

Overvågning af influenza A virus i svin

Slutrapport 2020

Pia Ryt-Hansen

Nicole B. Goecke

Jesper Schak Krog

Charlotte Kristiane Hjulsager

Lars Erik Larsen

August 2021



DK-VET rapport - august 2021

Overvågning af influenza A virus i svin – slutrapport 2020

Udarbejdet af Pia Ryt-Hansen, Nicole B. Goecke, 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 2020

Projektperiode 01-01-2020 – 31-12-2020

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

Forord

Denne rapport beskriver resultaterne fra overvågningen af influenza A virus i danske svinebesætninger, der har fundet sted i 2020, 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 Laboratorium for Svinesygdomme, 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, spyt 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 et reassortment, 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" svine 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 oprindeligt fra Hong Kong influenzaen 1968, der adapterede til svin og i 1984 reassorterede og tog de interne gener fra "avian-like" svine H1avN1av. Dette virus blev påvist første gang i Danmark i 1990.
<u>H1avN2sw</u>	Navngives også "H1N2dk". Virus har det samme "avian-like" svine H1 og "avian-like" 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 oprindeligt 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>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>	Virus med det specifikke NA fra H1N1pdm09.
<u>H1av</u>	HA gen fra "avian-like" svine H1avN1av.
<u>N1av</u>	NA gen fra "avian-like" 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 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	12
Svineinfluenza A virus subtyper	12
Svineinfluenzavirus reassortments	15
Resistens og virulens markører.....	16
Samlet analyseoversigt	17
Fylogenetiske analyser.....	17
Diskussion.....	18
Cirkulerende influenza virus i Danmark.....	18
Veterinære aspekter	20
Zoonotiske aspekter.....	20
Konklusion	22
Bilag 1a. H1av fylogeni	23
Bilag 1b: H1pdm fylogeni.....	24
Bilag 1c: H3 fylogeni	25
Bilag 2a. N1 fylogeni	26
Bilag 2b. N2 fylogeni.....	27
Bilag 3. Fuld genom data	28

Kort sammendrag

Der er i 2020 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 2020 iværksat undersøgelse for influenza A virus på 2512 prøver fordelt på 723 indsendelser fra 517 besætninger registreret med forskelligt CHR nummer. I alt havde 400 (55 %) af indsendelserne fra 315 forskellige besætninger minimum en positiv prøve. Indsendelserne fordelte sig over hele landet og over hele året. Der var flest indsendelser til undersøgelse i vinterhalvåret, men andelen af positive prøver var relativt ensartet over hele året.

Alle influenzapositive prøver blev testet for HA-subtypen H1pdm09, og virus blev påvist i 115 indsendelser fra 91 besætninger registreret med forskelligt CHR nummer og udgjorde således 29 % af de influenza A virus positive indsendelser, hvilket er en højere procentdel end i 2019, hvor tallet lå på 20 %. I alt blev 216 influenzavirus positive indsendelser subtyperet for både HA og NA. Tilsammen viste disse analyser, at de oftest påviste subtyper i danske svin i 2020 var H1avN2sw, H1pdm09N1av og H1N1pdm09. I år er der således sket en markant stigning i antallet af prøver, der testede positive for H1pdm09N1av. Samtidig sås et yderligere fald i antallet af prøver, der testede positive for "avian-like" svine H1avN1av. I år blev der for første gang identificeret en hel human sæsoninfluenza virus i svin. Specielt for 2020 blev der også observeret en stigning af antallet af prøver, hvori der blev fundet flere influenzavirus i samme prøve.

Short summary

A systematic, prospective, passive monitoring of circulating influenza virus subtypes in Danish pigs was carried out in 2020. The overall purpose of the monitoring was to identify which influenza virus subtypes and genotypes that circulated among Danish pigs.

In 2020, a total of 2512 influenza A virus tests were performed on 723 submissions from 517 herds registered with different CHR no. In total, 400 (55 %) of the submissions from 315 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 the proportion of positive samples was relatively uniform throughout the year.

