

Overvågning af influenza A virus i svin

Slutrapport 2021

Pia Ryt-Hansen

Charlotte Kristiane Hjulsager

Jesper Schak Krog

Lars Erik Larsen

December 2022



DK-VET rapport - december 2022

Overvågning af influenza A virus i svin – slutrapport 2021

Udarbejdet af Pia Ryt-Hansen, Jesper Schak Krog, Charlotte Kristiane Hjulsager og Lars Erik Larsen

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

I2RG2 2021

Projektperiode 01-01-2021 – 31-12-2021

Udgivet af Københavns Universitet, Institut for veterinær og husdyrvidenskab, Dyrlægevej 88, 1870 Frederiksberg C.

Forord

Denne rapport beskriver resultaterne fra overvågningen af influenza A virus i danske svinebesætninger, der har fundet sted i 2021, og sammenholder resultaterne med overvågningen fra forgående år, samt udenlandske studier.

Laboratorieundersøgelser og databehandling er udført på Statens Serum Institut (SSI), Københavns Universitet, Institut for veterinær og husdyrvidenskab (KU-IVH), Center for Diagnostik, DTU, og SEGES Landbrug og Fødevarers veterinært laboratorium, Kjellerup. Indledende screening af prøver for tilstedeværelsen af influenza A virus er betalt af indsendende dyrlæger eller medicinalfirmaet CEVA, mens de øvrige analyser er finansieret af Fødevarestyrelsens (FVST) overvågningsprogram. Slutrapporten er den endelige opgørelse af de analyserede indsendelser for det pågældende år. Der kan være mindre afvigelser mellem slutrapport og de kvartalsrapporter, der løbende er udarbejdet, som følge af forsinkelser i dataregistreringen.

Definitioner

Influenzavirus har et RNA genom, der er fordelt på 8 segmenter, som hvert indeholder minimum et gen, der koder for influenzavirusproteiner. Ud over overfladegenerne hemagglutinin (HA) og neuraminidase (NA), der bestemmer subtypen af influenzavirus, er det vigtigt at kende de øvrige såkaldte "interne gener", da disse er med til at bestemme virulens og værtsspecificitet af et givent influenzavirus og definere virus varianten. For at kunne karakterisere alle gensegmenterne fra ét virus, er det mest optimalt, at udføre analysen på et dyrket virus isolat, da primær materialet (væv, sputum og næsesvabere) potentielt kan indeholde flere forskellige virus, hvorved det ikke kan afgøres hvordan sekvenser fra segmenterne "hører sammen". Hvis man blot ønsker at kende poolen af gensegmenter i en prøve, kan det omvendt være en fordel at subtype på primær materialet.

Hvis to influenzavirus inficerer den samme celle samtidigt kan et nyt virus blive dannet, ved at de 8 gensegmenter kombineres på en ny måde inde i de nydannede viruspartikler, inden de forlader cellen. Et sådant virus kaldes en reassortant, og kan lede til dannelsen af nye subtyper, hvis en ny kombination af overfladegener opstår.

For at lette læsningen af rapporten, vil der i det følgende gives en beskrivelse af de influenza A virus subtyper og gensegmenter, der nævnes i rapporten. Denne nomenklatur vil blive benyttet konsekvent gennem rapporten.

<u>H1avN1av</u>	"Avian-like swine" H1N1. Opstod ved en introduktion af et helt virus til svin fra fugle i slut 70'erne/start 80'erne i Europa. Dette virus blev påvist første gang i Danmark i 1981, og anses for at være enzootisk i Danmark.
<u>H3swN2sw</u>	"Svine H3N2". Stammer fra det humane H3N2 fra Hong Kong influenzaen i 1968, der adapterede til svin og i 1984 reassorterede og tog de interne gener fra "avian-like swine" svine H1avN1av. Dette virus blev påvist første gang i Danmark i 1990.
<u>H1avN2sw</u>	Navngives også "H1N2dk". Virus har det samme "avian-like swine" H1 og "avian-like swine" svine interne gener, men med N2 genet fra dansk svine H3swN2sw. Dette virus blev påvist første gang i Danmark 2003, og anses for at være enzootisk i Danmark.

<u>H1N1pdm09</u>	Virus, der i 2009 forårsagede en human influenza pandemi og oprinder fra Mexico. HA, NA og de interne gener er forskellige fra de andre enzootiske subtyper. Dette virus anses nu også for at være enzootisk i Danmark.
<u>H1pdm09N1av</u>	Virus, der blev påvist for første gang i overvågningen i 2018, og som er en reassortant mellem H1N1pdm09 og H1avN1av.
<u>H1huN2sw</u>	Virus der første gang blev påvist i England i 1994 og som er en reassortant mellem human sæsoninfluenza, der cirkulerede i 80'erne, og svine H3swN2sw. Dette virus er aldrig påvist i Danmark, men cirkulerer i store dele af Europa.
<u>H1pdm09</u>	Virus med det specifikke HA fra H1N1pdm09.
<u>N1pdm09</u>	NA gen fra H1N1pdm09 virus.
<u>H1av</u>	HA gen fra "avian-like swine" svine H1avN1av.
<u>N1av</u>	NA gen fra "avian-like swine" svine H1avN1av.
<u>N2sw</u>	NA gen fra "svine" H3swN2sw og H1avN2sw.
<u>N2hu#</u>	NA gen beslægtet med NA-genet fra den humane sæsoninfluenza H3huN2hu. "#" angiver det årstal hvor genet med størst lighed er observeret i mennesker.
<u>H3hu#</u>	HA gen i svineinfluenzavirus der er beslægtet med HA-genet fra den humane sæsoninfluenza H3huN2hu. "#" angiver det årstal hvor genet med størst lighed er observeret i mennesker. Det er forskelligt fra HA genet i svine H3swN2sw.

Indholdsfortegnelse

Forord	3
Definitioner.....	3
Indholdsfortegnelse.....	5
Kort sammendrag	6
Short summary	6
Indledning.....	7
Formål med overvågningen.....	9
Materialer og metode	10
Resultater	11
Indsendelser	11
Indsendelser med påvist influenza A virus.....	11
Svineinfluenza A virus subtyper	12
Svineinfluenzavirus reassortants	15
Resistens og virulens markører	17
Samlet analyseoversigt	18
Fylogenetiske analyser	18
Diskussion	20
Cirkulerende influenza virus i Danmark	20
Veterinære aspekter	21
Zoonotiske aspekter	22
Konklusion	24
Bilag 1a. H1pdmNx virus fylogeni.....	26
Bilag 1b: H1avNx virus fylogeni	27
Bilag 1c: H3xN2x virus fylogeni.....	28
Bilag 2a. HxN1x virus fylogeni	29
Bilag 2b. HxN2x fylogeni	30
Bilag 3. Fuld genom data	31

Kort sammendrag

Der er i 2021 gennemført en systematisk, prospektiv, passiv overvågning af cirkulerende influenza A virus subtyper i danske svin. Det overordnede formål med overvågningen var, at identificere hvilke influenza A virus subtyper og varianter, der cirkulerer blandt danske svin.

Totalt blev der i 2021 iværksat undersøgelse for influenza A virus på 2895 prøver fordelt på 857 indsendelser fra 647 besætninger registreret med forskelligt CHR nummer. I alt havde 453 (53 %) af indsendelserne fra 377 forskellige besætninger minimum en positiv prøve. Indsendelserne fordelte sig over hele landet og over hele året. Der var flest indsendelser til undersøgelse i vinterhalvåret, dog blev der fundet influenza positive prøver over hele året, med en tendens til flere positive indsendelser fra september-december.

Alle influenzapositive prøver blev testet for tilstedeværelsen af et HA gen med oprindelse i den pandemiske H1N1pdm09 virus fra 2009 (H1pdm09). H1pdm09 blev i 2021 påvist i 189 indsendelser fra 164 besætninger registreret med forskelligt CHR nummer og udgjorde således 42 % af de influenza A virus positive indsendelser, hvilket er en markant højere procentdel end i 2020, hvor tallet lå på 29 %. I alt blev oprindelsen af både HA og NA genet bestemt for 312 influenzavirus positive indsendelser. Tilsammen viste disse analyser, at de oftest påviste subtyper i danske svin i 2021 var H1avN2sw, H1pdm09N1av og H1N1pdm09. Der er sket en yderligere stigning i andelen af indsendelser fundet positive for H1pdm09N1av, og denne subtype udgør nu 24 % af alle subtypedede indsendelser, samtidig er andelen af H1avN2sw faldet til 54 % af alle subtypedede indsendelser. 2021 blev året, hvor de første to humane infektioner med H1N1pdm09 og H1pdm09N1av med oprindelse i danske svin blev dokumenteret i Danmark. Dette understøtter, at der er virus tilstede i danske svine besætninger med zoonotisk potentiale. Samtidig forventes der en lav krydsbeskyttelse til den humane sæson influenza, da den genetiske og antigene drift af H1pdm09 i danske svin er høj.

Fra 2022 publiceres resultaterne af influenza A overvågningen i svin løbende på DK-VETs hjemmeside - <https://www.vetssi.dk/overvaagning/overvaagningsprogrammer/overvaagning-af-influenza-a-virus-i-svin-i-danmark>

Short summary

A systematic, prospective, passive monitoring of circulating subtypes of influenza A virus in Danish pigs was carried out in 2021. The overall purpose of the monitoring was to identify which influenza virus subtypes and genotypes that circulated among Danish pigs.

In 2021, a total of 2895 influenza A virus tests were performed on 857 submissions from 647 herds registered with different CHR no. In total, 453 (53 %) of the submissions from 377 different herds had at least one positive sample. Submissions were distributed across the country. There were a higher number of submissions during the winter, but influenza positive samples were detected all year round, with a tendency to a higher positive proportion from September-December.

Virus with an HA gene of pandemic H1N1pdm09 origin (H1pdm09) was detected in 189 submissions from 164 herds registered with different CHR no. and thereby accounted for 42 % of the influenza A virus positive submissions. The proportion of H1pdm09 is thereby significantly higher than last year where only 29 % of the positive submission had an HA gene of H1N1pdm09 origin. In total, 312 influenza A virus positive submissions were subtyped for both HA and NA. These analyzes showed that the most common

subtypes in Danish pigs in 2021 were H1avN2sw, H1pdm09N1av and H1N1pdm09. Similarly to last year, the prevalence of the H1pdm09N1av subtype increased and this subtype now represents 24 % of all submissions for which both HA and NA were subtyped. At the same time, the H1avN2sw subtype has decreased in prevalence, and was constituting only 54 % of all subtyped submissions. For the first time in Denmark, two human zoonotic infections with H1N1pdm09 and H1pdm09N1av viruses originating from Danish swine, were documented. This emphasizes that viruses with a zoonotic potential are present in the Danish swine population. In addition, low cross-reaction to the human seasonal flu is expected as the genetic and antigenic drift of the H1pdm09Nx viruses in swine is significant.

From 2022, the results of the surveillance program for influenza A in swine are public available at the DK-VET homepage - <https://www.vetssi.dk/overvaagning/overvaagningsprogrammer/overvaagning-af-influenza-a-virus-i-svin-i-danmark>

Indledning

Influenza A virus infektion i dyr udgør en trussel mod dyresundheden, dyrevelfærden, produktionsøkonomien, fødevarer sikkerheden og har tidligere givet anledning til pandemier i mennesker senest i 2009 (H1N1pdm09). For at kunne agere hurtigt på nye trusler (early warning) og derved holde konsekvenser ved fund af et nyt virus på et minimum, er det nødvendigt, at virologiske og epidemiologiske informationer om cirkulerende influenzavirus udveksles hurtigt og effektivt mellem sundhedsmyndigheder og veterinærmyndigheder både nationalt og internationalt. Nye og/eller ændrede influenzavirus, der har potentiale til at kunne smitte mennesker (zoonoser), opstår i det animale reservoir. Derfor er det oplagt, at der inden for det veterinære område implementeres effektive systemer til overvågning og karakterisering af influenzavirus i relevante dyrearter. Det danske overvågningsprogram for influenza A virus i svin bygger på anbefalinger vedr. overvågning for influenza beskrevet af OIE¹, FAO² samt EFSA³.

Der er globalt identificeret utallige varianter af forskellige cirkulerende svineinfluenza subtyper (kombinationer af HA og NA gener). I Europa og Danmark cirkulerer der flere forskellige subtyper, som kan betragtes som enzootiske. Herudover er der adskillige rapporter om sporadiske fund af influenzavirus i svin, som indeholder gener fra fugle-, menneske- og enzootiske svineinfluenzavirus. Svin betragtes derfor som et reservoir for influenzavirus og for influenzavirusgener, der kan kombineres og danne nye influenzavirus, som potentielt kan smitte mennesker. Derudover er har den intensive svineproduktion ledt til at der konstant er nye naive individer tilstede, som sikre at influenza A virus kan cirkulerer kontinuerligt i den enkelte besætninger i måneder til år. Som konsekvens heraf udvikler influenza A virus sig gennem mutationer, hver gang et nyt individ inficereres, og derved opstår ændrede influenza A virus varianter konstant.

