Negativ
FA-04505	Død	Blå Kærhøg	19-00827-01	Ringsted	21-01-2019	Negativ
FA-00002	Død	Lomvie	19-00831-02	Jammerbugt	22-01-2019	Negativ
FA-04508	Død	Lomvie	19-00831-01	Jammerbugt	22-01-2019	Negativ
FA-04509	Død	Sangsvane	19-00833-01	Billund	22-01-2019	Negativ
FA-00004	Død	Alk	19-00831-04	Jammerbugt	22-01-2019	Negativ
FA-00003	Død	Alk	19-00831-03	Jammerbugt	22-01-2019	Negativ
FA-04511	Død	Musvåge	19-01221-01	Guldborgsund	23-01-2019	Negativ
FA-04512	Død	Knopsvane	19-01222-01	Guldborgsund	24-01-2019	Negativ
	Død	Fjeldvåge	19-02146-01	Lolland	26-01-2019	Negativ
FA-04517	Død	Skarv	19-01227-01	Langeland	28-01-2019	Negativ
FA-04516	Død	Skarv	19-01226-01	Langeland	28-01-2019	Negativ
FA-04515	Død	Skarv	19-01225-01	Langeland	28-01-2019	Negativ
FA-04518	Død	Musvåge	19-01224-01	Rebild	28-01-2019	Negativ
FA-04519	Død	Musvåge	19-01230-01	Slagelse	30-01-2019	Negativ
FA-04520	Død	Musvåge	19-01231-01	Odsherred	30-01-2019	Negativ
FA-04521	Død	Musvåge	19-01238-01	Sorø	03-02-2019	Negativ
	Død	Vandrefalk	19-02155-01	Guldborgsund	04-02-2019	Negativ
FA-04522	Død	Musvåge	19-01239-01	Roskilde	05-02-2019	Negativ
FA-04524	Død	Duehøg	19-01965-01	Vordingborg	11-02-2019	Negativ
FA-04525	Død	Musvåge	19-01964-01	Guldborgsund	11-02-2019	Negativ
FA-04523	Død	Musvåge	19-01963-01	Guldborgsund	11-02-2019	Negativ
FA-04526	Død	Musvåge	19-02144-01	Herning	15-02-2019	Negativ
	Død	Havørn	19-02141-01	Lolland	15-02-2019	Negativ
FA-99989	Død	Sangsvane	19-02148-01	Silkeborg	16-02-2019	AIV ikke H5/H7
FA-04528	Død	Sangsvane	19-02147-01	Silkeborg	16-02-2019	Negativ
FA-04527	Død	Musvåge	19-02145-01	Ringkøbing-Skjern	18-02-2019	Negativ
FA-04562	Død	Musvåge	19-02164-01	Silkeborg	18-02-2019	Negativ
FA-04530	Død	Stormmåge	19-02153-01	Faxe	20-02-2019	Negativ
FA-04531	Død	Gråkrage	19-02154-01	Faxe	20-02-2019	Negativ
FA-04557	Død	Skarv	19-02162-01	Faaborg-Midtfyn	21-02-2019	Negativ
FA-04536	Død	Knopsvane	19-02163-01	Hørsholm	21-02-2019	Negativ
	Død	Musvåge	19-02166-01	Sorø	23-02-2019	Negativ
	Død	Musvåge	19-02166-02	Sorø	23-02-2019	Negativ
FA-04565	Død	Musvåge	2019-50011-02	Nordfyns	28-02-2019	Negativ
FA-04564	Død	Musvåge	2019-50011-01	Nordfyns	28-02-2019	Negativ
FA-04567	Død	Spurvehøg	2019-50012-01	Vesthimmerlands	02-03-2019	Negativ
FA-04573	Død	Musvåge	2019-50019-01	Varde	10-03-2019	Negativ
FA-04575	Død	Spurvehøg	2019-50020-01	Egedal	11-03-2019	Negativ
FA-04576	Død	Rød Glente	2019-50032-01	Guldborgsund	12-03-2019	Negativ
FA-04579	Død	Sølvmåge	2019-50028-01	Helsingør	12-03-2019	Negativ
FA-04577	Død	Sølvmåge	2019-50027-01	Helsingør	12-03-2019	Negativ
FA-04580	Død	Knopsvane	2019-50033-01	Lolland	18-03-2019	Negativ
FA-04581	Død	Musvåge	2019-50021-01	Holbæk	19-03-2019	Negativ
FA-04583	Død	Husskade	2019-50044-01	Mariagerfjord	24-03-2019	Negativ
FA-04588	Død	Spurvehøg	2019-50043-01	Mariagerfjord	24-03-2019	Negativ
FA-04587	Død	Skarv	2019-50040-01	Lolland	27-03-2019	Negativ
FA-04589	Død	Knopsvane	2019-50045-01	Ringkøbing-Skjern	01-04-2019	Negativ
FA-04601	Død	Musvåge	2019-50058-01	Ringsted	15-04-2019	Negativ
FA-04604	Død	Hættemåge	2019-50063-01	Kolding	15-04-2019	Negativ
FA-04602	Død	Måge	2019-50062-01	Kolding	15-04-2019	Negativ
FA-04605	Død	Musvåge	2019-50074-01	Kolding	20-04-2019	Negativ
FA-04606	Død	Musvåge	2019-50074-02	Kolding	20-04-2019	Negativ
	Død	Havørn	2019-50066-01	Vordingborg	24-04-2019	Negativ
FA-04607	Død	Musvåge	2019-50075-01	Holbæk	30-04-2019	Negativ

