

Karakterisering af influenza A subtype H3hu05N2sw med muligt zoonotisk potentiale

Speciale projekt

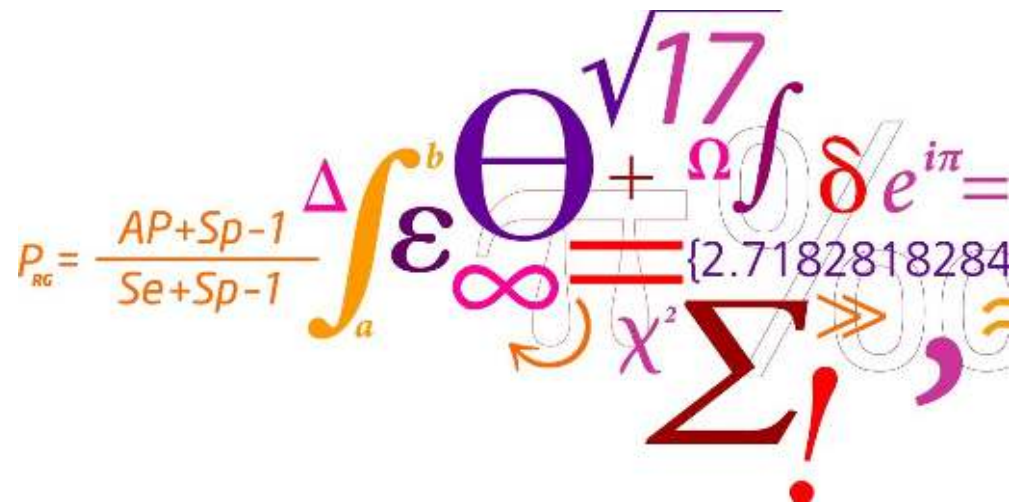
Anne Aagaard Nielsen S161806 and Camilla Adelhart Pedersen S161807

Vejleder: Professor, Dyrlæge Lars Erik Larsen DTU VET

Medvejledere:

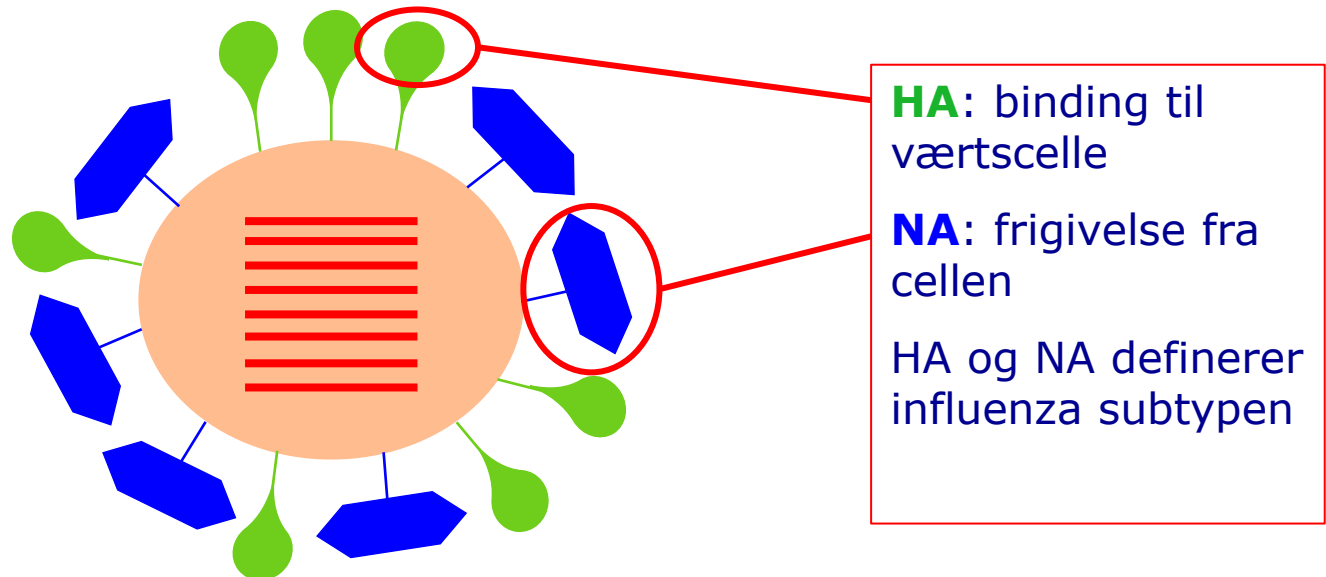
Forsker, Ph.d., Molekylær Biolog Jesper Schak Krog DTU VET

