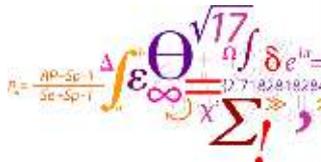


Svin som blandekar for inflenzavirus? Værtsreceptorer for inflenzavirus hos svin, fjerkræ og menneske

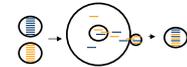
Ekspérimentel infektion med Dansk H1N2 svineinfluenza subtype

Ramona Trebbien, Dyr læge, PhD.

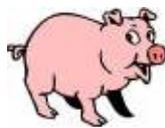


Grise og influenza A

- Svineinfluenza, endemisk i det meste af verden (H3N2, H1N1 og H1N2)
- Danmark: H3N2, H1N1 and H1N2
- Receptorer; Sialic acid (SA)- α -2,3-terminal saccharides (aviær) og 2,6 (human/svin) i øvre respirationsveje (Ito et al. 1998)
- Grise modtagelige for aviære og human influenza (eksperimentelle studier og rapporteringer fra felten).
- "Blandekar"/ "Mixing vessel"/Reassortment/skift



Værts receptorer



SA-2,6 og SA-2,3 trachea
(Ito et al. 1998)



SA-2,6 hovedsagligt
SA-2,3 ciliært, næsespithel og
alveolære epithelceller
(Shinya et al. 2006)



SA-2,3
hovedsagligt Men
SA-2,6 i trachea
(Kuchipudi et al. 2009)



SA-2,3
(Kuchipudi et al. 2009)

INFLUENZA A VIRUS HENHOLDSVIS AVIÆR OG SVINEINFLUENZA SAMT SIALIC ACID RECEPTORER I RESPIRATIONSVEJENE I EKSPERIMENTELT INFICEREDE GRISE

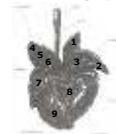
Spørgsmål

- Har grise begge receptorer (SA- α -2,3/2,6-terminal saccharide) i alle dele af luftvejene?
 - Tidligere studier havde kun undersøgt trachea. Ito et al. 1998
- Hvilke dele af vævene er foretrukket af henholdsvis aviær og svineinfluenza virus?
- Er der overensstemmelse mellem influenza virus og receptorer?
- Er der ned- eller opregulering af receptorerne?



Materialer og metoder

- Influenza inficerede grise
 - A/swine/Denmark/19126/1993 (H1N1) [† PID 4+56]
 - A/swine/Denmark/10074/2004 (H1N2) [† PID 4+56]
 - A/duck/Denmark/65472-26/2003 (H4N6) [† PID 4+ 8]
- Kontrol grise
 - Ren allantois væske [† PID 4+ 8]
 - Sentinel gris i H4N6 inficerede gruppe [† PID 8]
- Væv
 - Næse epithel
 - Trachea
 - Lunge 9 steder
 - Tonsil
 - Reg. Lymfeknude



Materialer og metoder

- Demonstration af receptorer:
 - Sialic Acid- α -2,6-terminal saccharide receptor (svin/human) Sambucus Nigra (SNA) lectin
 - Sialic Acid- α -2,3-terminal saccharide receptor (aviær) Maackia Amurensis (MAA) lectin, isotype I og II
- Demonstration af influenza antigen:
 - Polyklonalt kanin anti-svineinfluenza
 - Polyklonalt ged anti-Influenza A virus
- Dobbelt farvning af influenza og epithel celler:
 - Aviærinfluenza antigen/cytokeratin (epithel celle markør)
 - Svineinfluenza antigen/cytokeratin (epithel celle markør)

Resultater

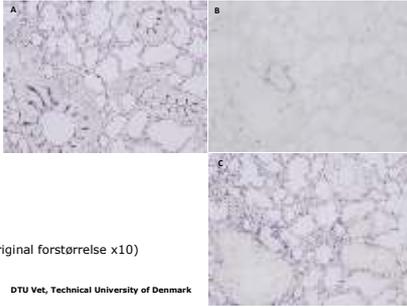
- Makroskopiske ændringer
 - generelt få læsioner i aviær influenza inficerede dyr. Kun en gris † PID4, mindre lobulære fortætninger i kraniale lunge lapper.
 - Svineinfluenza inficerede, H1N2 mere udbredte læsioner end H1N1.
 - Negativ kontrol grise og sentinel gris havde ingen forandringer.