Kategori	Tilstand	Art	VET sagsnr.	Fundsted (Kommune)	Indsamlingsdato	Resultat
FA-04610	Død	Musvåge	2019-50124-01	Randers	25-05-2019	Negativ
FA-04609	Død	Blishøne	2019-50123-01	Gentofte	27-05-2019	Negativ
FA-04608	Død	Musvåge	2019-50125-01	Guldborgsund	27-05-2019	Negativ
FA-04611	Død	Musvåge	2019-50152-01	Syddjurs	10-06-2019	Negativ
FA-04612	Død	Allike	2019-50172-01	Ikast-Brande	12-06-2019	Negativ
	Død	Sølvmåge	2019-50325-02	Vordingborg	09-07-2019	Negativ
	Død	Sølvmåge	2019-50325-03	Vordingborg	09-07-2019	Negativ
	Død	Sølvmåge	2019-50325-04	Vordingborg	09-07-2019	Negativ
	Død	Sølvmåge	2019-50325-01	Vordingborg	09-07-2019	AIV ikke H5/H7
	Død	Sølvmåge	2019-50326-01	Vordingborg	09-07-2019	Negativ
	Død	Sølvmåge	2019-50326-02	Vordingborg	09-07-2019	Negativ
	Død	Sølvmåge	2019-50326-03	Vordingborg	09-07-2019	Negativ
FA-04618	Død	Sølvmåge	2019-50339-03	Jammerbugt	11-07-2019	Negativ
FA-04617	Død	Sølvmåge	2019-50339-02	Jammerbugt	11-07-2019	Negativ
FA-04616	Død	Sølvmåge	2019-50339-01	Jammerbugt	11-07-2019	Negativ
FA-04621	Død	Husskade	2019-50379-01	Solrød	23-07-2019	Negativ
FA-04632	Død	Gråand	2019-50405-05	København	31-07-2019	Negativ
FA-04633	Død	Gråand	2019-50405-06	København	31-07-2019	Negativ
FA-04630	Død	Blishøne	2019-50405-03	Rødovre	31-07-2019	Negativ
FA-04631	Død	Blishøne	2019-50405-04	Rødovre	31-07-2019	Negativ
FA-04629	Død	Hættemåge	2019-50405-02	København	31-07-2019	Negativ
FA-04628	Død	Gråand	2019-50405-01	København	31-07-2019	Negativ
FA-04634	Død	Gråand	2019-50423-01	Holbæk	05-08-2019	Negativ
FA-04635	Død	Gråand	2019-50423-02	Holbæk	05-08-2019	Negativ
FA-04652	Død	Knopsvane	2019-50424-01	Viborg	06-08-2019	Negativ
	Død	Hvepsevåge	2019-50494-01	Holbæk	23-08-2019	Negativ
FA-04655	Død	Sølvmåge	2019-50488-01	København	29-08-2019	Negativ
FA-04656	Død	Knopsvane	2019-50489-01	Sønderborg	31-08-2019	Negativ
FA-04657	Død	Krikand	19-50490-01	København	03-09-2019	Negativ
FA-04658	Død	Gråand	2019-50491-01	Hvidovre	05-09-2019	Negativ
	Død	Havørn	2019-50512-01	Svendborg	07-09-2019	Negativ
FA-04659	Død	Sølvmåge	2019-50517-01	Frederikshavn	15-09-2019	Negativ
FA-04660	Død	Råge	2019-50539-01	Herning	24-09-2019	Negativ
FA-04661	Død	Skarv	2019-50544-01	Aarhus	25-09-2019	Negativ
FA-04662	Død	Spurvehøg	2019-50563-01	Haderslev	02-10-2019	Negativ
FA-04665	Død	Hættemåge	SAG-02019-050569-01	Skive	14-10-2019	Negativ
FA-04667	Død	Rød Glente	SAG-01815-F2F4C7-01	Næstved	03-11-2019	Negativ