Professor, Dyrlæge Jens Peter Nielsen Københavns Universitet

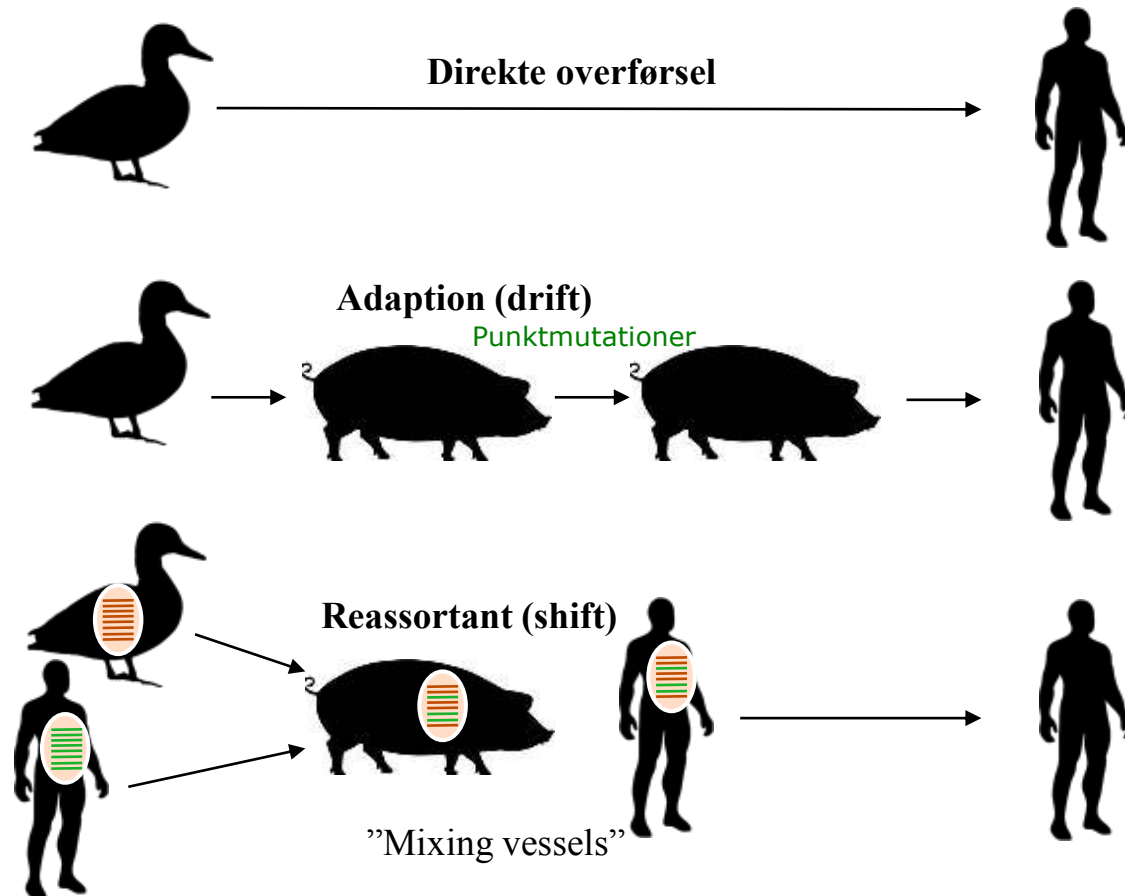


Influenza virus

- Tilhører Orthomyxoviridae familien
- Opbygning/struktur
 - Indkapslet RNA virus, 80-120 nm
 - Genom: 8 segmenter, ssRNA
 - De 8 segmenter koder for minimum 11 virale proteiner med forskellige funktioner