Influenza er en vidt udbredt sygdom blandt danske svin, hvilket bl.a. kan konkluderes ud fra, at influenza A virus er det mest prævalente patogen fundet i diagnostiske indsendelser med historik om respiratorisk sygdom. Tilmed har et tidligere studie vist, at mere end 90 % af danske svinebesætninger havde influenza

¹<http://www.fao.org/docrep/012/ak738e/ak738e00.pdf> (FAO guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations)

²<http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUsurveillance.pdf> (OFFLU strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals)

³ (Scientific Opinion on the pandemic (H1N1) 2009 influenza and its potential implications for animal health)

antistofpositive svin. Mindst fire subtyper af svineinfluenzavirus kan betragtes som enzootiske i danske svin; H1avN1av og H1avN2sw, som har cirkuleret de sidste hhv. 40 og 18 år, samt H1N1pdm09 virus, der var pandemisk i mennesker i 2009, og første gang blev påvist i danske svin i 2010. H1N1pdm09 har sidenhen givet anledning til fire nye subtyper, hvoraf den ene af disse, "H1pdm09N1av", nu er mere prævalent end den originale H1N1pdm09 virus, og må derfor også antages at være enzootisk forekommende. Introduktionen af H1N1pdm09 har ledt til et utal af nye influenzavirus varianter med ukendt zoonotisk potentiale, og har potentielt en højere risiko for at være zoonotiske, da vi ved at virus af denne type førhen har kunne smitte blandt mennesker.

Influenzavirus i mennesker kommer oprindeligt fra dyr. Influenzavirus kan i nogle tilfælde smitte mennesker direkte fra fugle (eksempelvis H5N1 og H7N9), hvilket kan give en infektion med dødelig udgang, men fugleinfluenzavirus smitter normalt dårligt til mennesker. Svineinfluenzavirus er tættere relateret til de humane influenzavirus end fugleinfluenzavirus er. Hvis et svineinfluenzavirus kan give anledning til smitte mellem mennesker, er der risiko for hurtig udvikling af en ny influenzapandemi. Pandemien i 2009 er et eksempel herpå. Det er derfor vigtigt, i relation til den humane sundhed, at vide hvilke virus, der cirkulerer i svin.

Fund af influenzavirus i svin er ikke anmeldeligt i EU, herunder Danmark, med mindre det drejer sig om subtyperne H5 og H7, der aldrig er påvist i svin i Danmark. Besætninger med udbrud af influenza hos svin pålægges derfor ikke restriktioner af myndighederne. Diagnostik af influenza A virus i danske svin i 2021 blev foretaget på materiale, indsendt direkte til Statens Serum Institut, Center for Diagnostik, DTU eller Landbrug og Fødevarers veterinært laboratorium, Kjellerup i forbindelse med almindelig rutinediagnostik. Derudover må det antages at en betydende mængde prøver analyseres på udenlandske laboratorier. Resultater af sidstnævnte er ikke tilgængelige for forfatterne af denne rapport.

Influenzainfektioner hos svin forårsager en lokal infektion i de øvre luftveje, og en vis andel af grisene vil udvikle en reel lungebetændelse. Virus findes dermed ikke i kødprodukter. Influenzavirus, i sig selv, ødelægger cellerne i de øvre luftveje, og giver således anledning til hoste, nysen, næseflåd, nedsat ædelyst og feber. Tilmed forårsager influenzavirus også en generel svækkelse af immunsystemet, og tilsammen med en ødelagt cellebarriere, kan dette medføre sekundære bakterielle infektioner, hvilket vil være behandlingskrævende med antibiotika. Ved manglende besætningsimmunitet kan introduktion af en ny influenza virus også lede til aborter og døde søer, grundet høj feber. Derfor er det vigtigt for besætningsejere og dyrlæger at vide, om de har influenza A virus cirkulerende og hvilken slags, så de kan kortlægge sygdomsårsager og iværksætte optimale kontrolstrategier f.eks. i form af vaccination. Resultaterne fra overvågningen giver et indblik i hvilke virus varianter, der cirkulerer i Danmark samt et overblik over den genetiske drift over tid. Tilsammen sikrer disse resultater en sensitiv laboratoriediagnostik.

Formål med overvågningen

Det overordnede formål var:

- At undersøge hvilke influenza A virus subtyper og varianter, der cirkulerer blandt danske svin.
- At kortlægge sygdomsårsager i svinepopulationen med henblik på at sikre det strategiske mål: at mindske antibiotikaforbruget i danske svinebesætninger.

Desuden blev nedenstående aspekter belyst:

Zoonotiske aspekter

1. Tidlig påvisning og dyrkning af nye virus, som har et muligt zoonotisk potentiale.
2. Tidlig påvisning af molekulære markører, der indikerer øget risiko for human smitte.
3. Tidlig påvisning af virus, som indeholder genetiske markører, der indikerer at de er resistente overfor antivirale midler.
4. Identifikation af genetiske ændringer i cirkulerende influenza A virus øger muligheden for at forberede effektive diagnostiske tests og beskyttende vacciner, hvis der sker smitte til mennesker.

Veterinære aspekter

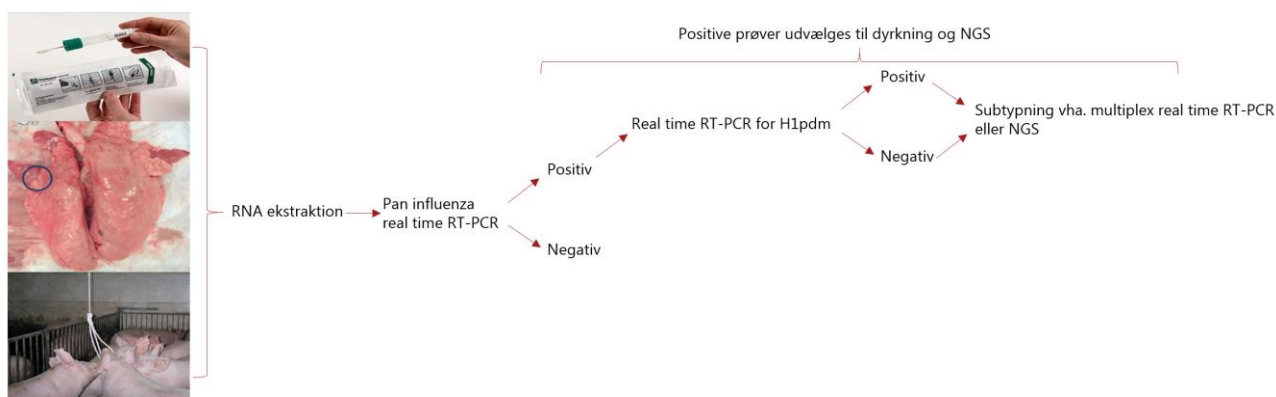
1. At opnå en bedre forståelse af den komplekse epidemiologi af Influenza A virus i svin under danske forhold.
2. At muliggøre en tidlig etablering af virus stocks til hurtig produktion af vacciner mod nye virus subtyper, der giver forøget sygdom i svin.
3. At sikre at de i landet anvendte diagnostiske tests identificere alle kendte influenza A virus subtyper i svin.
4. At kunne dokumentere, specielt over for eksportmarkeder, hvilke influenza A virus subtyper, der er til stede i Danmark – dette er specielt relevant i de tilfælde, hvor nye virus opdages i svin andre steder i verden/Europa.
5. Bidrage til at der opnås et fælles europæisk overblik over cirkulerende influenza A virus i svin.

Overvågningen i 2021 bestod af:

1. Undersøgelse for influenzavirus vha. pan-influenza A virus real time RT-PCR på brugerbetalte diagnostiske indsendelser til influenzavirusundersøgelse på Center for Diagnostik DTU, Statens Serum Institut (SSI) og Landbrug og Fødevarers veterinært laboratorium, Kjellerup.
2. Test af influenza A virus positive prøver for pandemisk H1N1 (H1N1pdm09) ved real time RT-PCR, der specifikt detekterer HA-genet i H1N1pdm09 virus (H1pdm09).
3. Subtypning af influenza A virus, baseret på multiplex real time RT-PCR og/eller next generation sequencing (NGS). NGS udføres på sekventeringsplatformen Illumina MiSeq (SSI). Herved opnås sekvensanalyse og karakterisering af både overfladegenerne HA og NA og de interne gener.
4. Isolation af virus fra udvalgte prøver i cellekultur.
5. Next generation sequencing (NGS) af udvalgte virusisolater.

Materialer og metode

Den overordnede arbejdsgang er illustreret i Figur 1. Startmaterialet kan være næsesvaber, spytpøver, lungevæske eller lungestykker. Herfra oprenses RNA og der køres pan-influenza A real time RT-PCR assay for at bestemme om prøven er positiv. Alle influenzavirus positive prøver analyseres med et real time RT-PCR assay specifikt for H1pdm09. Udvalgte influenza A virus positive prøver subtypes yderligere med multiplex real time RT-PCR. Multiplex real time RT-PCR analysen består af to real time RT-PCR reaktioner, som hver især multiplexer fire forskellige subtypnings assays. Derved testes for de otte subtyper af HA og NA, der er relevante for den danske svinpopulation. I år er der også blevet subtypet vha. NGS på RNA oprenset fra startmaterialet (primærprøven). Vha. NGS kan man opnå både en karakterisering af HA og NA, men også de interne gener. Herved er det muligt at påvise en eventuel introduktion af en ny influenza A virus subtype og/eller variant og lave detaljerede fylogenetiske analyser for at følge virus evolution.



Figur 1. Arbejdsgang fra modtagelse af prøver fra besætningerne til endt analyse.

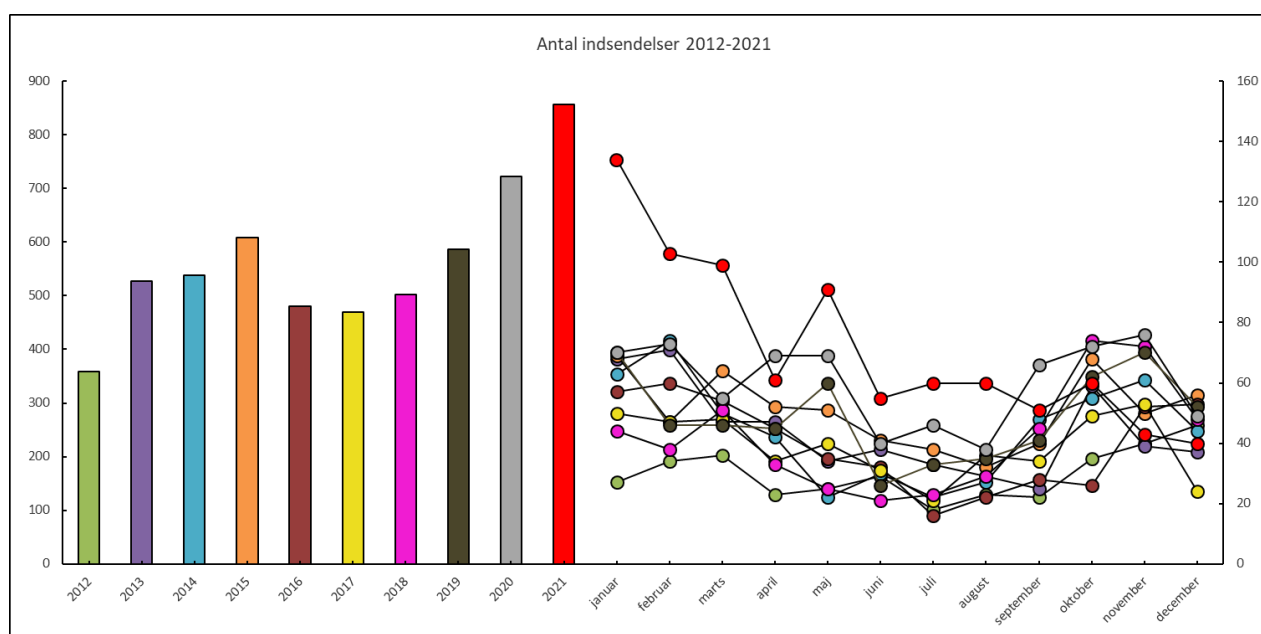
NGS udføres på fuld længde PCR produkter fra alle otte segmenter, der er opformeret i den samme PCR i et rør. PCR produkterne oprenses og sekventeres med NGS på Illumina MiSeq sekventeringsplatformen. Rådata databehandles via en intern Linux baseret pipeline og/eller i CLC genomics workbench, QIAGEN. Herfra fremstilles consensus-sekvenser for hvert segment, som analyseres med fylogenetiske analyser og oversættes til proteinsekvenser, der undersøges for forskellige markører og resistens mutationer.