	Død	Duehøg	SAG-01943-H0P1M3-01	Fredensborg	09-11-2019	Negativ
FA-04669	Død	Blishøne	SAG-01919-X7Y8TO-01	Aalborg	17-11-2019	Negativ
FA-04675	Død	Slørugle	SAG-01955-N7D1P9-01	Kolding	18-11-2019	Negativ
FA-04674	Død	Slørugle	SAG-01954-D8B5W3-01	Kolding	18-11-2019	Negativ
FA-04676	Død	Musvåge	SAG-02034-X8X5H6-01	Næstved	21-11-2019	Negativ
	Død	Duehøg	SAG-02138-G4G5L0-01	Tønder	22-11-2019	Negativ
FA-04677	Død	Hættemåge	SAG-02188-W5Y5M2-01	Struer	07-12-2019	Negativ
FA-04678	Død	Skarv	SAG-02216-V3C8Q2-01	København	10-12-2019	Negativ
Ialt		111				1 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 2019 – 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	1	0	0	0
1	KBH	Levende	gråand	1	4	0	0	0
1	KBH	Levende	troidand	1	4	0	0	0
3	Fyn	Levende	Knopsvane	1	1	0	0	0
3	Fyn	Levende	Vandrefalk	1	1	0	0	0
3	Jylland	Nedlagt	Gråand	21	102	16	0	2xPMV6
3	Jylland	Levende	Gråand	2	7	1	1	0
3	Jylland	Levende	Krikand	9	34	7	0	H6N5, 2xPMV1
3	Jylland	Levende	Pibeand	2	5	1	0	1xPMV4
3	Jylland	Levende	Skeand	2	4	1	1	0
3	Sjælland	Nedlagt	Gråand	12	50	7	0	1xH10N7, 1xH4N6, 2xPMV4, 2xPMV6
3	Sjælland	Levende	Dværgfalk	1	1	1	0	0
3	Sjælland	Levende	Spurvehøg	8	12	0	0	0
4	Fyn	Nedlagt	Fasan	8	40	0	0	0
4	Fyn	Nedlagt	Gråand	24	100	5	0	1xH1N1, 1xH6N2
4	Fyn	Levende	Blisshøne	1	1	0	0	0
4	Fyn	Levende	Gråand	3	6	1	0	0
4	Fyn	Levende	Hættemåge	2	7	0	0	0
4	Fyn	Levende	Knopsvane	3	6	0	0	0
4	Fyn	Levende	Krikand	2	2	1	0	0
4	Jylland	Nedlagt	Gråand	10	48	2	0	0
4	Jylland	Levende	Gråand	9	24	2	0	0
4	Jylland	Levende	Knarand	1	1	0	0	0
4	Jylland	Levende	Krikand	9	30	5	1	H6N5, 2xPMV4
4	Jylland	Levende	Pibeand	17	68	10	1	0
4	Jylland	Levende	Skovsneppe	1	2	0	0	0
4	Jylland	Levende	Spidsand	3	3	0	0	0
4	Jylland	Levende	Stormmåge	10	48	0	0	0
4	KBH	Levende	Grågås	7	35	0	0	0
4	Sjælland	Nedlagt	Fasan	16	80	0	0	0
4	Sjælland	Nedlagt	Gråand	11	50	6	0	3xPMV4
4	Sjælland	Levende	Bramgås	12	48	1	0	0
4	Sjælland	Levende	Gråand	1	2	0	0	0
4	Sjælland	Levende	mosehornugle	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Musvåge	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Pibeand	1	2	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Råge	2	8	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Spidsand	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Spurvehøg	12	19	2	0	0
4	Sjælland	Levende	Stor præstekrave	1	1	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Stormmåge	3	15	0	0	0
4	Sjælland	Levende	Sølvmåge	4	17	1	0	H13N8
I alt				238	892	70	4	7 AIV, 14 PMV