Resultater

- Lectin farvning af receptorer.

- **A.** SNA (SA- α -2,6 -svin/human)
- **B.** MAAI **C.** MAAII (SA- α -2,3 -aviær)

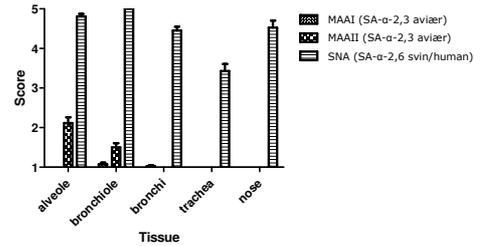


9 DTU Vet, Technical University of Denmark

Resultater

- Lectin scoring

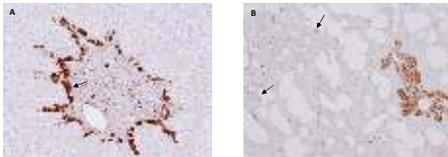
1: 0-20%, 2: 20-40%, 3: 40-60%, 4: 60-80%, 5: 80-100%



10 DTU Vet, Technical University of Denmark

Resultater

- IHC svineinfluenza inficerede grise (original forstørrelse **A.** x20, **B.** x10)

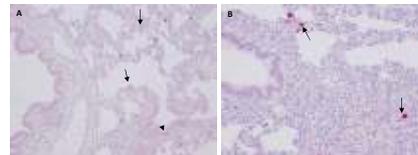


Udbredelsen af svineinfluenza antigen: Bronkier, bronkioler, alveoler. Næse, trachea.

11 DTU Vet, Technical University of Denmark

Resultater

- IHC aviær influenza inficerede grise (original forstørrelse **A.** x10, **B.** x20)

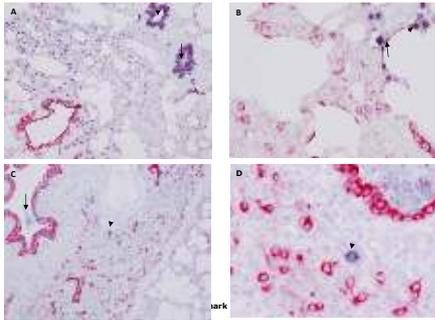


Udbredelsen af aviær influenza antigen: Alveoler, bronkioler.

12 DTU Vet, Technical University of Denmark

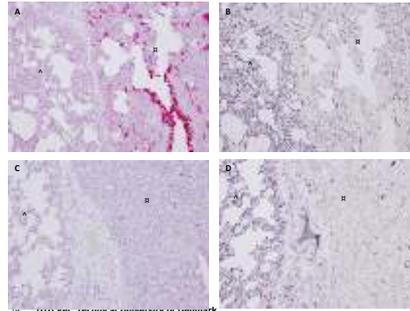
Resultater

- Dobbelt farvning influenza / Cytokeratin
 - **A.** og **B.** svineinfluenza inficerede gris (original forstørrelse A. x10, B. x40)
 - **C.** og **D.** aviær influenza inficeret gris (original forstørrelse C. x10, D. x40)



Resultater

- Sammenligning af lectiner og influenza
 - **A.** IHC svineinfluenza **B.** Parallel snit til A. SNA lectin svineinfluenza inficeret (A. og B. x10)
 - **C.** IHC aviær influenza og **D.** Parallel snit til D. SNA lectin aviær influenza inficeret gris. (C. og D. x10)