Resultater

Indsendelser

Alle indsendelser fra danske svinebesætninger til Center for Diagnostik DTU, Statens Serum Institut og Landbrug og Fødevarers veterinært laboratorium, Kjellerup med ønske om undersøgelse for influenzavirus blev testet og indgår i rapporten. Prøverne var udtaget fra svin med anamnesen respirationsvejslidelse. Omkostningerne til influenzaviruspåvisning, der foretages med real time RT-PCR, blev løbende faktureret de indsendende dyrlæger, eller medicinalfirmaet CEVA, som sponsorerede 42 % af indsendelserne af. I 2021 blev der i gennemsnit indsendt 3,4 prøver per indsendelse, hvilket er sammenligneligt med de seneste to år.

I 2021 blev der totalt modtaget 2895 prøver fordelt på 857 indsendelser til undersøgelse for influenza A virus fra 647 danske svinebesætninger fordelt over hele landet (Figur 2 og Bilag 4a). Der var indsendt prøver til undersøgelse for influenzavirus mere end én gang fra 106 besætninger.



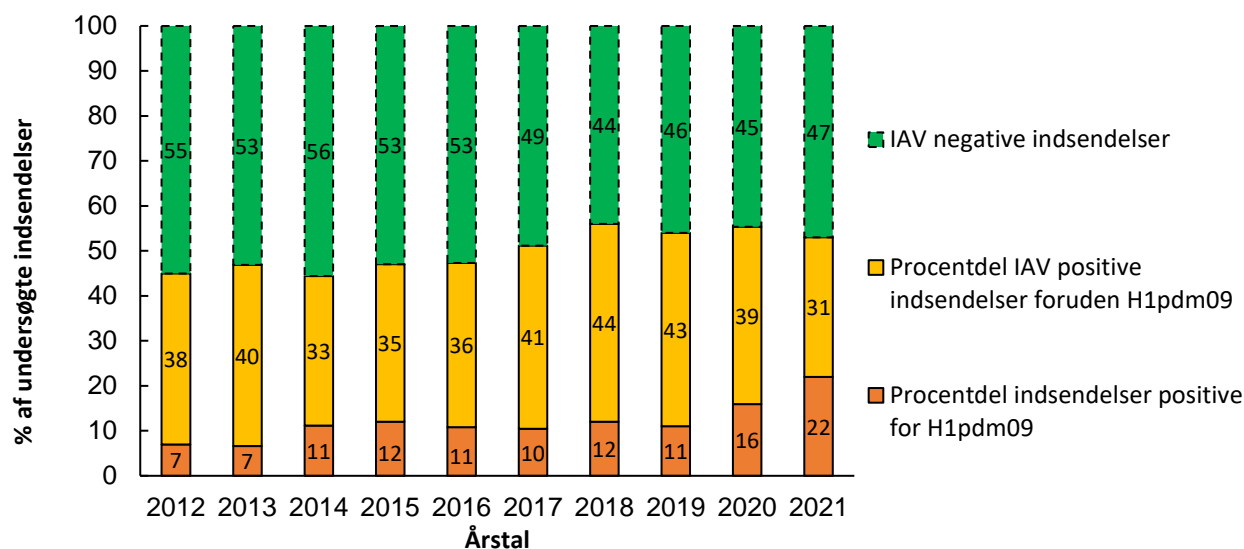
Figur 2. Fordelingen af antallet af indsendelser til diagnostik af influenza A virus i svin fra 2012 til 2021 fordelt på år (søjler til venstre) og måned (graf til højre) med tilsvarende farve.

Antallet af indsendelser i 2021 steg i forhold til de foregående år, og lå 16 % højere end i 2020. Den generelle tendens i det månedlige antal indsendelser ligner de tidligere år, hvor der generelt modtages flere indsendelser i efterårs- og vintermånederne. I år er der dog modtaget et markant øget antal indsendelser i januar, februar, marts og maj i forhold til tidligere år. Dette kan til dels forklares med tilstedeværelsen af kampagner for influenza diagnostik fra CEVA's side. Andelen af positive indsendelser varierede månedligt fra 44-62 %, med den laveste andel af positive fra april til juli, og den højeste andel positive fra september til december.

Indsendelser med påvist influenza A virus

I 2021, var i alt 453 indsendelser positive for influenza A virus i minimum én prøve, hvilket svarer til 53 % af de 856 undersøgte indsendelser (Figur 3). Dette er lidt lavere end i 2020, hvor tallet lå på 55 %. Det totale

antal indsendelser fordelte sig på 647 forskellige besætninger registreret med forskellige CHR numre, hvoraf 377 fik påvist influenza A virus, svarende til 58 % af de indsendende besætninger.



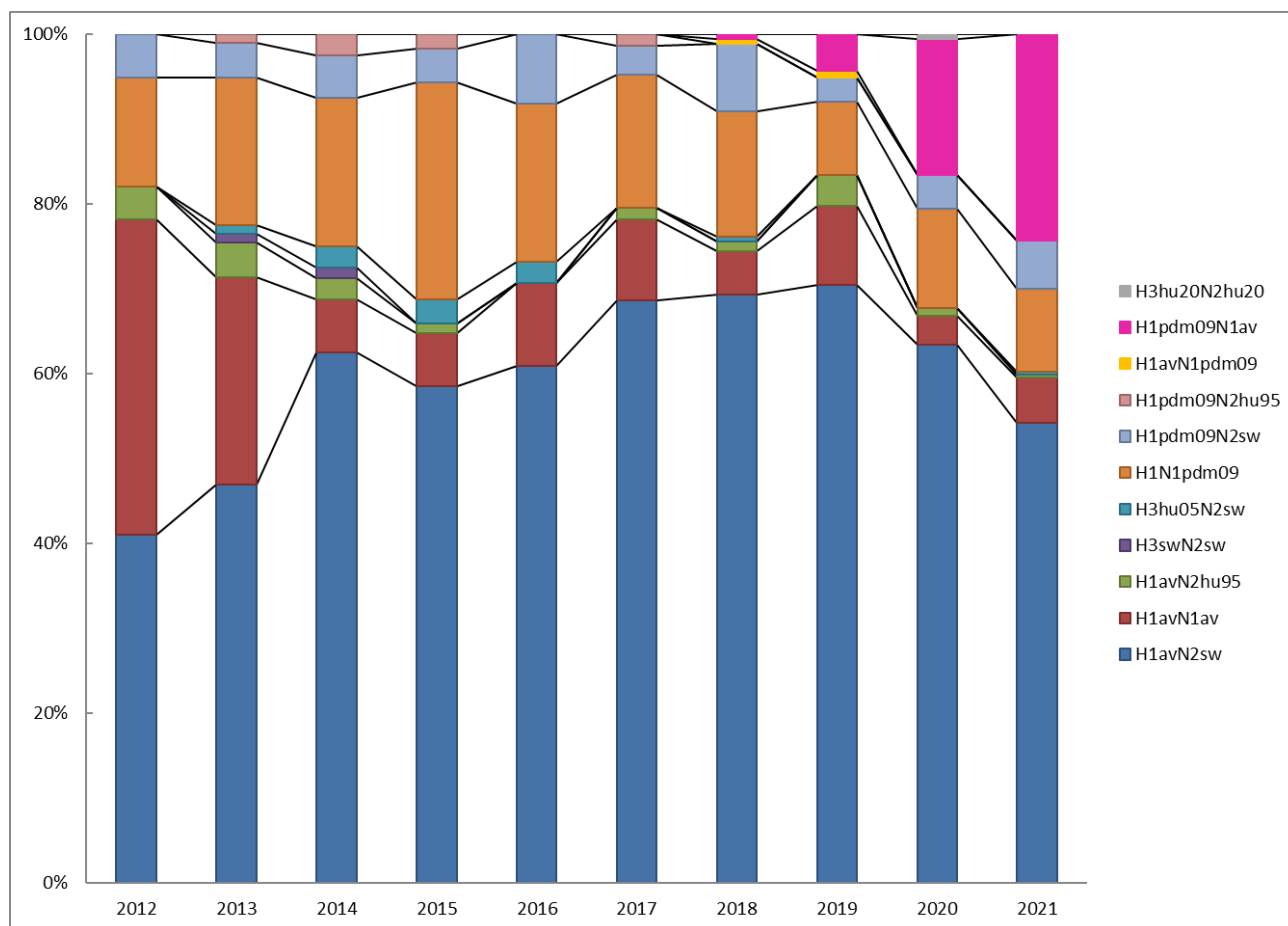
Figur 3. Andelen (%) af de undersøgte indsendelser, der testede positiv for influenza A virus og andelen der var positiv for H1pdm09 i årene 2012 til 2021.

Alle prøver fundet positive for influenza A virus blev undersøgt for H1pdm09 med et real time RT-PCR assay, der er specifik for HA-genet i H1N1pdm09 svineinfluenzaen fra 2009. I 2021 blev 1177 influenza A positive prøver fra 377 besætninger (453 indsendelser) undersøgt for H1pdm09, hvoraf 189 (42 %) af indsendelserne var positive, og repræsenterede 164 forskellige besætninger. Derved har andelen af H1pdm09 positive indsendelser taget et stort spring i forhold til de tidligere år i overvågningsprogrammet. Dog så vi allerede sidste år en begyndende stigning i andelen af indsendelser positive for H1pdm09. Den geografiske fordeling af H1N1pdm09 virus fremgår af Bilag 4b, hvor det ses at denne subtype, i lighed med sidste år, er fundet i alle landsdele. Af figur 3 fremgår andelen af indsendelser, der indeholder H1pdm09, forstået således at tallene omfatter både reassortants, hvor H1pdm09 indgår, samt indsendelser hvor flere subtyper blev konstateret.

Svineinfluenza A virus subtyper

I 2021 var 453 indsendelser positive for influenza A virus og af disse blev subtypen (både HA og NA subtypen) bestemt for 312 forskellige indsendelser svarende til 69 % af de positive indsendelser, hvilket er markant højere end alle tidligere år, og 15 % højere end sidste år. I 15 (5%) af indsendelserne blev der fundet flere subtyper, og disse indsendelser ikke indregnet i nedenstående figur over fordelingen af subtyper.

Den procentvise fordeling af subtyper for de 297 indsendelser, der kun indeholdt én subtype, fremgår af Figur 4 for årene 2012-2021. Der er som udgangspunkt kun blevet subtypet på den mest positive prøve fra hver indsendelse. Dog er der i tilfælde af et resultat, der indikerede tilstedeværelse af flere subtyper, udvalgt flere prøver fra samme indsendelse til videre subtypning. Fordelingen af subtyper i indsendelser med flere forskellige subtyper tilstede fremgår af Tabel 1.



Figur 4. Fordeling af subtyper i procent ud af de subtypede influenza A virus positive indsendelser for årene 2012-2021.

H1pdm09N1av er igen i år i markant fremgang, og udgjorde 24 % af alle de subtypede indsendelser. Sammenfaldende med stigningen af H1pdm09N1av i 2020 og 2021, er der sket et markant fald i andelen af H1avN2sw for første gang siden overvågningen startede. Den originale H1N1pdm09 subtype holdt niveauet fra 2020, og udgjorde 10 % af alle subtypede indsendelser, mens andelen af H1pdm09N2sw var steget en anelse. Der var en mindre stigning i andelen af H1avN1av, som var den første influenza A subtype, der blev påvist i Danmark. Niveauet af denne er dog stadig sammenligneligt med andelen set siden 2014. Af de mindre prævalente subtyper, blev der fundet én indsendelse som var positiv for H1avN2hu95 og én indsendelse der var positiv for H3hu05N2sw.

Den europæiske variant af H1huN2sw, der opstod i England i 90'erne, er fortsat ikke påvist i danske svin og det samme gør sig gældende for svine H3swN2sw, som nu ikke har været påvist siden 2014.

En detaljeret fordeling af subtyper kan ses i Tabel 1, hvor antal og den procentvise fordeling er vist for hver subtype. Denne tabel indeholder også de 15 indsendelser, hvori der blev fundet flere HA og/eller NA gensegmenter i den samme indsendelse. Den geografiske fordeling af alle subtyper påvist på forskellige CHR-numre fremgår af Bilag 4c.