Lokalitet: KBH, Hovedstadsområdet postnr. 1xxx, 2xxx; Sjælland, inkl. Falster 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.

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. Virusisolat-oversigter

AI virusisolater fra den passive og aktive AI overvågning, fjervildtopdræt-overvågningen og AI mistanker i 2019. 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	H1N1	Gråand	2019-50555-15	Ikke H5/H7
H4	H4N6	Gråand	2019-50515-16	Ikke H5/H7
	H4N6	Gråænder i opdræt ^c	2019-50308	Ikke H5/H7
H5	H5N1	Høns ^c	19-2804-8/2019-50116	H5N1 LPAI
H6	H6N2	Gråand	SAG-01647-17	Ikke H5/H7
	H6N5	Krikand	SAG-01564-9	Ikke H5/H7
	H6N5	Krikand	2019-50538-19	Ikke H5/H7
H7	H7N7	Gråænder ^c	2019-50022-5	H7N7 LPAI
H10	H10N7	Gråand	2019-50513-14	Ikke H5/H7
	H10N7	Gråænder i opdræt ^c	2019-50383-11	H10N7
H13	H13N8	Sølvmåge	SAG-02242-11	Ikke H5/H7

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

Virus fra overvågningen i vilde fugle og fjerkræ i 2019 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 (CS), samt AI subtype fundet ved PCR direkte på originalmaterialet.

Virus	Art	Prøve-id	AI subtype på originalmateriale	PMV-1 CS aminosyre sekvens
PMV-1	Krikand	2019-50521-13	AIV, ikke H5/H7	GRQGRL, avirulent
PMV-1	Krikand	2019-50527-11	AIV, ikke H5/H7	GKQGRL, avirulent
PMV-1	Gråænder i opdræt ^c	2019-50308-11S	AIV, ikke H5/H7	GKQGRL, avirulent
PMV-4	Pibeand	2019-50538-23	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Gråand	2019-50515-15	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Gråand	2019-50513-15	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Krikand	2019-50557-6	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Gråand	SAG-01586-16	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Gråand	SAG-01586-17	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Gråand	SAG-01588-15	AIV, ikke H5/H7	
PMV-4	Krikand	SAG-01823-39	AIV, ikke H5/H7	
PMV-6	Gråand	2019-50514-16	AIV, ikke H5/H7	
PMV-6	Gråand	2019-50515-14	AIV, ikke H5/H7	
PMV-6	Gråand	2019-50534-53	AIV, ikke H5/H7	
PMV-6	Gråand	2019-50534-59	AIV, ikke H5/H7	