Teori – Skift mellem værter



Passivt overvågningsprogram

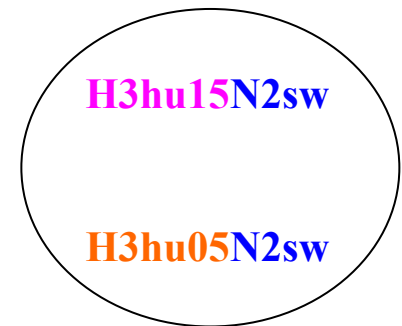
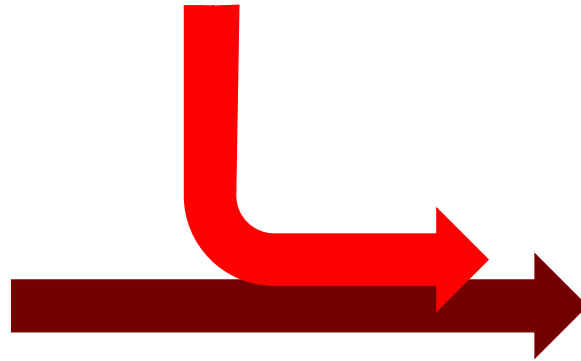
Subtyper i danske svin fra 1980 og frem

Human sæson influenza: N2hu95, H3hu05, H3hu15

H1N1av (1981)

H3N2sw (1990)

H1N1pdm09 (2010)