Virus with the HA subtype H1pdm09 was detected in 115 submissions from 91 herds registered with different CHR no. and thereby accounted for 29 % of the influenza A virus positive submissions, significantly higher than in the 20 % found in 2019. In total, 216 influenza A virus positive submissions were subtyped for both HA and NA. Together these analyzes showed that the most common subtypes in Danish pigs in 2020 were H1avN2sw, H1pdm09N1av and H1N1pdm09. Thereby a marked increase in the number of samples that tested positive for H1pdm09N1av was observed in 2020. Concurrently, a decrease in the number of samples that tested positive for the "avian-like" swine H1avN1av was seen. For the first time during the surveillance, a complete human seasonal influenza virus was identified in pigs. Moreover, unique for this year, an increase in the number of samples where more than one HA and/or NA gene were identified was observed.

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 (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 oftest 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, der 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.

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 påvist, at mere end 90 % af danske svinebesætninger har influenza antistofpositive svin. Fire subtyper af svineinfluenzavirus kan betragtes som enzootiske i danske svin; H1avN1av og H1avN2sw, som har cirkuleret de sidste hhv. 35 og 15 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, "H1pdmN1av", 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.

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 i form af antibiotika. Det er derfor vigtigt for besætninger og dyrlæger at vide, om de har influenza A virus cirkulerende, så de kan kortlægge sygdomsårsager og iværksætte optimale kontrolstrategier f.eks. i form af vaccination. Resultaterne fra overvågningen giver samtidigt et indblik i

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<http://www.efsa.europa.eu/en/scdocs/doc/1770.pdf> (Scientific Opinion on the pandemic (H1N1) 2009 influenza and its potential implications for animal health)

hvilke virus varianter der cirkulerer samt et overblik over den genetiske drift over tid. Tilsammen sikre disse resultater en sensitiv laboratoriediagnostik.

Fund af influenzavirus i svin er ikke anmeldningspligtige 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 foretages på materiale, der indsendes direkte til Statens Serum Institut, Center for Diagnostik DTU eller SEGES Laboratorium for Svinesygdomme, Kjellerup, i forbindelse med almindelig rutinediagnostik. Derudover må det antages at en vis mængde prøver analyseres på udenlandske laboratorier. Resultater af sidstnævnte er ikke tilgængelige for forfatterne af denne rapport.

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.

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

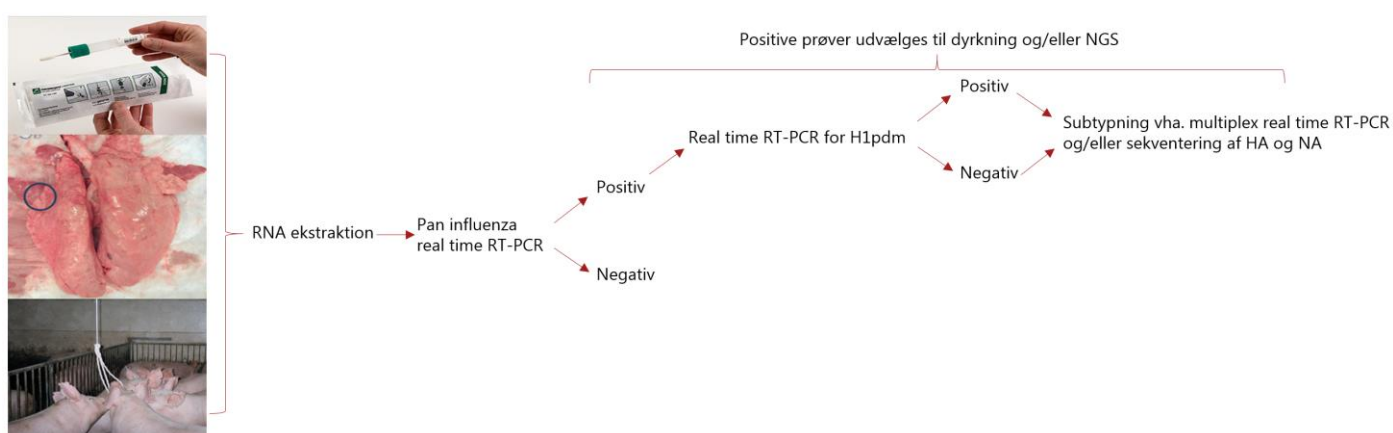
1. At opnå en bedre forståelse af den komplekse epidemiologi af Influenza A virus i svin under danske forhold.
2. At muliggøre en tidlig etablering af virus stocks til hurtig produktion af vacciner mod nye virus subtyper, der giver forøget sygdom i svin.
3. At sikre at de i landet anvendte diagnostiske 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 2020 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) eller SEGES Laboratorium for Svinesygdomme, 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.
4. Sekvensanalyse af HA og NA generne på prøver, der ikke gav et entydigt resultat jf. punkt 3.
5. Isolation af virus i MDCK- eller SIAT celler fra udvalgte prøver.
6. Next generation sequencing (NGS) af udvalgte virusisolater og af positive prøver direkte fra primær materiale. Dette blev udført på sekventeringsplatformen Illumina MiSeq (SSI). Herved opnås sekvensanalyse og karakterisering af både overfladegenerne HA og NA og de interne gener.