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	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
-	A/duck/Denmark/65047/04(H5N2)HA_DQ251447	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGACGGTTGGTA
24,0	A/mallard/Denmark-4200/16131-3w/10-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
29,0	A/common_teal/Denmark-6851/16120-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
24,3	A/mallard/Denmark-4930/16157-3w/11-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,3	A/common_teal/Denmark-6851/16116-2w/09-2012(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,1	A/mallard/Denmark-7330/13848-52w/11-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4900/12225-27w/10-2014(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,8	A/mallard/Denmark-4733/16917-59w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
14,9	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGCTGGTA
30,4	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5853/18397-57w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,1	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,4	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATCGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32,0	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	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)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
31,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	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)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	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)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	-----	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32	A/Eurasian_teal/Denmark/16147-7w/2017-10-11(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
27	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-22w/2017-10-01(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/mallard/Denmark/16246-47w/2017-10-16(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
33	A/barnacle_goose/Denmark/19473-27/2017-12-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26	A/barnacle_goose/Denmark/19473-29/2017-12-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30	A/mallard/Denmark/15399-8w/2017-11-13(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26	A/Eurasian_teal/Denmark/14704-20w/2017-10-01(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28	A/mute_swan/Denmark/17734-4/2017-11-18(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
32	A/Northern_pintail/Denmark/15396-36/2017-10-20(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
36	A/mallard/Denmark/15467-58w/2017-10-09(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,8	A/duck/Denmark/6504-5c/2018-05-03(H5)	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
23,2	A/mallard/Denmark/8625-1Kc/2018-06-20(H5N2)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,3	A/chicken/Denmark/2804-8p2c/2019-02-27(H5N1)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
25,5	A_mallard_Denmark_50492-10w_2019-09-01(H5N9)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,0	A_Northern_shoveler_Denmark_50520-6w_2019-09-14(H5)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
28,9	A_Eurasian_teal_Denmark_S01823-40w_2019-11-03(H5N2)HA	GCTCCAGAATATGCATACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
30,9	A_Eurasian_wigeon_Denmark_S01823-43w_2019-11-03(H5)HA	GCTCCAGAATATGCATATAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
26,4	A_mallard_Denmark_50250-11Kc_2019-06-25(H5N1)HA	GCTCCAGAATATGCGTACAAAATTGTC	CAAGGCATGGTAGATGGTTGGTA
35,1	A_chicken_Denmark_S02750-3_2020-01-28(H5N1)HA_1694134	GCTCCAGAATATGCGTACAAAATTGTC	CAAGGAATGGTGGATGGTTGGTA

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 CAGTATTTCAG	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 GCA TTATTCAG	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)	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTT CT TAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,9	16,5	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4p2w/09-2015(H5N3)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	36,7	A/Eurasian teal/Denmark-6280/16946-4w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA TATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	33,0	A/mallard/Denmark-4920/21255-11w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	33,7	A/mallard/Denmark-4733/16917-57w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,1	37,9	A/mallard/Denmark-6851/17051-13w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,4	32,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-52w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,5	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18954-13w/10-2015(H5)	ACATA CGA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
27,1	33,1	A/mallard/Denmark-5853/18397-56w/10-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGG T AA AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,3	A/mallard/Denmark-5300/22541-55w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark-4200/21256-23w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34,6	38,6	A/mallard/Denmark-8450/17093-51w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,3	37,8	A/mallard/Denmark-8450/17093-55w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,3	37,6	A/Eurasian teal/Denmark-6851/17118-10w/09-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
29,6	0,0	A/Eurasian teal/Denmark-6851/18396-15w/10-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
32,0	35,9	A/mallard/Denmark-5300/22541-54w/11-2015(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA TATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
14,3	21,7	A/mallard/Denmark/11887-1Kp2/2016(H5N2)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	34,0	A/mallard/Denmark/14671-42w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/14671-43w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,0	35,0	A/mallard/Denmark/14671-44w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/14671-47w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA ATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35,0	0,0	A/mallard/Denmark/14824-79w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,9	0,0	A/mallard/Denmark/18314-40w/2016(H5)	ACATATGA TT ACT CG CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,0	A/mallard/Denmark/19080-43w/2016(H5)	ACATATA AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33,0	0,0	A/mallard/Denmark/20546-18w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,0	36,6	A/mallard/Denmark/20546-19w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
31,0	37,5	A/mallard/Denmark/20546-20w/2016(H5)	ACATATGA TT ACCC GCA ATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
34	37,4	A/mallard/Denmark/16246-46/2017-10-16(H5)	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
33	0	A/mallard/Denmark/17731-7/2017-11-23(H5)	ACATAT AA TTACCC G CAATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
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 GCA TATTTCAG	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 AT TT ACCC 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 GCA ATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
25,5	31,18	A_mallard_Denmark_50492-10w_2019-09-01(H5N9)HA	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATAGTAGCTGGTCT
35,0	37,0	A_Northern_shoveler_Denmark_50520-6w_2019-09-14(H5)HA	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
28,7	30,1	A_Eurasian_teal_Denmark_S01823-40w_2019-11-03(H5N2)HA	ACATATGA TT ACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
30,9	35,6	A_Eurasian_wigeon_Denmark_S01823-43w_2019-11-03(H5)HA	ACATAT AA TTACCC G CAGTATTTCAG	TCAACAGTGGCGAGTTCCTTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
26, 4	36,7	A_mallard_Denmark_50250-11Kc_2019-06-25(H5N1)HA	ACATAT AA TTACCC GCA ATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT
35, 1	0	A_chicken_Denmark_S02750-3_2020-01-28(H5N1)HA_1694134	ACATAT AA TTACCC GCA ATATTTCAG	TCAACAGTGGC A AGTTCCCTAGCA	GCAATCATGATAGCTGGTCT