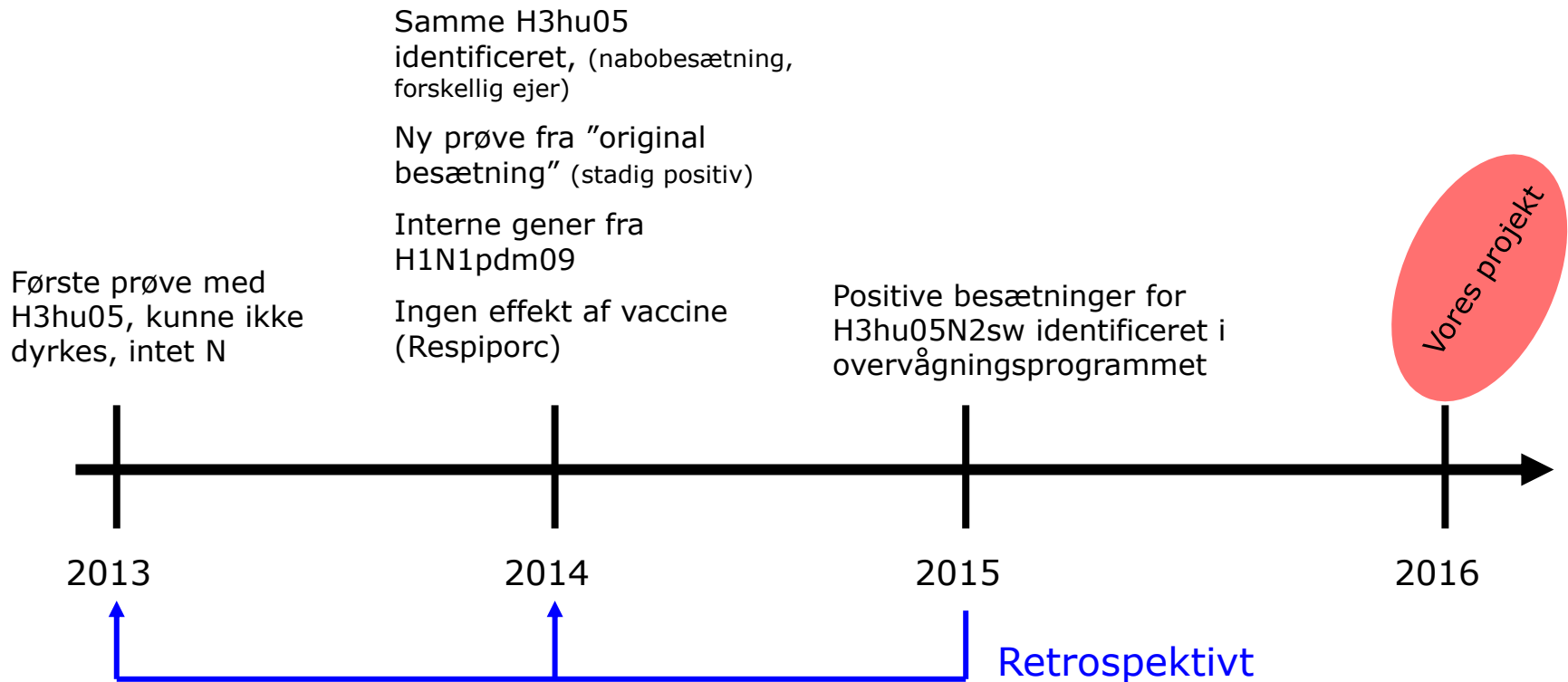


H1avN2sw

H1pdm09N2hu95

H1pdm09N2sw

Baggrund for projektet



Formål med projektet

- At undersøge spredningen af
- At karakterisere H3hu05N2sw genetisk
- Karakterisere H3hu05N2sw fænotypisk ved HI test
- Undersøge om vacciner, der anvendes i Danmark mod svineinfluenza, giver beskyttelse mod H3hu05N2sw subtypen

Udvælgelse af besætninger og case dyr

- Besætninger blev valgt ud fra en eller flere faktorer:
 - » Tidligere positiv for H3hu05N2sw eller
 - » Samme besætningsdyrlæge/samme ejer eller
 - » Mulig kommunikation med besætning, der tidligere er testet positiv (identificeret ud fra www.svineflyt.fvst.dk) og
 - » Konventionel produktionsform
 - Case dyr udvælges ud fra:
 - » Kliniske symptomer
 - » Problem staldafsnit
- Op til besætningsdyrlægen at vurdere symptomer/problem afsnit

Metoder – karakterisering af isolater

- Påvisning ved real time PCR
- Genetisk karakterisering (sekvensanalyse af HA protein)
- Hemagglutinin inhibitions test (HI test)

Resultater

- Prøver fra 20 besætninger:



Seks fra besætninger fundet positive i 2015

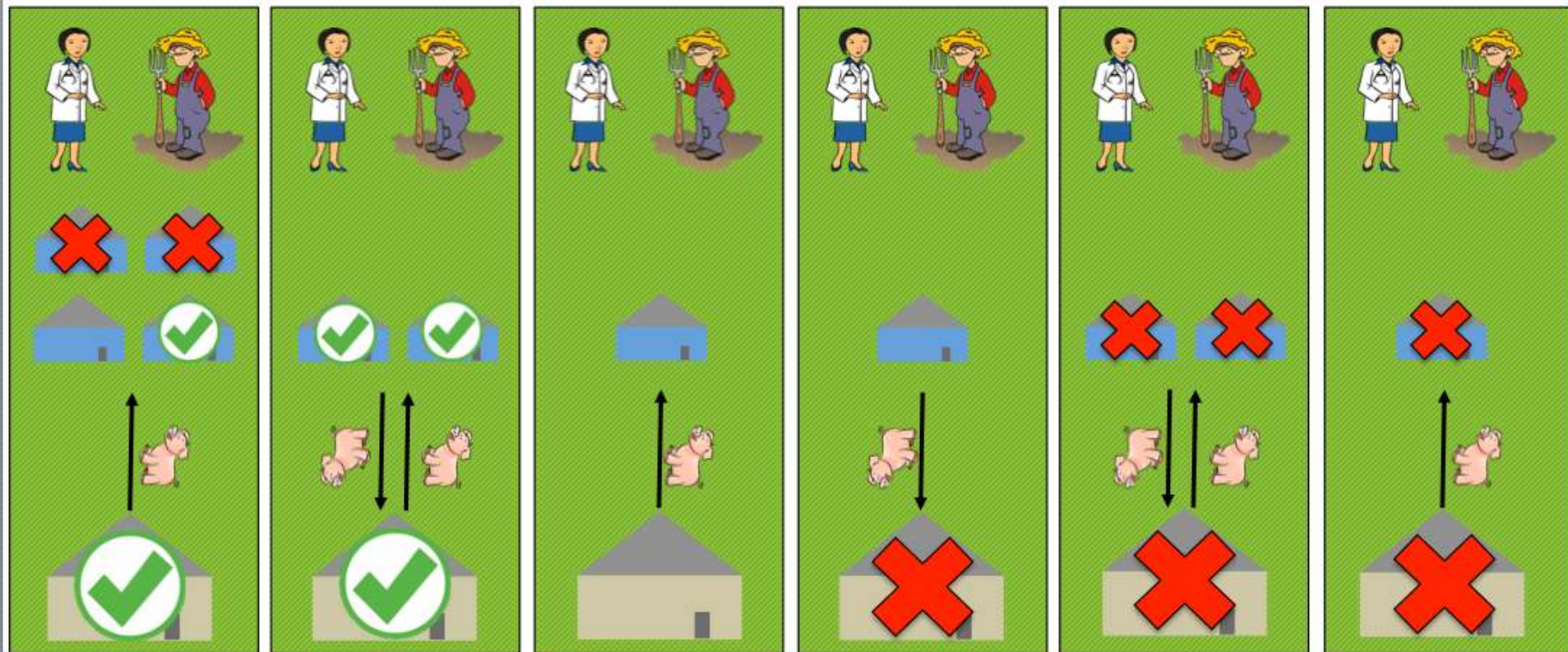


11 fra besætninger direkte associeret med besætningerne fra 2015

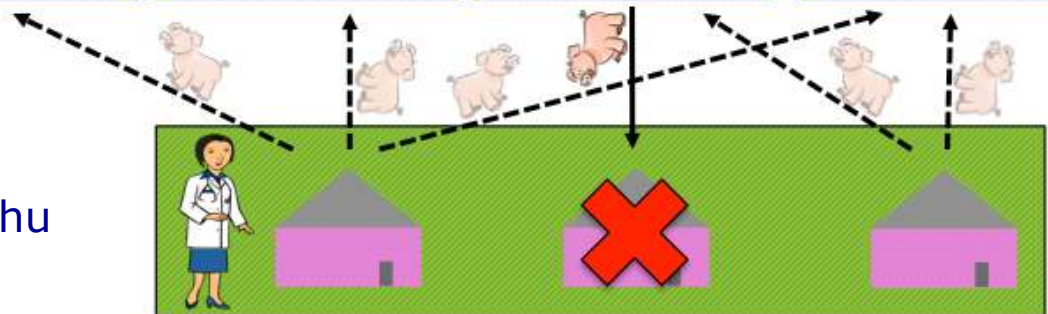


Tre fra besætninger med indirekte og direkte kontakt til besætningerne fra 2015

Resultater



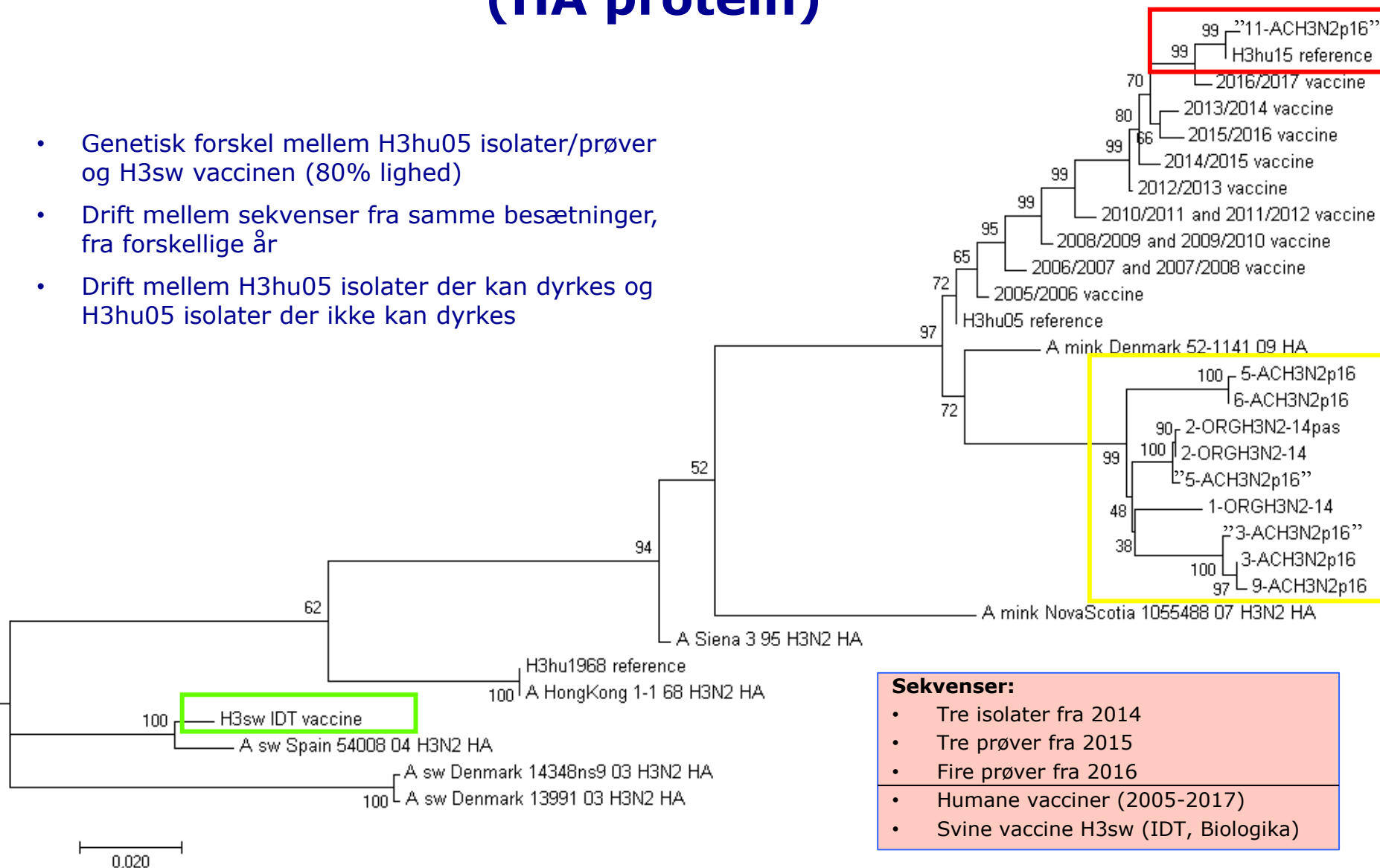
- 45% negative for influenza
- 45% af positive prøver viste H3hu