Materialer og metode

Den overordnede arbejdsgang er illustreret i Figur 1. Startmaterialet kan være næsesvaber, spytprøver, 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 influenza positive prøver analyseres med real time RT-PCR assay for H1pdm09. Udvalgte influenza A 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 svinepopulation. Hvis subtypning ikke kan udføres med multiplex RT-PCR analysen, sekventeres HA og NA segmenterne enten vha. Sanger sekventering eller ved NGS for på denne måde at kunne påvise eventuel introduktion af en ny variant af HA og/eller NA.



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

Udvælgelsen af prøver til NGS sker løbende blandt de positive prøver. Sekventeringen udføres på fuld længde PCR produkter fra alle otte segmenter. Den foregående PCR foregår enten på det oprensede RNA fra primær materiale (næsesvaber, sputum eller lunge) eller på RNA isoleret fra virus, som har været dyrket i MDCK eller SIAT celler. De resulterende PCR produkter oprenses og sekventeres med NGS på Illumina MiSeq sekventeringsplatformen. Rådata databehandles (CLC genomics workbench, QIAGEN) og consensus-sekvenser for hvert segment analyseres med fylogenetiske analyser på KU-IVH og SSI (CLC main workbench, QIAGEN og MrBayes).

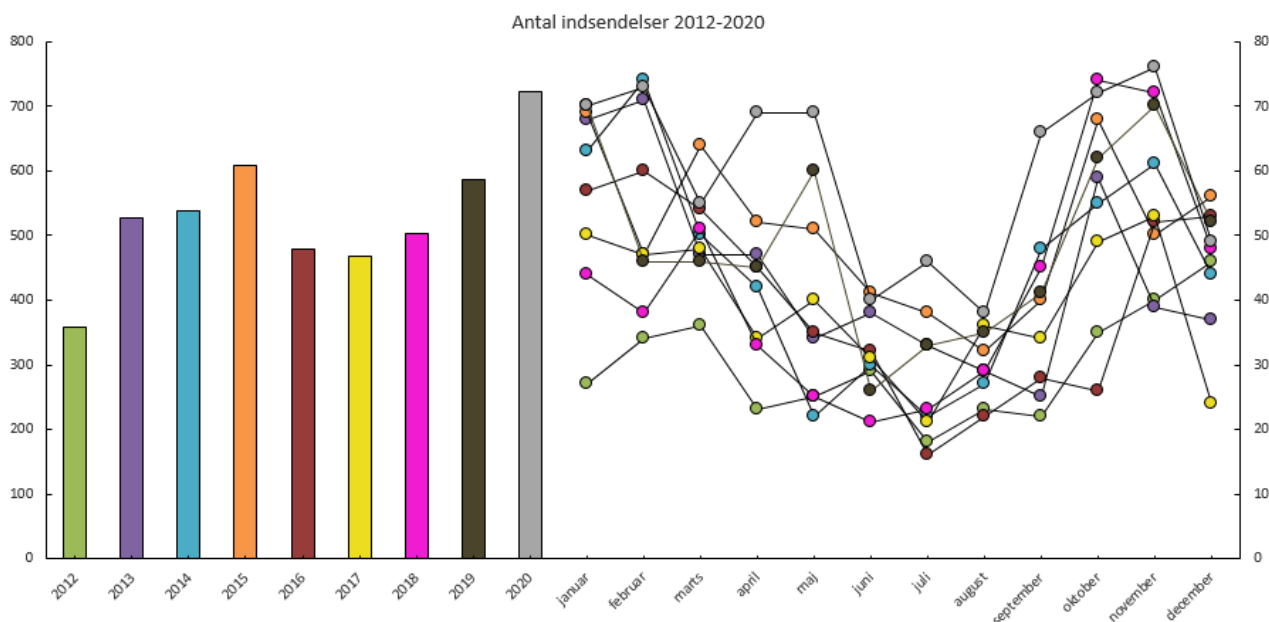
Resultater

Indsendelser

Alle indsendelser fra danske svinebesætninger til Center for Diagnostik DTU, Statens Serum Institut og SEGES Laboratorium for Svinesygdomme, Kjellerup med ønske om undersøgelse for influenzavirus blev testet og indgår i rapporten. Prøverne er udtaget fra svin med anamnesen respirationsvejslidelse.