Opsummering og diskussion

- Svineinfluenza: næse, trachea, bronkie, bronkiolo og alveolære type I og II epitelceller.
- Aviær influenza: bronkiolo og alveolære type II epitelceller.
 - Modsat fordeling aviær vs svineinfluenza.
 - Human infektion lignende fund.
- SA- α -2,6-terminal saccharide (svin/human) receptor findes udbredt i store mængder i alle områder af respirationsvejene.
- SA- α -2,3-terminal saccharide (aviær) kun nedre respirationsveje i bronkioler men hovedsagligt alveolære epitelceller.
- Match mellem influenza udbredelse og receptorer.
 - Uoverensstemmelse med tidligere undersøgelser
 - Stemmer med epidemiologien
 - Bekræftet af andre sidenhen (Neil et al. 2010, Van Poucke et al. 2010)
 - Grisen som "blandekar"???
 - Kyllinger, mennesker



Opsummering og diskussion

- Receptorerne kan ikke påvises i områder med influenza inficerede celler.
 - Er ikke rapporteret før
 - Kløvet af neuraminidasen?
 - Betydning for genetisk skift?

EKSPERIMENTEL INFEKTION MED DEN DANSKE REASSORTED H1N2 SVINEINFLUENZA SUBTYPE. ER DEN MERE VIRULENT I GRISE END EN CIRKULERENDE H1N1 SVINEINFLUENZA STAMME?

Baggrund og formål

- 2003 ny reassorted H1N2 subtype i Danmark.
 - 2010 35% af sager positive for svine influenza.
- Rapporteringer fra besætningerne indikerer at H1N2 giver højere grad af sygdom sammenlignet med H1N1 og H3N2.
- Undersøgelse af virulensen og antigeniciteten af ny reassorted H1N2 og ældre cirkulerende H1N1.
- Samt krydsbeskyttelsen mellem stammer.

Materialer og metoder

- Virus:
 - A/swine/Denmark/19126/93 (H1N1)
 - A/swine/Denmark/10074/04 (H1N2)
- Gruppe 1
 - 6 grise inokuleret PID0 H1N1
 - 2 grise † PID4
 - 4 sidste grise inokuleret PID28 H1N2 [† PID56].
- Gruppe 2
 - 6 grise inokuleret PID0 H1N2
 - 2 grise † PID4
 - 4 sidste grise inokuleret PID28 H1N1 [† PID56].
- Overvågning af symptomer
 - Temperatur PID-3, 0-9, and 28-37.
- Prøvetagning
 - Blod PID -3, 0, 7, 11, 14, 18, 22, 28, 35, 39, 42, 46, 50, 56.
 - Næse svaber PID-3, 0-9, 11, 14, 18, 22, 28-37, 39, 42, 46, 50, 56.



Materialer og metoder

- Post mortem
 - Næse, trachea, tonsil, reg. lymfeknude, Lunge 9 steder
- Virus RNA oprensning
- Real time RT-PCR screening assay, NP-gene.
- Relative kvantificering ved real time RT-PCR, matrix-gene.
- Hæmagglutinations Inhibition (HI)- test, antistof bestemmelse.
- Akut fase protein måling, ELISA-test: Haptoglobin, Serum amyloid A (SAA), C-reaktivt protein (CRP).

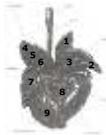
Resultater

- Makroskopisk



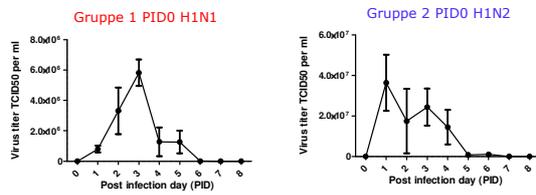
Virus titer i lungevæv, TCID50 pr ml, PID4