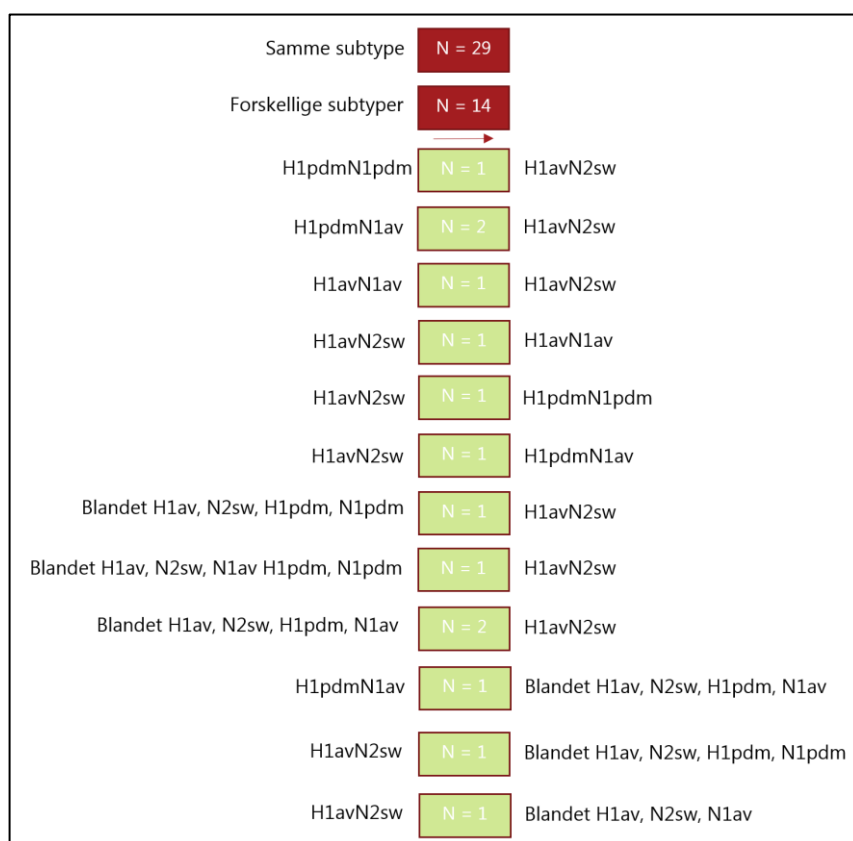
Overvågning af influenza A i svin, december 2022

Subtype	Antal						Kommentar
	2021 N (%)	2020 n (%)	2019 n (%)	2018 n (%)	2017 n (%)	2016 n (%)	
H1avN1av	16 (5,4)	7 (3,4)	13 (9,4)	9 (5,1)	14 (9,5)	12 (9,8)	"Normal" europæisk svineinfluenza A virus subtype "avian-like swine" som har cirkuleret i DK siden 1981.
H1avN2sw	161 (54,2)	130 (63,4)	98 (70,5)	122 (69,3)	101 (68,7)	75 (61,0)	Dansk svineinfluenza A virus subtype fundet første gang i 2003.
H1avN2hu95	1 (0,3)	2 (1)	5 (3,6)	2 (1,1)	2 (1,4)	0 (0)	"Normal" europæisk svine H1 sammen med human N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H3swN2sw	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	"Normal" svine H3N2 virus. Ikke detekteret 2010-2011.
H3hu05N2sw	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	1 (0,6)	0 (0)	3 (2,4)	Ny reassortment med humant H3, der cirkulerede i mennesker i DK 2005, sammen med dansk svine N2.
H3hu20N2hu20	0 (0)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	Human sæson variant. Fundet første gang i danske svin i 2020.
H1N1pdm09	29 (9,8)	24 (11,6)	12 (8,6)	26 (14,8)	23 (15,6)	23 (18,7)	Pandemisk svineinfluenza A virus subtype. Fundet første gang i danske svin januar 2010.
H1pdm09N2sw	17 (5,8)	8 (3,9)	4 (2,9)	14 (8,0)	5 (3,4)	10 (8,1)	Pandemisk H1 sammen med dansk svine N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1pdm09N2hu95	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,4)	0 (0)	Pandemisk H1 sammen med human N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1avN1pdm09	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	1 (0,6)	0 (0)	0 (0)	Dansk avian-like swine H1 sammen med pandemisk N1.
H1pdm09N1av	72 (24,2)	33 (16,2)	6 (4,3)	1 (0,6)	0 (0)	0 (0)	Pandemisk H1 sammen med N1 fra dansk "avian-like swine" H1N1.
H1av N1av, N2sw	3	2	-	-	-		
H1av N1pdm09, N2sw	0	3	-	-	-		
H1pdm09 N1pdm09, N2sw	0	1	-	-	-		
H1av, H1pdm, N2sw	2	0	-	-	-		
H1pdm, N1pdm, N1av	1	0	-	-	-		
H1av, H1pdm09 N1pdm09, N2sw	2	4	-	-	-		
H1av, H1pdm, N1av, N2sw	2	0	-	-	-		
H1av, H1pdm09 N1av, N2sw	2	1	-	-	-		
H1av, H1pdm, N1av, N2sw	2	0	-	-	-		

H1pdm, N1pdm, N1av, H1av, N2sw	1	0	-	-	-	
--------------------------------------	---	---	---	---	---	--

Table 1. Antal indsendelser hvor subtypen af influenza A virus blev bestemt fra årene 2015-2021. Subtypen blev enten påvist ved sekventering af HA og NA generne, multiplex real time RT-PCR eller NGS. Tallene angiver antallet af subtyper fundet, og tallet i parentes er procent, som er udregnet i forhold til det totale antal subtypedede indsendelser.

I 2021 blev der indsendt prøver fra 647 besætninger med forskellige CHR numre. Fra 106 (16 %) af disse besætninger modtog vi prøver af flere omgange, og for 43 af disse besætninger blev subtypen bestemt mere end én gang i løbet af året. I 29 af disse besætninger blev der fundet den samme subtype ved alle indsendelser, mens der i 14 (32 %) af indsendelserne blev fundet forskellige subtyper i de forskellige indsendelser. Skiftet af subtype over tid i disse besætninger er illustreret i Figur 5.



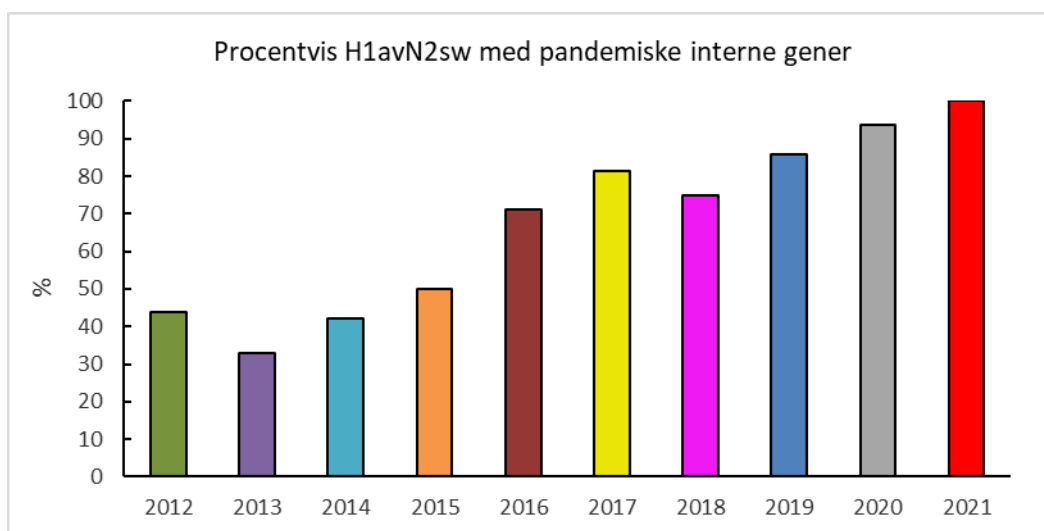
Figur 5. Oversigt over besætninger, som har fået subtypet indsendelser indsendt over flere gange i løbet af 2021, og overblik over ændringen i subtype fra den første indsendelse til den efterfølgende. "N" angiver antallet af besætninger, hvor den pågældende ændring er sket.

Svineinflenzavirus reassortants

For at undersøge hvilke svineinflenzavirus varianter, der i dag cirkulerer i de danske svin, blev alle gensegmenter fra udvalgte influenza A virus isolater (n=11) og primære prøver (n=27) fra 2021 fuld genom sekventeret vha. NGS. Oprindelsen af de enkelte gener for de undersøgte svineinflenzavirus blev identificeret ved sammenligning med gensekvenser i tilgængelige databaser og fremgår af Bilag 3. Nedenstående opsummerer resultaterne for de enkelte subtyper baseret på fuld genom karakteriseringen.

Da det kun er en mindre del af positive prøver, der er blevet karakteriseret, skal udviklingen fra år til år tages med et vist forbehold.

H1avN2sw virus udgjorde otte af de fuld genom sekventerede prøver. Halvdelen af disse H1avN2sw virus havde en komplet pandemisk intern genkassette, mens den anden halvdel havde en blandet intern kassette med gener af både pandemisk (H1N1pdm09) og "avian-like" swine H1N1 oprindelse. De fire virus der havde en blandet intern kassette havde NS genet og/eller M og PB2 generne af "avian-like" swine oprindelse, mens de resterende gener var af pandemisk oprindelse. Dermed havde 100 % af de sekventerede H1avN2sw prøver i 2021 minimum et gen af H1N1pdm09 oprindelse (Figur 6), og stigningen fra tidligere år er dermed fuldendt.



Figur 6. Andelen af fuld genom sekventerede isolater/prøver med minimum et gen af H1N1pdm09 oprindelse i procent af det totale antal H1avN2sw virus fra 2012-2021.

H1avN1av "avian-like". To virus af denne subtype blev fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse. Det ene virus havde en komplet intern kassette af "avian-like" oprindelse, mens det andet havde et M gen af H1N1pdm09 oprindelse.

H1N1pdm09. Otte H1N1pdm09 virus blev fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse, seks af disse virus havde et "avian-like" NS gen, mens de resterende gener var af H1N1pdm09 oprindelse. Disse virus havde altså samme genkonstellation, som det virus der forårsagede et zoonotisk tilfælde med H1N1pdm09 i 2021⁴. De to resterende virus havde en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse.

H1pdm09N1av. Seksten virus med denne subtype blev fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse. Halvdelen af disse virus havde et NS gen af "avian-like" oprindelse, mens de resterende interne gener var af H1N1pdm09 oprindelse. Disse virus havde altså samme genkonstellation, som den virus der forårsagede et

⁴ Reassortant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Elderly Woman, Denmark, January 2021, Emerging Infectious Diseases 2021, <https://doi.org/10.3201/eid2712.211361>

zoonotisk tilfælde med H1pdm09N1av i 2021⁵. Den anden halvdel af de sekventerede H1pdm09N1av virus havde en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse.

H1pdm09N2sw. Tre virus af denne subtype blev fuld genom karakteriseret. To af disse virus havde en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse, mens det tredje virus havde et NS gen af "avian-like swine" oprindelse og resten af de interne gener af H1N1pdm09 oprindelse.

H3hu05N2sw. Et virus af denne subtype blev i år fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse. Dette virus havde en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse.

Resistens og virulens markører

Der er i litteraturen beskrevet en række forskellige mutationer, der giver anledning til resistens overfor Oseltamivir (Tamiflu) og Zanamivir (Relenza), der kan anvendes til antiviral behandling af humane influenzatilfælde. Tilstedeværelsen af mutationerne H275Y og N295S i N1 og R292K og E119G/D/A/V i N2 blev undersøgt i alle NA sekvenser fra 2021, men ingen af disse mutationer blev fundet i årets fuld genom karakteriserede virus.

Derudover blev alle PB2 gener undersøgt for mutationen E627K, der er forbundet med høj virulens i mennesker. Denne mutation er ikke påvist i nogen af PB2 sekvenserne fra svineinflenzavirus fra 2021.

Samtlige NP sekvenser blev analyseret for tilstedeværelsen af seks tidligere beskrevet "MxA escape" mutationer (48Q, 53D 98K, 99K, 100I/V og 313V)⁶, som potentielt kan gøre virus mere resistent overfor det humane MxA protein. MxA er et antiviralt protein, som anvendes af immunforsvaret til bekæmpelse af influenza infektion. Ingen af de sekventerede virus havde 48Q eller 53D mutationerne, men 5% havde 98K mutationen, 5 % havde 99K mutationen, 76 % havde 100I/V mutationen og 97 % havde 313V mutationen.

Fire nye mutationer (V100I, N321K, I330V, og A639T) blev i 2022 identificeret i PA genet og associeret til at give anledning til øget patogenicitet og transmission af H1avN1av virus i fritter, som agerer som model for human influenza infektion⁷. Alle PA protein sekvenser blev undersøgt for tilstedeværelsen af disse fire mutationer. I alt havde 20 % af de danske virus V100I mutationen, 60 % havde N321K mutationen, 60 % havde I330V mutationen og 100 % havde A639T mutationen. Dog havde ingen af de sekventerede virus alle fire mutationer tilstede samtidigt, men 54 % af virus havde 3/4 mutationer.

I 2021 havde vi de første zoonotiske infektioner med influenza A virus med oprindelse i svin. Den ene af disse zoonotiske virus, bar et trunkeret NS-gen af H1N1 "avian-like" oprindelse. Derfor blev NS genet undersøgt for tilstedeværelsen af trunkering i alle virus, der havde et NS gen af "avian-like" H1N1 oprindelse. I alt havde 8/19 virus et trunkeret NS gen. Seks af disse virus var af subtypen H1N1pdm09 og tilhørte det svineadapterede cluster og mindede derfor genetisk om virus fra den zoonotiske case⁸. De to restende virus var af H1avN2sw subtypen.

⁵ A severe human case of zoonotic infection with swine-origin influenza A virus A/H1pdm09N1av-like in a Danish citizen, November 2021. *Emerging Infectious Diseases* 2022. <https://doi.org/10.3201/eid2812.220935>

⁶ Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses, *Cell Host & Microbe* 2020, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.006>.