Resultater – Genetisk karakterisering (HA protein)



- Genetisk forskel mellem H3hu05 isolater/prøver og H3sw vaccinen (80% lighed)
- Drift mellem sekvenser fra samme besætninger, fra forskellige år
- Drift mellem H3hu05 isolater der kan dyrkes og H3hu05 isolater der ikke kan dyrkes



- Sekvenser:**
- Tre isolater fra 2014
 - Tre prøver fra 2015
 - Fire prøver fra 2016
 - Humane vacciner (2005-2017)
 - Svine vaccine H3sw (IDT, Biologika)

Resultater – HI Test (efter specialets afslutning)

TABLE 2 Hemagglutination results showing titers between the antigens and sera used

Antigen	Sera							
	H3hu1	H3hu2	H3hu3	H3hu4	H3hu5	Vacc1	Vacc2	H3ref
<i>A/swine/Denmark/15164-1p1/2014 H3huN2sw</i>	80	80	160	160	80	–	–	–
<i>A/swine/Denmark/5255-1p1/2015 H3huN2sw</i>	40	80	160	160	40	–	–	–
<i>A/swine/Denmark/10115/2007 H3N2</i>	–	–	–	–	–	160	40	40

H3hu# denotes sera from five different sows from the herd infected with *A/swine/Denmark/15164-1p1/2014 H3huN2sw*. Vacc# is post-vaccination with Gripovac 3 serum provided by the manufacturer of the vaccine IDT. H3ref is the standard sera used by the National Veterinary Institute of Denmark routine diagnostic laboratory.