Målt med qRT-PCR, matrix gene



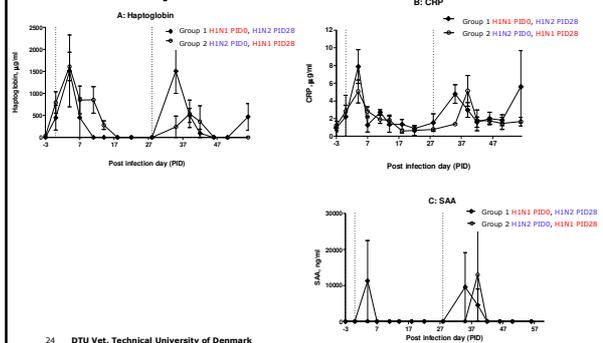
Lunge område	Gruppe1 H1N1		Gruppe2 H1N2	
	Gris1	G2	G7	G8
Lu1	6.0×10^7	9.5×10^6	1.5×10^5	2.3×10^7
Lu2	7.1×10^6	1.4×10^9	3.1×10^7	1.8×10^8
Lu3	1.1×10^7	5.2×10^8	7.5×10^6	3.7×10^7
Lu4	2.0×10^5	7.1×10^7	3.2×10^4	4.5×10^4
Lu5	3.5×10^8	1.8×10^8	7.6×10^7	1.4×10^5
Lu6	3.8×10^6	1.5×10^7	6.2×10^6	2.1×10^6
Lu7	7.8×10^6	2.1×10^8	3.7×10^7	3.2×10^7
Lu8	9.8×10^7	4.8×10^7	7.1×10^6	2.9×10^7
Lu9	1.6×10^5	3.7×10^5	2.9×10^5	8.5×10^4

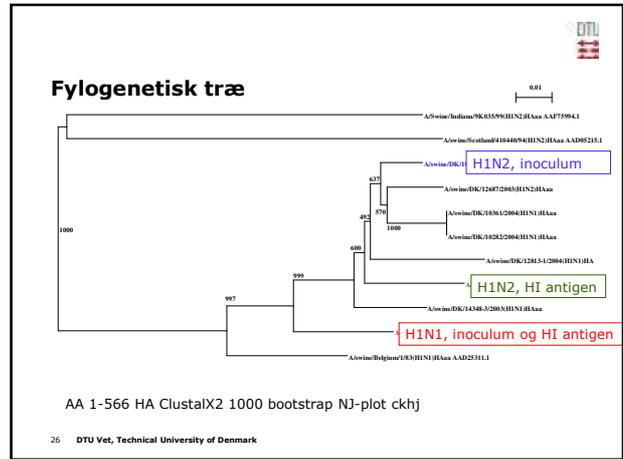
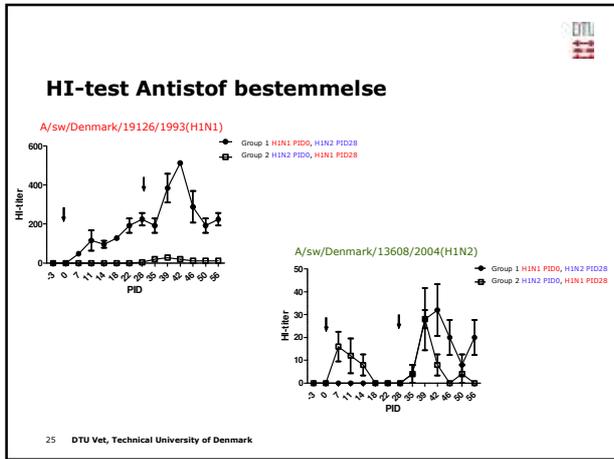
Nasale virus udskillelse



Efter anden inokulering var der minimal virus udskillelse i begge grupper.

Akut fase proteiner





HI-test Gruppe 1 pgs H1N1*/H1N2**

Antigen	19126 ^a H1N1	10282 ^b H1N1	12813 ^b H1N1	10361 ^b H1N1	10074 ^a H1N2	13608 ^b H1N2	12687 ^b H1N2	410440 ^b H1N2	15027 ^b H3N2
PID									
-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0 ^a	0	0	0	-	0	0	0	0	0
7	48	32	0	0	8	0	0	0	0
11	116	28	-	-	-	0	-	0	0
14	96	36	6	0	6	0	4	0	0
18	128	20	-	-	-	0	-	0	0
22	192	20	0	0	4	0	2	0	0
28**	224	24	4	-	4	0	12	0	0
35	192	24	14	2	10	4	16	0	0
39	384	20	-	-	-	28	-	0	12
42	512	32	12	2	16	32	46	0	16
46	288	24	-	-	-	20	-	0	0
50	192	24	-	0	-	8	-	0	0
56	224	32	8	-	8	20	22	0	0