Omkostningerne til influenzaviruspåvisning, der foretages med real time RT-PCR, er løbende faktureret de indsendende dyrlæger. Cirka 40 % af indsendelserne var sponsoreret af medicinalfirmaet CEVA. I 2020 blev der i gennemsnit indsendt 3,5 prøver per indsendelse, hvilket er sammenligneligt med sidste år, men markant højere end de tidligere år af overvågningen, hvor der i gennemsnit var 2,2 - 2,3 prøver per indsendelse.

I 2020 blev der totalt modtaget 2512 prøver fordelt på 723 indsendelser til undersøgelse for influenza A virus fra 517 danske svinebesætninger fordelt over hele landet (Figur 2 og Bilag 4a). I alt, 136 besætninger indsendte prøver mere end én gang i løbet af året.

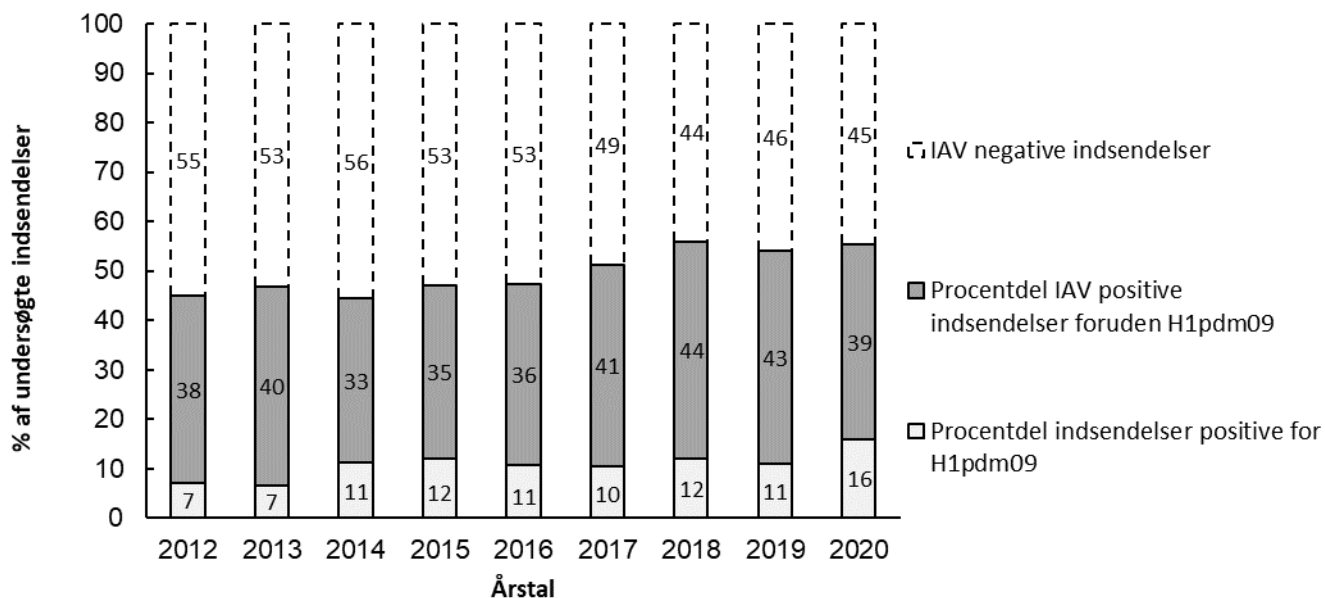


Figur 2. Fordelingen af antallet af indsendelser til diagnostik af influenza A virus i svin fra 2012 til 2020 fordelt på år (søjler til venstre) og måned (graf til højre) med tilsvarende farve.