⁷ A Eurasian avian-like H1N1 swine influenza reassortant virus became pathogenic and highly transmissible due to mutations in its PA gene, *PNAS* 2022, <https://doi.org/10.1073/pnas.2203919119>.

⁸ Reassortant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Elderly Woman, Denmark, January 2021, *Emerging Infectious Diseases* 2021, <https://doi.org/10.3201/eid2712.211361>

Samlet analyseoversigt

Tabel 3 viser aktiviteter gennemført i overvågningen af influenza A virus i svin i 2021. Til sammenligning er resultaterne for 2016-2020 angivet. Antallet af indsendelser og prøver i 2021 er steget i forhold til de forgående år.

Tabel 3. Samlet oversigt over analyser udført i svineinfluenza overvågningen i 2016-2021.

Parameter	2021	2020	2019	2018	2017	2016
Antal indsendelser undersøgt for influenza A virus ^a	856	723	586	503	469	480
Antal prøver Undersøgt for influenza A virus	2895	2512	1906	1469	1090	1115
Antal indsendelser med min. 1 influenza A virus positiv prøve	453	400	318	282	240	227
Antal influenza A virus positive prøver i alt	1177	950	751	641	446	411
Antal prøver testet for H1N1pdm09	1177	946	751	641	446	411
Antal H1pdm09 positive indsendelser ^b	189	115	66	62	49	52
Antal H1pdm09 positive besætninger	164	91	60	57	43	48
Indsendelser subtypet på både HA og NA	297	216	139	176	147	109
Resistens undersøgelser ^c	38	26	25	20	27	29
Partiel karakterisering alle segmenter	0	0	0	0	4	0
Fuld længde sekventering	38	26	25	20	23	29

^aUdgifterne til påvisning af influenza påhviler indsender og er dermed ikke omfattet af aftalen.

^bBaseret på påvisning af HA gen fra H1N1pdm09 med real-time RT-PCR.

^cAnalysen er lavet *in silico* og har derfor ikke haft yderligere omkostninger

Fylogenetiske analyser

Som beskrevet i sidste års overvågningsrapport har vi publiceret et studie med data fra den danske svine overvågning, som viste specifikke grupperinger inden for H1av, H1pdm09 og H3. Derfor er der for virus fra 2021, som sidste år, udført fylogenetiske analyser på disse tre HA gener separat (Bilag 1a-1c). Humane zoonotiske infektioner i 2020 og 2021 med H1pdmNx virus og H1avNx virus fra svin, er i år medtaget i de fylogenetiske analyser. Disse inkluderer både sekvenser fra Danmark og resten af verden og er markeret med "*" i træerne.

I år er der i en prøve påvist H1pdm09Nx virus, som er tæt beslægtet med den humane sæson influenza for 2021 ("Bilag 1a – "2021S-25161-4_H1pdmN1pdm"). Der er derfor stor sandsynlighed for at besætningen med denne prøve, har fået introduceret influenza A virus via et influenza A virus smittet menneske (reverse-zoonotic event). De resterende H1N1pdm09 virus, som er blevet sekventeret i år, ligger alle i det såkaldte "svine-adaptede" cluster af H1pdm09Nx virus (Bilag 1a – "Svineadapteret H1N1pdm09/N2sw").

Dette cluster består af H1pdm09Nx virus, der har tilpasset sig svin, siden H1N1pdm09 blev introduceret i den danske svine population i 2010. Disse virus har cirkuleret i svin uafhængigt af den humane sæson H1N1pdm09 virus, hvilket betyder at de genetisk er meget forskellige fra den humane H1N1pdm09 sæsoninfluenza virus. På baggrund af den store genetiske forskel og akkumulering af mutationer i antigene sites forventes der at være lav krydsbeskyttelse mellem de humane sæson influenza virus og de svineadapterede H1pdm09Nx virus. Dette blev illustreret ved at Danmark, i 2021 havde den første humane zoonotiske infektion med netop et H1N1pdm09 virus, der tilhørte dette svinespecifikke cluster (Bilag 1a – "A/Denmark/1/2021 *")⁹. Det ses yderligere at virus fra den zoonotiske infektion befinder sig i et subcluster af H1N1pdm09 svineadapterede virus, der alle indeholder et NS gen af "avian-like" oprindelse, ligesom virus fra den zoonotiske infektion også indeholdt et "avian-like" NS gen. Antigen karakterisering af den zoonotiske virus viste, at der ingen krydsreaktion var mellem dette virus, og antisera rejst mod de humane H1N1pdm09 vaccine stammer. Dette betyder at den anvendte humane vaccine, formodentlig ikke vil beskytte mod smitte af dette specifikke svineadapterede H1N1pdm09 virus.

Seksten (16) virus af subtypen H1pdm09N1av blev sekventeret i årets overvågning, og disse virus grupperer sig i et unikt cluster, sammen med andre H1pdm09N1av virus fra tidligere år (Bilag 1a – "H1pdm09N1av reassortant"). Dette cluster afviger genetisk meget fra både den humane sæsoninfluenza og fra det svineapdaterede cluster. H1pdm09N1av clusteret indeholder nu to genotyper af virus: 1) virus med en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse og 2) virus med et NS gen af "avian-like" oprindelse med resterende interne gener af H1N1pdm09 oprindelse. Fordelingen blandt de to genotyper er 1:1. I november 2021, blev den anden zoonotiske humane infektion med et virus med oprindelse i danske svin påvist⁹. Dette virus tilhørte netop det beskrevne cluster, og var af den genotype, der indeholder et NS gen af "avian-like swine" oprindelse (Bilag 1a – "A/Denmark/36/2021 *"). I træet ses et subcluster af virus inden for H1pdm09N1av reassortant clusteret, som alle indeholder et "avian-like swine" NS gen, samt den humane case virus. Lig den første humane zoonotiske infektion, var der her tale om et virus, som ingen krydsreaktion havde til antisera rejst mod de humane H1N1pdm09 vaccine stammer¹⁰.

To ud af de tre H1pdmN2sw virus findes blandt de svineadapterede H1N1pdm09 virus, mens ét H1pdmN2sw virus har dannet et subcluster tæt på det svineadapterede cluster, sammen med to H1pdmN2sw virus fra 2019 og 2020 (Bilag 1a – "subcluster af H1pdmN2sw").

For H1av sekvenserne ses det at halvdelen grupperer sig i et cluster, der er domineret af H1avNx virus, der primært har en intern kassette med gener af H1N1pdm09 oprindelse (Bilag 1b – "H1avN2sw/hu med dominans af pandemiske interne gener"), og som er defineret som "cluster 4" i et tysk studie¹¹. De resterende sekvenser er fordelt i mindre clustre i træet. Generelt er diversiteten mellem de forskellige H1avNx virus i Danmark ekstrem høj, og bare i 2021 er HA sekvenserne op til 16,5 % forskellige fra hinanden. Det ses samtidigt, at der i udlandet har været flere zoonotiske tilfælde med H1avNx virus, der er tæt beslægtede med danske H1avNx virus (Bilag 1b).

⁹ Reassortant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Elderly Woman, Denmark, January 2021, *Emerging Infectious Diseases* 2021, <https://doi.org/10.3201/eid2712.211361>

¹⁰ A severe human case of zoonotic infection with swine-origin influenza A virus A/H1pdm09N1av-like in a Danish citizen, November 2021. *Emerging Infectious Diseases* 2022. <https://doi.org/10.3201/eid2812.220935>.

¹¹ Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses, *Cell Host & Microbe* 2020, <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.07.006>.

Et H3hu05N2sw virus blev i år sekventeret, og det var tydeligt, at dette virus indeholdt et H3 gen, der var beslægtet med den humane sæsoninfluenza fra 2005 (Bilag 1c – ”2005 human sæson influenza-like H3huN2sw/N1av”), som har cirkuleret med lav prævalens i danske svinebesætninger i flere år, og første gang blev påvist i 2013¹². Der er i år inkluderet en gruppe af spanske svine sekvenser i træet, som stammer fra udegående sortfodssvin (Bilag 1c – ”Spansk H3huN1av”). Disse spanske svin var inficeret med en helt ny kombination af HA og NA gener; H3N1, med HA genet, der ligner den humane sæsoninfluenza fra 2005 og et NA gen af ”avian-like” H1N1 oprindelse¹³.

Den fylogenetiske analyse af N1 sekvenserne afspejler de samme clusters (Bilag 2a), som ses i træet for H1pdmNx virus. Der ses igen et tydeligt cluster, der indeholder de svineadapterede H1N1pdm09 virus samt et cluster, der indeholder virus af subtypen H1pdm09N1av. Dette tyder på at evolutionen af HA og NA i disse virus har fulgtes ad, og at der indtil videre ikke er opstået reassorterede virus mellem de to clustre af virus. For N2sw sekvenserne er billedet mere blandet, og det ses at NA sekvenser fra H1avN2sw virus og H1pdmN2sw virus ligger i samme clustre (Bilag 2b), hvilket tyder på at adskillige reassortant events er forekommet gennem årene.

Diskussion

Cirkulerende influenza virus i Danmark

Forekomsten af influenza A virus i svin i Danmark er undersøgt systematisk over en periode på 12 år, hvorved der er opnået en dynamisk indsigt i hvilke influenzavirus, der cirkulerer blandt danske svin. Indtil i år har forekomsten af de forskellige subtyper været relativt stabil med dominans af H1avN2sw. Men introduktionen af H1N1pdm09 har medført dannelsen af en række nye virus med kombinationer af gener fra dette virus og de enzootiske svineinflenzavirus, hvor én virus af H1pdm09N1av subtypen ser ud til at have en særlig fordel i den danske svinepopulation, da denne har spredt sig hurtigt, på bekostning af H1avN2sw. Derudover er det vigtigt at være opmærksom på at vi med jævne mellemrum ser fund af influenza virus i danske svin med gener fra de humane sæson influenza virus, som efterfølgende medfører dannelse af nye reassortants.

Igennem årene er der i overvågningen blevet påvist seks nye subtyper (H1pdmN2sw, H3huN2sw, H1pdm09N1av, H1avN1pdm09, H1pdm09N2sw og H1pdm09N2hu) der indeholder gener fra H1N1pdm09, som er kendt for at have zoonotiske egenskaber. Derudover indeholder flere af disse virus også gener fra den humane sæsoninfluenza, som vi ved har været i stand til at inficere mennesker. Der bør derfor holdes øje med disse virus varianter og deres zoonotiske potentiale bør undersøges i dybden med yderligere tests, som ikke er inkluderet i det nuværende overvågningsprogram.

Lig de forrige år er andelen af H1avN2sw virus, som indeholder interne gener af H1N1pdm09 oprindelse igen steget og er nu nået 100 %. Sammenholdt med stigningen af reassortants indeholdende både overflade gener og interne gener fra H1N1pdm09, indikerer det, at disse gener eller gen-konstellationer er en fordel for virus. Dette kan både være et resultat af en forøget/forbedret replikation/transmission, eller en øget evne til at undgå værtens immunrespons. Reassortants med H1N1pdm09 gener er påvist i adskillige andre lande i Europa, Asien og Nordamerika, hvilket viser, at introduktionen af dette virus har medført en

¹² Triple-reassortant influenza A virus with H3 of human seasonal origin, NA of swine origin, and internal A(H1N1) pandemic 2009 genes is established in Danish pigs. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. <https://doi.org/10.1111/irv.12451>

¹³ Evolution of influenza A virus in intensive and free-range swine farms in Spain. *Virus evolution* 2021. <https://doi.org/10.1093/ve/veab099>.

signifikant ændring af influenza virus dynamikken i svin globalt, og har vanskeliggjort diagnostik og kontrol af disse virus. At interne pandemiske gener udgør en fordel understreges af, at der indtil sidste år ikke var blevet observeret et virus med overflade gener af H1N1pdm09 oprindelse, som udelukkende havde "avianlike" interne gener og fordi at alle H1avN2sw virus nu indeholder minimum et gen af H1N1pdm09 oprindelse.

Der er i 2021 fundet flere prøver der indeholdt flere HA og/eller NA gener i forskellige kombinationer, men da det ikke vides, hvordan disse gensegmenter skal kombineres, er vi ikke i stand til at bestemme subtyperne. Fundet af flere HA og NA gener i én prøve, indikerer at et stigende antal besætninger er smittet med mere end én subtype af gangen. Dette er problematisk af flere årsager. For det første er det sværere for besætningerne at kontrollere virus, når flere subtyper er tilstede, og for det andet giver tilstedeværelsen af flere subtyper i samme besætning virus optimale vilkår for at danne nye reassortants. Opgørelsen over subtyper fra besætninger, der har indsendt prøver flere gange i løbet af året, viser, at en stor andel af disse besætninger får introduceret nye subtyper, eller at flere subtyper cirkulerer i besætningen samtidig, og understreger derved også den ovenstående problematik.