27 DTU Vet, Technical University of Denmark

HI-test Gruppe 2 pgs H1N2*/H1N1**

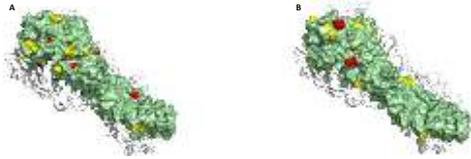
Antigen	19126 ^a H1N1	10282 ^b H1N1	12813 ^b H1N1	10361 ^b H1N1	10074 ^a H1N2	13608 ^b H1N2	12687 ^b H1N2	410440 ^b H1N2	15027 ^b H3N2
PID									
-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0 ^a	0	0	0	-	0	0	0	0	0
7	0	40	30	8	160	16	4	0	0
11	0	28	-	-	-	12	-	0	0
14	0	28	24	6	192	8	4	0	0
18	0	32	-	-	-	0	-	0	0
22	0	40	10	6	224	0	2	0	0
28**	4	24	12	-	416	0	2	0	0
35	20	12	10	4	256	4	10	0	4
39	28	20	-	-	-	28	-	0	28
42	20	40	10	4	192	8	8	0	16
46	12	24	-	-	-	0	-	0	0
50	12	20	-	4	-	4	-	0	0
56	12	44	8	-	112	0	4	0	0

28 DTU Vet, Technical University of Denmark

3D model af hæmagglutinin molekylet

Center for Biological Sequence analysis - DTU

A: A/swine/Denmark/19126/1993 (H1N1) (inoculum) vs A/swine/Denmark/10282/2004 (H1N1)
B: A/swine/Denmark/10074/2004 (H1N2) (inoculum) vs A/swine/Denmark/13608/2004 (H1N2)



Små ændringer i aminosyresekvensen af HA proteinet medfører store forskelle på HI titeren

Opsummering og diskussion

- H1N2 værre lunge læsioner makroskopisk end H1N1
- Højere nasale virus udskillelse i H1N2 inficerede grise
 - H1N2 mere virulent?
- Lav/ingen udskillelse efter reinokulering.
 - Krydsbeskyttelse mellem H1N1 og H1N2.
- Akut fase proteiner.
 - Tydeligt respons ved inokulering og reinokulering.
 - Primær infektion H1N2 > langsommere respons ved reinokulering.
 - H1N2 infektion relativt mere beskyttende mod H1N1 infektion.
- Antistof respons
 - Boost i antistoffer > krydsbeskyttelse
- HI test specifik med identisk inokulum og test stamme. Små forskelle kan have en stor betydning.
 - Vigtigt i diagnostiske sammenhænge

Tak for jeres opmærksomhed!

- Supervisors
 - Lars E Larsen, National Veterinary Institute - DTU
 - Birgitte Viuff, Faculty of Life Sciences - University of Copenhagen
- Virology group, National Veterinary Institute - DTU
 - Solvej Ø Breum
 - Charlotte K Hjulsgaard
 - Kristina Vorborg
 - Sari M Dose
 - Helene Ringvig
 - Hue Thi Thanh Tran
 - Ivan Larsen
- Lindholm, National Veterinary Institute - DTU
 - Jens Nielsen
 - Anette Botner
 - Lab 54
 - Bent Eriksen
- Århus, National Veterinary Institute - DTU
 - Kurt Handberg
 - Poul Henrik Jørgensen
- Other technical and method assistance
 - Elisabeth Holm
 - Peter MH Heegard
 - Annie Ravn Pedersen
 - Betina Katja Lund
- 3D modelling
 - Claus Lundegaard, Department of systems biology, Center for biological sequence analysis (CBS) - DTU