Antallet af indsendelser i 2020 er igen steget i forhold til de foregående år, og ligger i 2020, 19 % højere end i 2019. Den generelle tendens i det månedlige antal indsendelser ligner de tidligere år, hvor der generelt modtages flere indsendelser i efterårs- og vintermånederne. Andelen af positive indsendelser (34,7-66,7 %) er derimod forholdsvis jævn fordelt over året. Anderledes for i år er der registreret et fald i antal af indsendelser i marts, som efterfølges af en markant stigning i april og maj. Dette er modsat tidligere år, hvor der generelt er sket et fald i antallet af indsendelser fra marts. Dog blev der også sidste år registreret en stigning i antal indsendelser i maj. For månederne juni-december er der stor lighed til de forrige år. Det er ikke lykket at identificere årsagen til stigningen af antal indsendelser i april måned, men bemærkelsesværdig så er april den måned, hvor den højeste andel af positive indsendelser er fundet (66,7 %) – dog tæt efterfulgt af februar (65,8 %).

Indsendelser med påvist influenza A virus

Prøver til undersøgelse for influenza A virus blev først testet med et pan-influenza A real time RT-PCR assay, som kan genkende alle kendte varianter af influenza A virus. I 2020 var i alt 400 indsendelser positive for influenza A virus i minimum én prøve, hvilket svarer til 55 % af de 723 undersøgte indsendelser (Figur 3). Dette er meget lig 2019, hvor tallet lå på 54 %. Det totale antal indsendelser fordelte sig på 517 forskellige besætninger registreret med forskellige CHR numre, hvoraf 315 fik påvist influenza A virus.



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 2020.

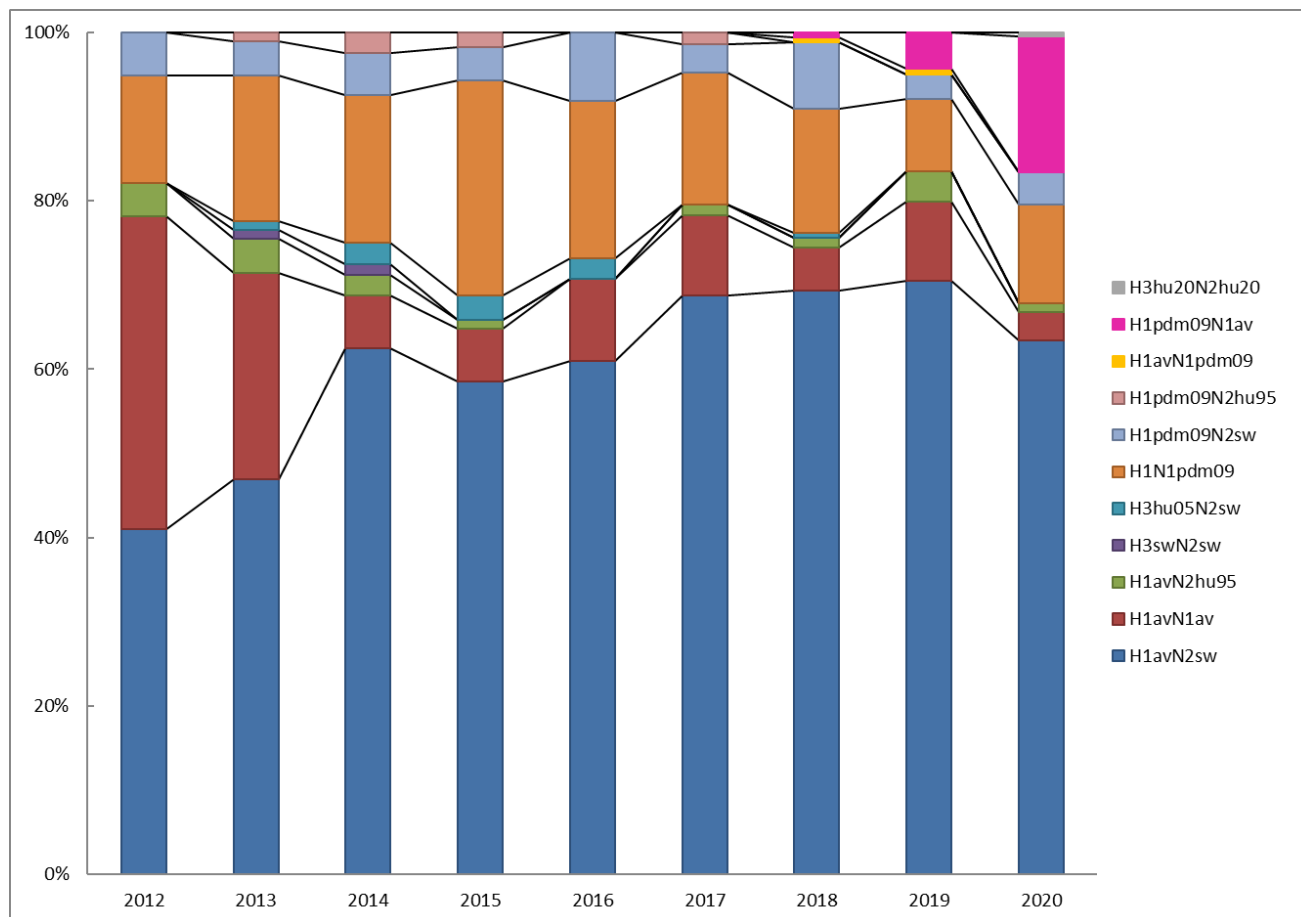
Alle prøver (bortset fra fire prøver fra DTU) fundet positive for influenza A virus blev undersøgt for H1pdm09 med et real time RT-PCR assay, der er specifik for HA-genet i H1N1pdm09 svineinfluenzaen fra 2009. I 2020 blev 946 influenza A positive prøver fra 312 besætninger (397 indsendelser) undersøgt for H1pdm09, hvoraf 115 (29 %) af indsendelserne var positive, repræsenterende 91 forskellige besætninger. Derved har andelen af H1pdm09 positive indsendelser taget et spring sammenlignet de sidste seks år, hvor andelen af H1pdm09 positive indsendelser har varieret mellem 19-24 %. 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 reassortments, hvor H1pdm09 indgår, samt indsendelser hvor flere subtyper blev konstateret.