Modsat de foregående to år, påviste vi et virus af H3huN2sw subtypen. Formentligt, har H3huN2sw virus kontinuerligt cirkuleret "skjult" de forrige år, da en lav prævalens betyder at vi skal have en større andel af de danske besætninger til at indsende prøver, for at være i stand til at påvise tilstedeværelsen af dette virus. Vi skal være specielt opmærksomme på virus af denne subtype af tre årsager. For det første forventes det at størstedelen af svinene i de danske svinebesætninger er fuldt modtagelige for dette virus, da denne subtype kun har cirkuleret i et fåtal af besætningerne de seneste år, og for det andet har serologiske undersøgelser vist en meget begrænset krydsreaktion mellem dette H3huN2sw virus, og det H3swN2sw virus, der er inkluderet i den kommercielle svineinfluenza vaccine, der er tilgængelig i Danmark. For det tredje kan dette virus have et øget zoonotisk potentiale, da både HA genet og de interne gener har human oprindelse, og derved må formodes at have evnen til at inficere mennesker. Det er interessant, at der i nu i Spanien er fundet virus bærende det samme HA gen, som de danske virus, da dette kan betyde at præcist den sæsoninfluenza, der cirkulerede i 2005, var bedre i stand til at smitte svin. Det kan også betyde at dette HA gen har været etableret og ikke-detekteret i europæiske svinepopulationer grundet lav prævalens. Det er dog bekymrende, at der ses en helt ny kombination af HA og NA gener (H3N1) i Spanien, som potentielt kan spredes til konventionelle svinebesætninger. Tidligere studier fra USA har påvist, at nye kombinationer af HA og NA gener kan lede til en hurtig ekspansion af virus i svinepopulationen¹⁴.

Veterinære aspekter

I 2021 er der igen sket en markant stigning (16 %) i antallet af indsendelser til overvågningsprogrammet i forhold til 2020. Dette er formentligt et resultat af, at influenza har fået øget bevågenhed blandt landmændene og dyrlægerne, og at der er øget fokus på at finde årsager til symptomer, fremfor at behandle bredt med antibiotika. Andelen af positive indsendelser i år (53 %) ligger på niveau med de seneste to år, men altså samlet markant højere end de tidligere år i overvågning. Dette kan skyldes at antallet af prøver per indsendelse er steget de seneste 3 år, hvilket øger chancen for at finde positive dyr. Alternativt kan det afspejle at influenza A virus har fået en relativ større betydning, som årsag til respirationsvejslidelser hos svin. Sammenholdt med at hovedparten af indsendelserne var fra besætninger

¹⁴ Genetic and Antigenic Characterization of an Expanding H3 Influenza A Virus Clade in U.S. Swine Visualized by Nextstrain. mSphere 2022. <https://doi.org/10.1128/msphere.00994-21>.

med kliniske respirationsvejs symptomer, understreger den høje andel af positive indsendelser, at influenzavirus hos svin kan have signifikante sundhedsmæssige og velfærdsmæssige konsekvenser i besætningerne. Det øgede fokus på influenzavirus som årsag til kliniske symptomer, har også medført en kraftig stigning i antallet af solgte vaccinedoser mod influenza A virus til svin de seneste år. Alt andet lige vil den øgede diagnostik, sammenholdt med øget forebyggelse vha. vaccination, bidrage til at nedbringe forbruget af antibiotika til behandling af respirationsvejslidelser i svinebesætningerne.

Der findes på nuværende tidspunkt to kommercielt tilgængelige vacciner på det danske marked. Den ene vaccine indeholder virus af den pandemiske subtype, og beskytter derved kun mod infektion med denne type, mens den anden dækker de enzootiske H1av, H1hu og H3sw subtyper. Derfor er korrekt influenza diagnostik ekstrem vigtig i forhold til vaccinevalg. Det genetiske data opnået gennem overvågningen har også bidraget til at kortlægge den store genetiske spredning inden for samme subtype. Disse resultater hjælper til at sætte fokus på nødvendigheden af vaccineopdateringer, og er med til at forklare sygdomsudbrud uden introduktion af en ny subtype. Derudover er det også vigtigt at pointere at vaccinerne ikke dækker mod alle subtyper, som vi finder i Danmark. Som nævnt tidligere har vi set en meget begrænset krydsreaktion mellem H3huN2sw virus, og det H3swN2sw virus, der er inkluderet i den kommercielle vaccine.

I år har vi opgjort hvor mange af de besætninger, som har sendt prøver ind af flere omgange i løbet af året, der har ændret subtype. I 32 % af disse besætninger er der sket et skift i subtype, hvilket understreger at en ny subtype hurtigt kan komme ind og dominere i en besætning med lav immunitet mod den givne virus. Derfor kan det være en fordel for besætningerne at vaccinere med begge vacciner, da de derved opnår en vis immunitet mod udefrakommende influenza virus. Dette skal også sammenholdes med at en af de mest prævalente virus reassortants (H1pdm09N1av) indeholder gener både af "avian-like" og H1N1pdm09 oprindelse, samt at alle vores H1avN2sw virus nu har minimum et gen i den interne kassette af H1N1pdm09 oprindelse. Dog bør det undersøges i dybden, hvor godt de veterinære influenza vacciner dækker mod de forskellige virus varianter, da der må siges at være en betydelig diversitet blandt virus af samme subtype, som kan have indflydelse på vaccine effekten, som understreges med de to zoonotiske virus, der viste manglende krydsbeskyttelse med de humane influenza vaccine stammer.

Zoonotiske aspekter

I år er andelen af positive indsendelser med tilstedeværelse af H1pdm09 steget yderligere til 42 % af alle de influenza positive indsendelser. Dette er bekymrende, da vi ved virus med HA gen af H1N1pdm09 oprindelse er i stand til at inficerer mennesker. Derudover er der i 2021 sket to zoonotiske tilfælde med netop virus indeholdende et HA gen af H1N1pdm09 oprindelse. Samtidig har vi også set en yderligere stigning andelen af H1pdm09N1av virus, hvilket tyder på at denne virus har en fordel i forhold til de tidligere kendte virus. Dette kan skyldes at virus er i stand til at undgå besætningsimmuniteten eller at virus har en bedre viral fitness. Som det første virus, lader det til at H1pdm09N1av kan udkonkurrerer den danske H1avN2sw, som har været dominerede i Danmark siden overvågningens start. Dette er bekymrende for et folkesundhedsperspektiv, da netop én virus af denne subtype gav anledning til en zoonotisk infektion i 2021. Det andet virus, som i 2021 gav anledning til en zoonotisk infektion var forårsaget af en H1N1pdm09 virus tilhørende det svineadapterede cluster. Sidste år advarede vi mod det zoonotiske potentiale i disse virus, da vi havde publiceret et studie, der viste at ændringerne i det svineadapterede cluster netop

hovedsageligt var lokaliseret i de steder i HA proteinet, som er vigtig for antistof-binding¹⁵. Dette bekræftes af at virus fra den zoonotiske infektion ikke viste nogen krydsbeskyttelse til antisera rejst mod de humane H1N1pdm09 vaccine stammer. Endvidere har eksperimentelle infektioner udført i projektet FluZooMark¹⁶ vist, at den svineadapterede H1N1pdm09 stamme kan inficere både fitter og grise, og der ses også aerosol smitte i en andel af fitterne (manuscript under forberedelse). Derfor bør både H1pdm09N1av og svineadapteret H1N1pdm09 virus være i hovedfokus, når vi skal vurdere risiko for human smitte.

Det skal bemærkes at der i år er påvist en stor andel af virus, som indeholder et NS gen af "avian-like" oprindelse. Det er første gang i overvågningen at dette observeres, da der ellers har været en nedgang i andelen af virus, der havde interne gener af "avian-like" oprindelse. Dog skal det tages i betragtning at der i år også er sekventeret flere virus end tidligere år i overvågningen, hvilket understreger vigtigheden af at fuld genom karakterisere flere virus løbende. Da de to virus fra de to zoonotiske infektioner i år begge var med virus, der indeholdte et NS gen af "avian-like" oprindelse, bekymre denne generelle udvikling os. Der bør initieres yderligere undersøgelser der har fokus på at kortlægge betydningen af dette "avian-like" NS gen for virus zoonotiske potentiale og transmission/replikation, da dette lader til at være en fordel for virus.

Danmark er ikke det eneste land, der har oplevet zoonotiske infektioner med influenza virus med oprindelse i svin i 2020/2021. Holland, Tyskland og Frankrig har rapporteret om human smitte med en "avian-like" H1avNx virus med oprindelse i svin. Disse virus er nært beslægtet med de "avian-like" H1avNx, vi ser hos svin i Danmark, og man må derfor formode, at lignende introduktioner kan ske her. Den humane befolkning forventes at have lav immunitet mod virus med et HA med "avian-like" oprindelse, så hvis disse virus får evnen til at smitte blandt mennesker er der risiko for hurtig spredning i befolkningen. Derfor er det vigtigt at der i den humane influenza overvågning overvåger for smitte med svinespecifikke virus.

Samtidig ser vi, som tidligere nævnt, en stigning i både antallet af reassortants indeholdende overflade gener fra H1N1pdm09, samt virus varianter med interne gener fra H1N1pdm09. Dette er bekymrende, da vi ved at H1N1pdm09 har zoonotiske egenskaber, og at influenzavirus fra svin i USA indeholdende netop interne gener fra H1N1pdm09, har ledt til adskillige humane infektioner. De nye reassortants, der bliver påvist i svineinfluenza overvågningen, og forøges i prævalens bør karakteriseres mere detaljeret for at kunne forudsige det zoonotiske potentiale. Sådanne test ville indebære dyrkning af udvalgte virus isolater til test i hemagglutinations inhibitions assay og virus neutralisationstest mod antisera mod de humane vaccinstammer. Derudover kan der udvælges specifikke virus ud til infektionsforsøg i fitter, hvor man kan undersøge virus egenskaber til at forårsage sygdom og spredes via aerosoler.

Sidste år blev der for første gang påvist en komplet H3 human sæsoninfluenza i svin (H3hu20N2hu20), men denne virus er ikke blevet påvist i årets overvågning, hvilket tyder på at denne komplette humane sæsoninfluenza ikke har spredt sig i danske svin. I år er der til gengæld påvist en H3hu05N2sw virus, som har et HA gen, der stammer tilbage fra den humane sæsoninfluenza i 2005. Det er et problem at disse virus bliver ved med at cirkulere i de danske svinebesætninger, da de på den måde fungerer som reservoir for ældre humane sæson influenza virus, som den yngre human befolkning højst sandsynligt ikke vil have høj

¹⁵ Co-circulation of multiple influenza A reassortants in swine harboring genes from seasonal human and swine influenza viruses. eLIFE 2021. <https://doi.org/10.7554/eLife.60940>.

¹⁶ <https://fluzoomark.dk/>

immunitet imod. Desuden har der været indikationer på at influenzavaccinerne til grise ikke beskytter mod hverken H3hu05N2sw og H3hu20N2hu20 virus.

Konklusion

Overvågningen i 2021 har fungeret hensigtsmæssigt med henblik på at identificere influenza A virus med nye gensammensætninger hurtigt og følge udviklingen, selvom stikprøvestørrelsen, set i forhold til den samlede population af svin, ikke sikrer identifikation af virus, der forekommer med meget lav prævalens (under 5 %). Resultaterne fra overvågningen er vigtige i forhold til at vurdere den zoonotiske trussel, som danske svinebesætninger udgør, idet de må betragtes som et reservoir for et stigende antal forskellige influenza A virus subtyper, der potentielt kan spredes til mennesker.

Resultaterne fra overvågningen gennem de seneste år har bekræftet at H1N1pdm09, som stadig må betragtes som en zoonose, er veletableret i den danske svinepopulation, hvor den cirkulerer uafhængigt af den humane influenzasæson. Overvågningen har endvidere påvist en stigning i antallet af nye virus reassortants, hvor gener fra H1N1pdm09 indgår, hvoraf stigningen af H1pdm09N1av er specielt bekymrende. Stigningen er bekymrende af flere årsager – blandt andet fordi at den markante stigning kan tyde på at tidligere immunitet mod andre virus med H1N1pdm09 oprindelse ikke er tilstrækkelig for at beskytte grisen mod denne subtype, og tilmed er der tegn på at H1pdm09N1av kan udkonkurrerer H1avN2sw. Derudover indeholder H1pdm09N1av gener fra virus, der tidligere har kunne inficerer mennesker, og vi har i 2021 også haft en zoonotisk infektion med et virus af netop denne subtype.