H5CS

Ct AI-matrix	Ct H5CS	Virus/primernavn	H5CS-240L	H5CS-240ProIno	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)	AACACCAAGTGCCAACTCC	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)	-CACCAAGTGTCAAACCTCC	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	TGTTTGGGGCTATAGCAGGT
30,3	30,0	A/chicken/Denmark/2804-8p2c/2019-02-27(H5N1)HA	GACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
25,5	29,87	A_mallard_Denmark_50492-10w_2019-09-01(H5N9)HA	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
35,0	0	A_Northern_shoveler_Denmark_50520-6w_2019-09-14(H5)HA	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
28,9	31,2	A_Eurasian_teal_Denmark_S01823-40w_2019-11-03(H5N2)HA	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TATTTGGGGCTATAGCAGGC
30,9	33,51	A_Eurasian_wigeon_Denmark_S01823-43w_2019-11-03(H5)HA	GATACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATATGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
26,4	29,3	A_mallard_Denmark_50250-11Kc_2019-06-25(H5N1)HA	GACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC
35,1	37,0	A_chicken_Denmark_S02750-3_2020-01-28(H5N1)HA_1694134	AACACCAAGTGTCAAACCTCC	GGAATGCCCCAAATACGTGA	TGTTTGGGGCTATAGCAGGC

Bilag 5. Projektplan for overvågningen af AI i vilde fugle i Danmark 2019.

Projektplan vedr. overvågning af aviær influenza i vilde fugle i Danmark i 2019.

Pr. 1. marts 2019 er den virologiske del af beredskabet for aviær influenza overgået til Dansk Veterinær Konsortium (DK-VET), der udgøres af Statens Serum Institut (SSI) og Københavns Universitet (KU).

Overvågningsprøver modtaget før 1. marts er undersøgt på DTU Veterinærinstituttet (DTU-VET) og er omfattet af aftale mellem FVST og DTU-VET. Prøver modtaget fra 1. marts 2019 undersøges af DK-VET jf. Arbejdsprogram VET 2019. Kadavere indsendes til KU som forestår obduktion og prøveudtagelse og videresendelse af prøver til analyse på SSI. Svaberprøver indleveres på SSI som varetager alle laboratorieanalyser.

Vildfugleovervågningen i 2019 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.

I den aktive overvågning 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

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 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 svømmende (især gråand, krikand, pibeand), gæs, svaner og måger.

Projektet 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).

Frengangsmåde

Alle prøver, der skal indgå i den passive overvågning (1) og den aktive screening (2), indsendes til laboratoriet den førstkomende hverdag efter prøveudtagning.

De sidste prøver i den aktive overvågning skal være modtaget på DTU-VET senest 16. december kl. 10. Der kan maksimalt analyseres ca. 20 pools pr. uge, svarende til max. 100 fugle fra den aktive screening.

1) Passiv overvågning

Formålet 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.

Kadaverne indsendes til DK-VET (indtil 1. marts indsendes de til DTU-VET), og undersøgelsen foretages på en trachealsvaber og en kloaksvaber pr. fugl, disse kan pooles for hver fugl til én samlet prøve (pool) pr. fugl.

Tidshorisont, PCR resultat: 4 arbejdsdage efter modtagelse.

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 2019. 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 50 prøver. Prøverne er kloaksvabere, eller evt. fæcesvabere.

I fortsættelse af de tidligere års overvågning vil FVST udtage og indsamle kloaksvaberprøver fra nedlagte ænder (gråand, krikand, pibeand) og gæs (gerne kortnæbbet gås). I 2019 ønskes tillige øget fokus på fasaner fra området omkring Smålandsfarvandet/syd for Sjælland. Prøverne udtages fortrinsvist i perioden 1/9 – 1/12 2019 fra nedlagte vilde fugle indleveret på vildthåndteringsvirksomhederne Kivan Food, Alpevej Vildtbehandling og Klosterheden Vildt.