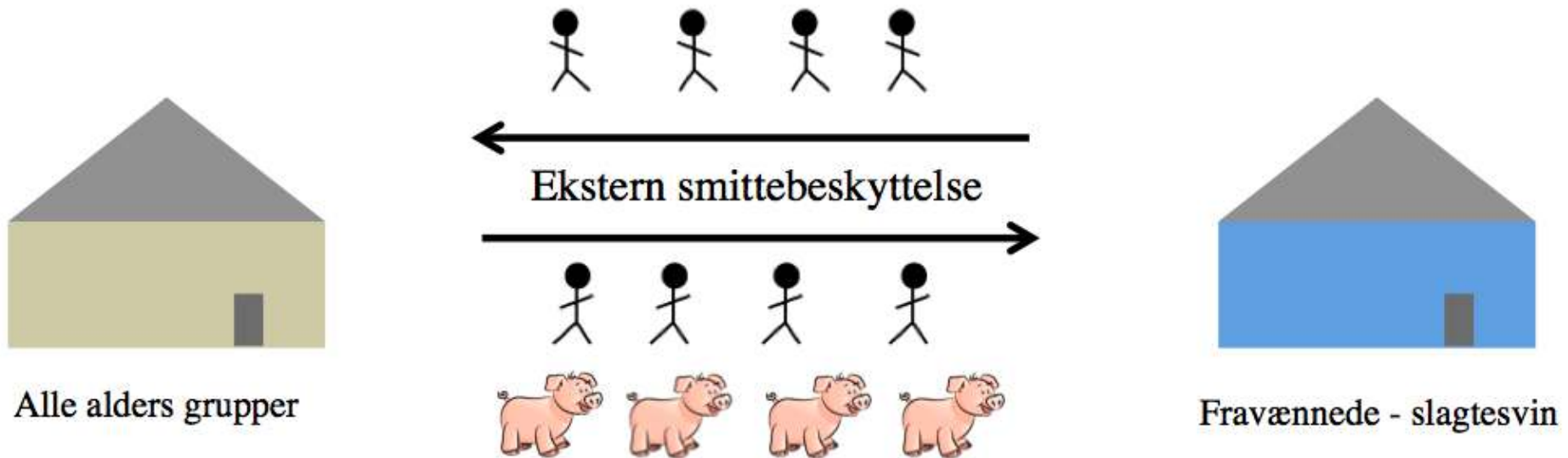
De eksisterende vacciner hjælper ikke mod dette virus!

Spredning af det nye virus - feltprøver

Subtype	Antal					Kommentar
	2016	2015	2014*	2013	2012	
H1N1	12 (9,8 %)	11 (6,3 %)	5 (6,3%)	24 (25%)	29 (37%)	"Normal" europæisk svineinfluenza A virus subtype "avian-like swine" som har cirkuleret i DK siden 1981.
H1N2	75 (61,0 %)	103 (58,5 %)	50 (62,5%)	46 (47%)	32 (42%)	Dansk svineinfluenza A virus subtype fundet første gang i 2003.
H1N2hu	0 (0 %)	2 (1,1 %)	2 (2,5%)	4 (4%)	3 (4%)	"Normal" europæisk svine H1 subtype sammen med human N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H3N2	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (1,25%)	1 (1%)	0	"Normal" svine H3N2 virus. Ikke detekteret 2010-2011.
H3hu05N2sw	3 (2,4 %)	5 (2,8 %)	2 (2,5%)	1** (1%)	0	Ny reassortment med humant H3, der cirkulerede i mennesker i DK 2005, sammen med dansk svine N2

Diskussion – Management og smittebeskyttelse

- Transport af grise og medarbejdere mellem besætninger
- Samme dyrlæge besøger flere besætninger samme dag
- Manglende information om management/smittebeskyttelse





Konklusioner

- Sammenhæng mellem transport af dyr og subtype fundet i besætninger
- Antistoffer rejst mod **vaccinerne beskytter ikke mod dette virus**
- Virusset påvises løbende i indsendelser (**også påvist i Tyskland**), men stadig med lav prævalens
- **Skrækscenariet** er at det efterhånden adapteres til svin og spreder sig mere hvilket der er god mulighed for da næsten ingen danske grise har immunitet mod H3 genet – og der er ikke en vaccine

Muligt zoonotisk potentiale af H3hu05N2sw:

- Indeholder mange humane influenza gener

En stor tak til...

- Charlotte Hjulsager (DTU Veterinærinstituttet)
- DTU Veterinærinstituttets laboranter
 - Tine Skotte Hammer, Nina Dam Grønnegaard, Hue Thi Thanh Tran og Anne Osborg
- Ph.d.-studerende Pia Ryt-Hansen, Nicole Goecke og Malene Andersen (DTU Veterinærinstituttet)
- Christian Holdack (IDT Biologika, Tyskland) 
- Jana Schulz for at bidrage med oplysninger til svineflyt databasen (DTU Veterinærinstituttet)
- SEGES (Charlotte Sonne kristensen) for finansiel støtte til rejsen til Tyskland
- Joachim og Kasper for moralsk støtte 
- Dyrlæger og besætningsejere for deltagelse i projektet