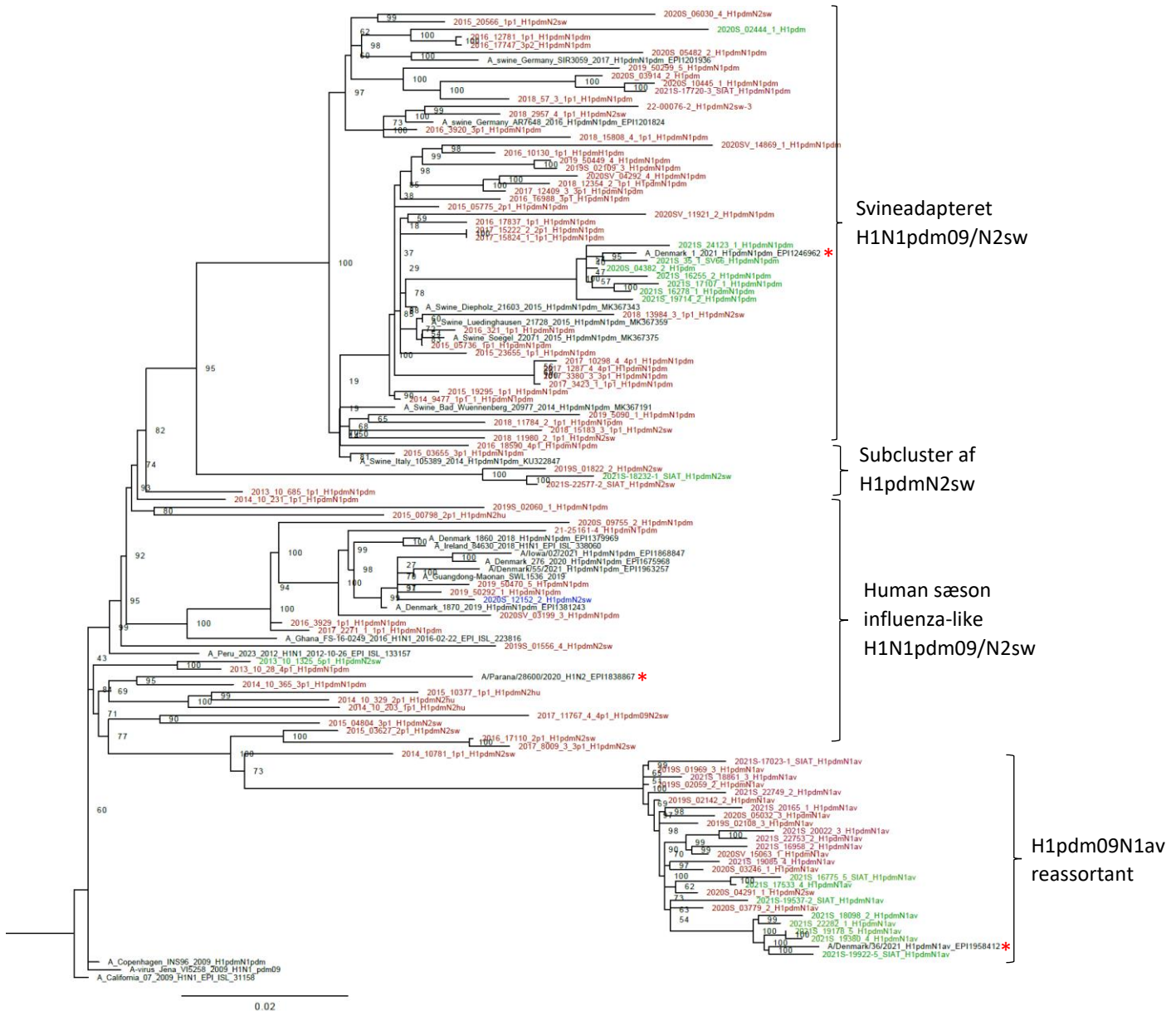
Helt generelt kan vi på baggrund af fuld genom karakteriseringen dokumentere, at gener fra H1pdm09 virus ("pandemiske gener") vinder indpas i de cirkulerende virus i Danmark, hvilket har været trenden de seneste år. Dog er der i år for første gang set en stigning i virus indeholdende et "avian-like" NS gen, hvilket er bekymrende, da begge de zoonotiske virus fra 2021 havde samme genkonstellation. Tilsammen er data fra fuld genom karakteriseringen unikke i forhold til at kunne overvåge udviklingen i Danmark, og kunne dokumentere hvilke tendenser, der har mulig indflydelse på udbredelsen og overlevelse af virus. Tilmed har den tidligere karakterisering af influenza virus i den danske svine population, betydet at vi hurtigt kunne identificerer virus fra de to zoonotiske tilfælde i den humane population. Derudover gør denne karakterisering det muligt at være beredte, hvis en specifik virus pludselig øges i prævalens, og der er behov for genetiske analyser for at afgøre hvilke ændringer, der er sket over tid, som kunne forklare fremgangen. Samtidig muliggør fuld genom karakteriseringen også identifikation af resistens- og virulens markører. Det er vigtigt at overvåge tilstedeværelsen af resistens markører i influenzavirus hos svin, da vi ved, at disse virus kan springe frem og tilbage mellem både svin og mennesker. Tilmed kan virulens markørerne også hjælpe til at forklare mulige intensiverede sygdomstegn i en given besætning.

Fra et veterinært synspunkt er overvågningen ligeledes meget betydningsfuld, da den tilbyder diagnostik af høj kvalitet, som resulterer i at rådgivningen af landmændene bliver baseret på et fagligt grundlag. Resultatet fra subtypningen er ydermere essentiel for dyrlægerne, når den korrekte vaccine skal udvælges, eller når manglende effekt af vaccination opleves i besætningerne. Det er derfor positivt, at der i år er sket en stigning i antallet af indsendelser, da korrekt diagnostik gør det muligt at udvælge den rette vaccinationsstrategi, hvilket i sidste ende er afgørende for at nedbringe risikoen for antibiotikakrævende sekundære infektioner. Det kan konkluderes, at den iværksatte overvågning har givet et betydeligt indblik i

hvilke influenza A virus, der cirkulerer i danske svin, og at denne information dagligt bruges proaktivt til håndtering af sygdom i danske svinebesætninger.

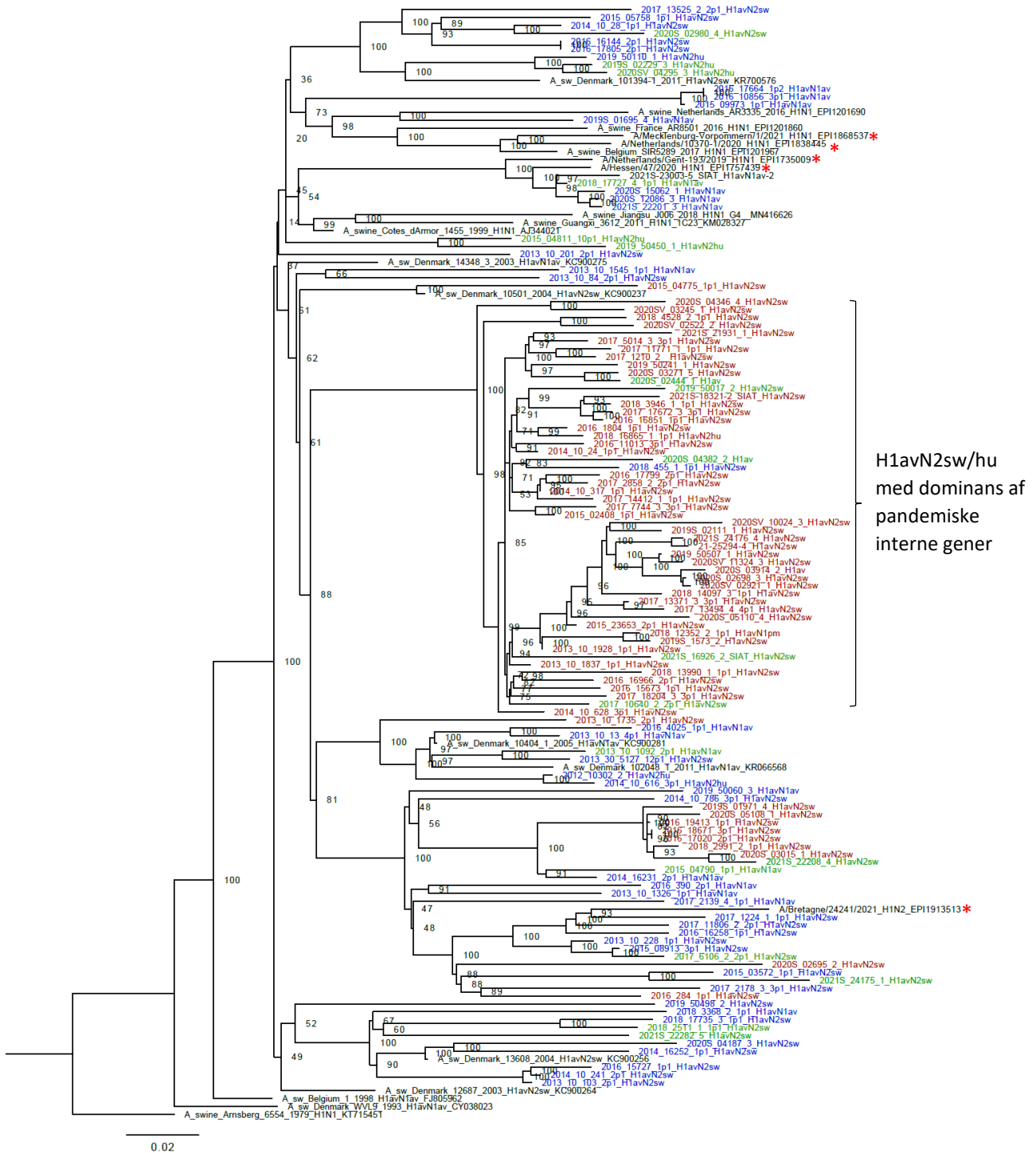
Bilag 1a. H1pdmNx virus fylogeni

Fylogenetisk træ af "pandemisk H1N1pdm09" H1 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2021 baseret på MUSCLE alignment og Maximum likelihood fylogeni. Alle farvede sekvenser er prøver fra overvågningen, hvorimod sorte sekvenser er reference sekvenser fra tidligere danske prøver eller GenBank. Et **rødt**, **blåt** og **grønt** sekvensnavn indikerer at de interne gener er af henholdsvis **H1N1pdm09 oprindelse**, "**avian-like**" oprindelse eller en **blanding** af de to. Først i sekvensnavnet er årstallet for prøven angivet, mens subtypen for prøven angivet sidst i sekvens navnet. "*" angiver virus fra zoonotiske tilfælde.



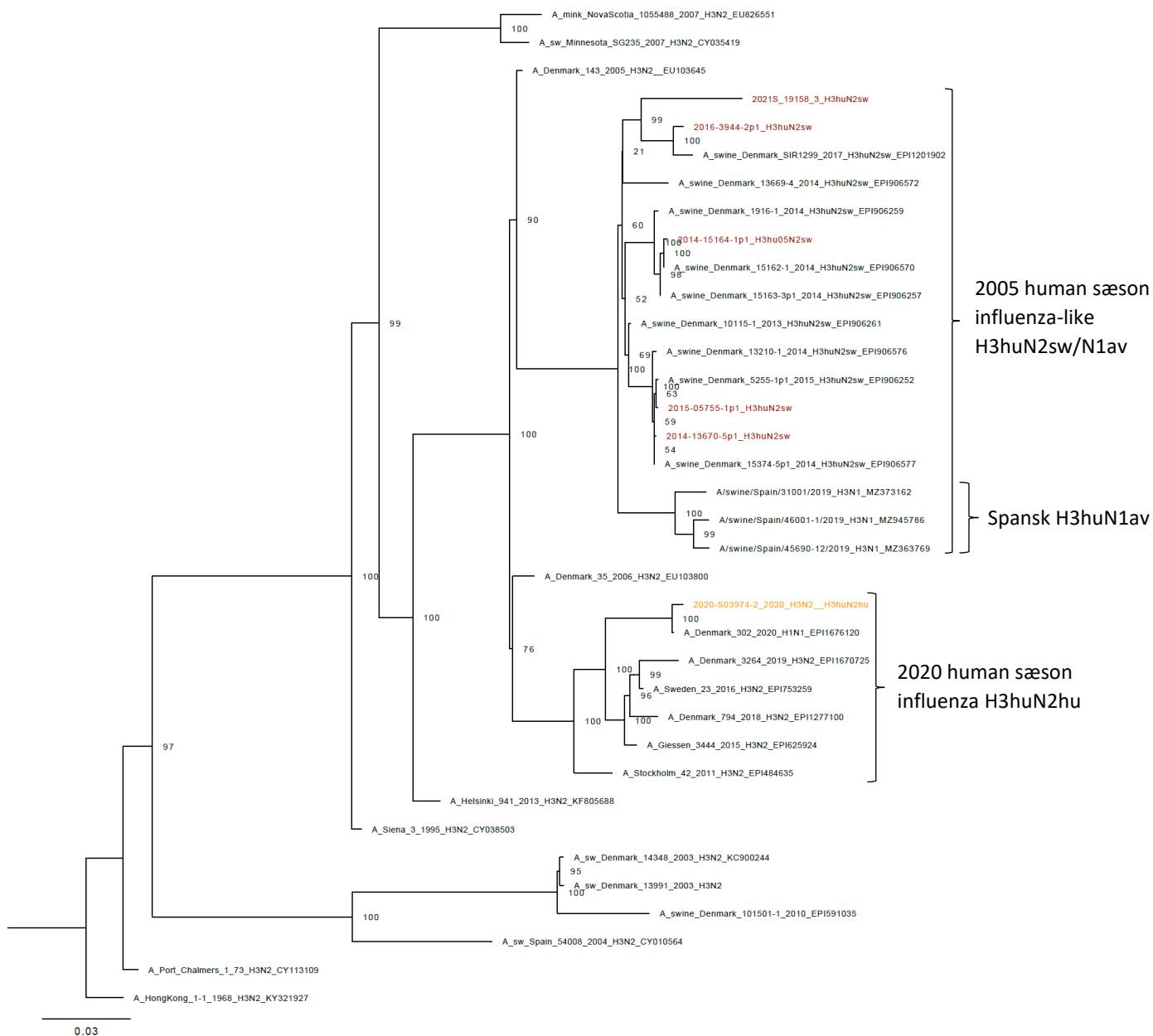
Bilag 1b: H1avNx virus fylogeni

Fylogenetisk træ af "avian-like" H1 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2021 baseret på MUSCLE alignment og Maximum likelihood fylogeni. Alle farvede sekvenser er prøver fra overvågningen, hvorimod sorte sekvenser er reference sekvenser fra tidligere danske prøver eller GenBank. Et **rødt**, **blåt** og **grønt** sekvensnavn indikerer at de interne gener er af henholdsvis **H1N1pdm09 oprindelse**, **"avian-like"** oprindelse eller en **blanding** af de to. Først i sekvensnavnet er årstallet for prøven angivet, mens subtypen for prøven angivet sidst i sekvens navnet. **"*"** angiver virus fra zoonotiske tilfælde.