Prøverne indsamles som kloaksvaber enkeltprøver i kloakmedie (flerstyrkemedie) og pooler 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. Der skal være god sikkerhed for at fuglearten kan afgøres, dvs. klatter efter flokke af fugle der lige er lettet.

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.

Laboratoriemæssige undersøgelser

SSI udfører alle analyser pr. 1. marts 2019, dog udføres obduktioner og patologisk undersøgelse af patologer på Københavns Universitet. De laboratoriemæssige procedurer for den passive (1) og aktive (2) overvågning er i overensstemmelse med Kommissionens Afgørelse¹ og den diagnostiske manual (Beslutning 2006/437EU). Ikke alle metoder til uddybende molekylær karakterisering (3) er beskrevet i den diagnostiske manual. Det ønskede prøveantal fremgår af nedenstående skema.

1) Overvågning og tidlig påvisning af HPAI virus i døde vilde fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza A virus RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5- og H7-positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages opfølgende virusisolation af H5/H7 positive prøver. Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-typning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering. I en udbrudssituation foretages virusisolation kun på udvalgte prøver.

2) Screening for LPAI virus i levende vilde fugle, der udgør en forhøjet risiko med hensyn til aviær influenza inkl. undersøgelse af nedlagte fugle

Alle prøver undersøges med pan-influenza A virus RT-PCR.

Positive prøver undersøges med H5 og H7 specifik RT-PCR.

H5/H7 positive prøver patogenicitetsbestemmes ved sekventering.

Der foretages virusisolation på pan-influenza A virus positive prøver.

Virusisolater karakteriseres med HI-test (H-subtypning) og N-typning og/eller RT-PCR og sekventering.

3) Molekylær karakterisering

Udvalgte prøver fra den passive og aktive overvågning karakteriseres med sekvensanalyse og/eller RT-PCR af HA og evt. NA og øvrige gener. Der sigtes primært på karakterisering af H5 og H7 virus, sekundært på subtypebestemmelse af øvrige AI virus.

Løbende orientering om forløb

I 2. halvår indkalder FVST ved behov til møder (evt. i form af telefon- eller videolinkmøde) mellem FVST, SNM og DK-VET om status på prøveantal, fund, eventuelle omfordelinger hvis det forventede antal fugle indenfor formålene ikke kan opnås, etc. Ved fravær af møder orienterer parterne hinanden pr. mail månedligt.

Afrapportering

DK-VET, SSI, sender resultaterne af den passive overvågning til FVST i form af laboratoriesvar og indtaster endvidere resultaterne i databasen for "Proveresultater for fugleinfluenza". Resultaterne er hermed tilgængelige på den offentlige vildfugleoversigt på FVST hjemmeside.

FVST foretager de ½-årige pligtige afrapporteringer til EU/EFSA ultimo juli 2019 og ultimo januar 2020.

DK-VET udarbejder en samlet slutrapport med resultaterne af den passive og aktive overvågning. Slutrapporten foreligger på dansk senest ultimo marts 2020.

FVST orienteres straks ved fund af HPAI virus. Fund af LPAI H7N9-China-2013 afrapporteres ligeledes hurtigst muligt, men kræver molekylær karakterisering og kan tage op til 5 arbejdsdage fra påvisning af H7 subtype.

Oversigt over antal fugle og prøver i overvågning af AI i vilde fugle i Danmark 2019

Opgave	Antal fugle	Antal prøver (pools)
<i>Aktiv overvågning i levende vilde fugle (inkl. nedlagte)</i>		
SNM	430	145
FVST veterinærenheder (nedlagt fjervildt)	470	95
I alt	900	240
	Antal fugle (estimeret)	Antal prøver (estimeret)
<i>Passiv overvågning i døde vilde fugle</i>		
NS		
FVST, Veterinærenheder		
I alt	100	100

Kontaktpersoner

Charlotte K. Hjulsgaard, DK-VET, SSI

Lars E. Larsen, DK-VET, KU

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>	Dværggås
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>	Blisøne
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 kobbersnepe |
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 |