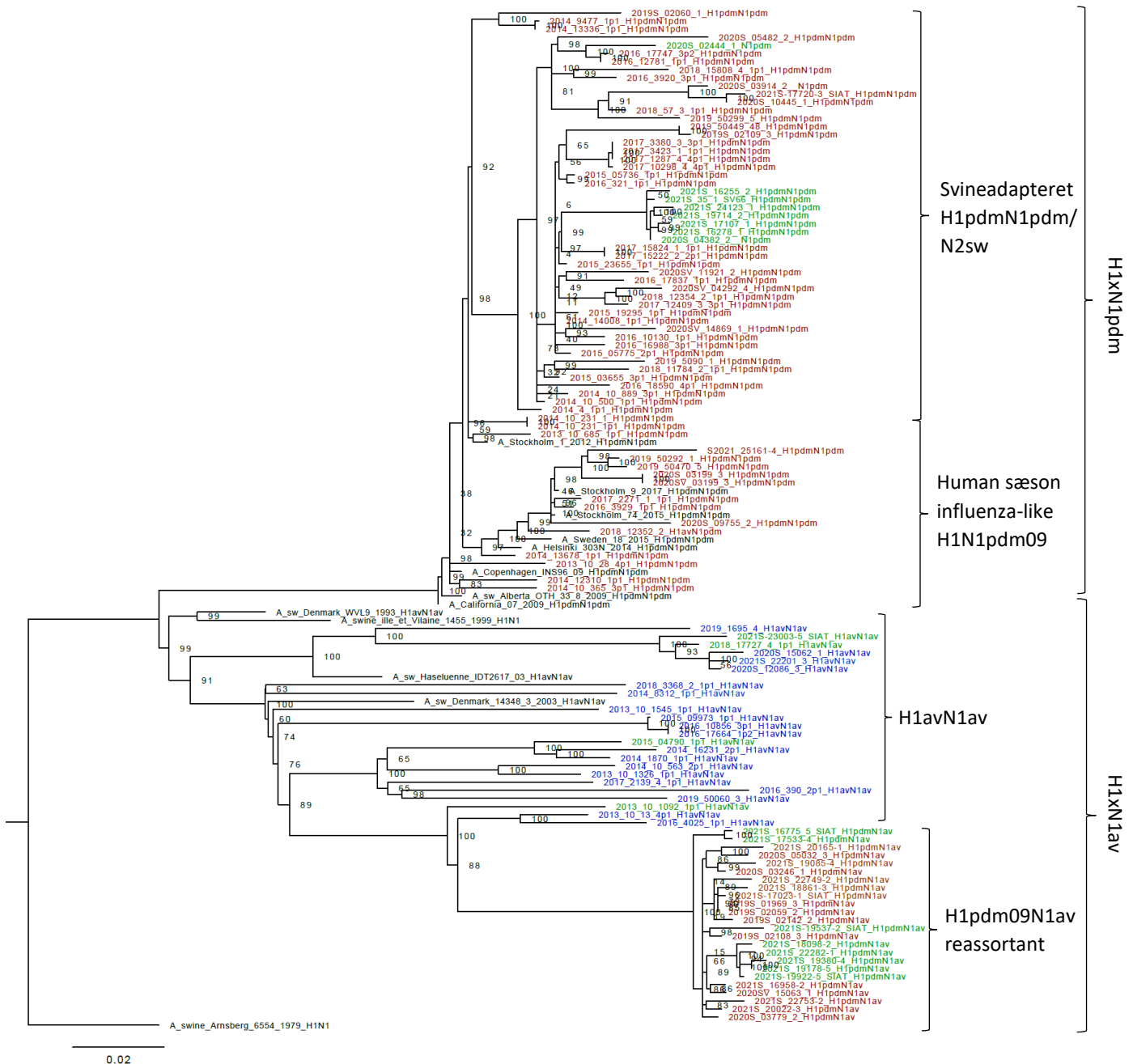
Bilag 1c: H3xN2x virus fylogeni

Fylogenetisk træ af H3 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2021 baseret på MUSCLE alignment og Maximum likelihood fylogeni. Alle farvede sekvenser er prøver fra overvågningen, hvorimod sorte sekvenser er reference sekvenser fra tidligere danske prøver eller GenBank. Et **rødt**, **blåt** og **grønt** sekvensnavn indikerer at de interne gener er af henholdsvis **H1N1pdm09 oprindelse**, **"avian-like"** oprindelse eller en **blanding** af de to. **Orange** angiver den fulde humane sæsoninfluenza, der blev overført til danske svin i 2020. Først i sekvensnavnet er årstallet for prøven angivet, mens subtypen for prøven angivet sidst i sekvens navnet.



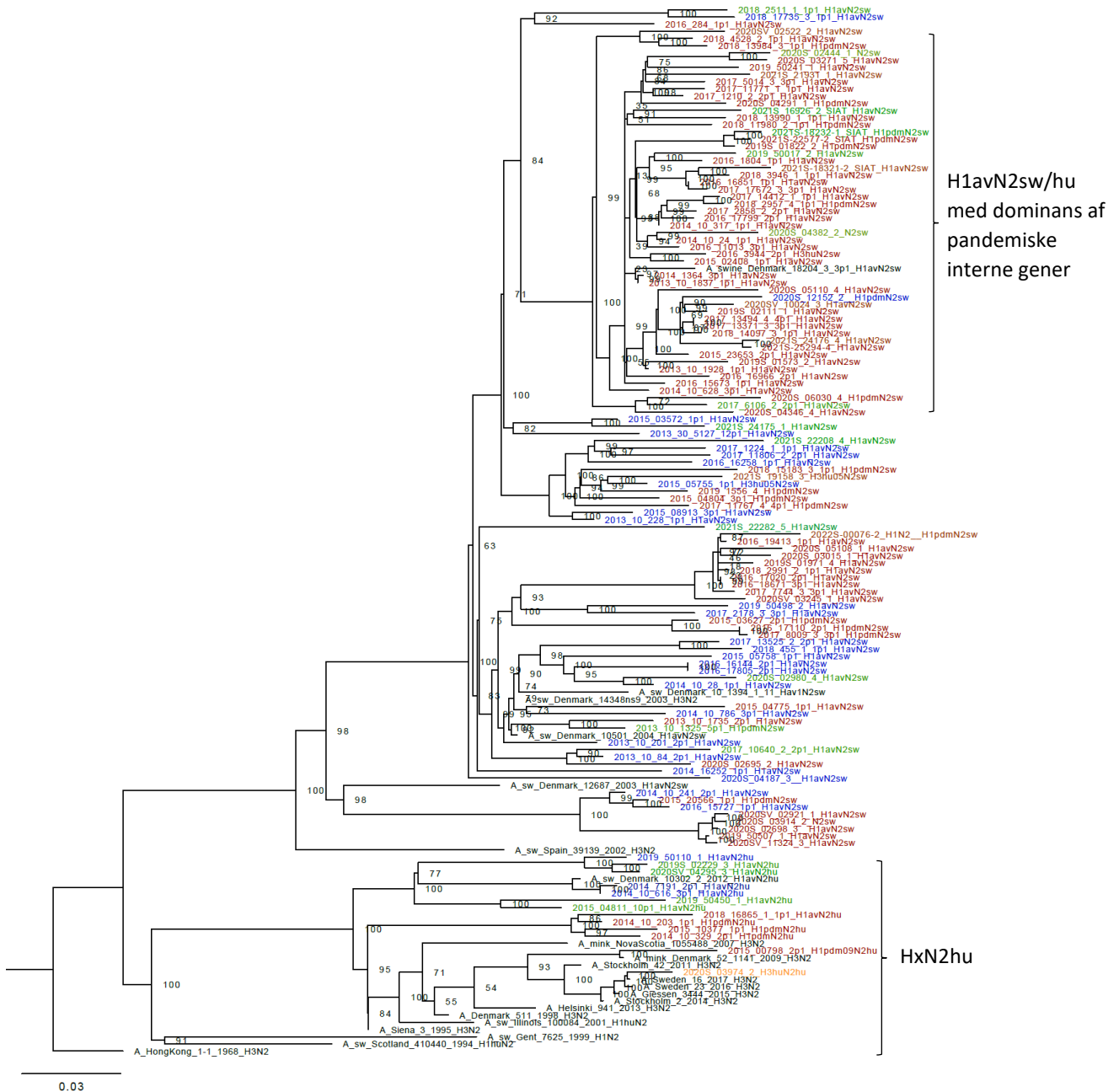
Bilag 2a. HxN1x virus fylogeni

Fylogenetisk træ af N1 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2021 baseret på MUSCLE alignment og Maximum likelihood fylogeni. Alle farvede sekvenser er prøver fra overvågningen, hvorimod sorte sekvenser er reference sekvenser fra tidligere danske prøver eller GenBank. Et **rødt**, **blåt** og **grønt** sekvensnavn indikerer at de interne gener er af henholdsvis **H1N1pdm09 oprindelse**, **"avian-like"** oprindelse eller en **blanding** af de to. Først i sekvensnavnet er årstallet for prøven angivet, mens subtypen for prøven angivet sidst i sekvens navnet.



Bilag 2b. HxN2x fylogeni

Fylogenetisk træ af N2sw og N2hu nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2021 baseret på MUSCLE alignment og Maximum likelihood fylogeni. Alle farvede sekvenser er prøver fra overvågningen, hvorimod sorte sekvenser er reference sekvenser fra tidligere danske prøver eller GenBank. Et **rødt**, **blåt** og **grønt** sekvensnavn indikerer at de interne gener er af henholdsvis **H1N1pdm09 oprindelse**, **"avian-like"** oprindelse eller en **blanding** af de to. Først i sekvensnavnet er årstallet for prøven angivet, mens subtypen for prøven angivet sidst i sekvens navnet.



Bilag 3. Fuld genom data

Skematisk præsentation af oprindelsen af alle otte segmenter fra de undersøgte prøver fra 2020 og 2021, fordelt på alle genotype varianterne der er fundet i Danmark siden 2012. Hvert gensegment er farvekodet i henhold til deres oprindelse.

	HA	NA	M	NP	NS	PA	PB1	PB2	n	n
									2020	2021
H1avN2sw										
Genotype 1									1	0
Genotype 2									1	0
Genotype 3									0	1
Genotype 4									12	4
Genotype 5									0	1
Genotype 6									0	1
Genotype 7									0	1
H1avN1av										
Genotype 1									2	1
Genotype 2									0	1
Genotype 3									0	0
Genotype 4									0	0
H1avN2hu95										
Genotype 1									0	0
Genotype 2									0	0
Genotype 3									1	0
Genotype 4									0	0
Genotype 5									0	0
H1N1pdm09										
Genotype 1									7	2
Genotype 2									0	6
H1pdm09N2sw										
Genotype 1									1	0
Genotype 2									0	0
Genotype 3									2	2
Genotype 4									0	1
H1pdm09N1av										
Genotype 1									4	8
Genotype 2									0	8
H1pdm09N2hu95										
Genotype 1									0	0
H3hu05N2sw										
Genotype 1									0	1
H3hu20N2hu20										
Genotype 1									1	0
H1avN1pdm09										
Genotype 1									0	0
Blandede infektioner										
									3	0
Farvekode:										
Svineinfluenza (H1N1, H1N2, H3N2) oprindelse			H1N1pdm09 oprindelse							
Nylige humane H3N2			Ikke sekventeret							