Svineinfluenza A virus subtyper

I 2020 var 400 indsendelser positive for influenza A virus og af disse blev subtypen bestemt for 216 forskellige indsendelser svarende til 54 % af de positive indsendelser, hvilket er markant højere end sidste år, hvor kun 44 % de positive indsendelser fik bestemt subtypen.

Den procentvise fordeling af subtyper for de 216 subtypede indsendelser fremgår af Figur 4 for årene 2012-2020. 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 i multiplex real time RT-PCR, udvalgt flere prøver fra samme indsendelse til videre subtypning. I årets overvågning fandt vi 11

indsendelser, hvor der blev påvist flere forskellige HA og/eller NA gensegmenter i den samme prøve. I alt var der tale om dobbelt infektioner med H1av kombineret med både N1av og N2sw (n=2), H1av, H1pdm kombineret med N1pdm og N2sw (n=4), H1pdm kombineret med N1pdm og N2sw (n=1), H1av kombineret med N1pdm og N2sw (n=3), H1av og H1pdm kombineret med N1av og N2sw (n=1). Disse 11 prøver er ikke inkluderet i Figur 3, da man ikke kan fastslå hvordan de forskellige HA og NA gensegmenter var kombineret i viruspartiklen.



Figur 4. Fordeling af subtyper i procent ud af de subtypede influenza A virus positive indsendelser for årene 2012-2020.

Fordelingen af subtyper i 2020 skiller sig ud ved, at en hel human sæsoninfluenza virus af H3hu20N2hu20 subtypen er blevet påvist for første gang i danske svin, og ved at der er set en markant stigning i den nyere subtype H1pdm09N1av, som blev påvist for første gang i 2018. I 2020 udgjorde H1pdm09N1av en større andel end H1N1pdm09, og stigningen skyldes ikke flere indsendelser fra samme besætning. Subtypen H3hu20N2hu20 blev påvist i én besætning i starten af året, men blev ikke fundet i andre besætninger. Andelen af H1N1pdm09 og H1pdm09N2sw er steget i forhold til niveauet i 2019. Derudover er der set et fald i andelen af "avian-like" svine H1avN1av, som nu er på det laveste niveau nogensinde i overvågningen. Det er igen H1avN2sw, der er mest dominerende i Danmark, men den stigende tendens der er observeret siden 2015 er i år blevet brudt, da der er sket et fald i andelen af denne subtype. Et fald er også observeret i andelen af H1avN2hu95 i forhold til 2019. Den nyere subtype H1avN1pdm, der blev påvist for første gang i 2018, er ikke fundet i 2020.

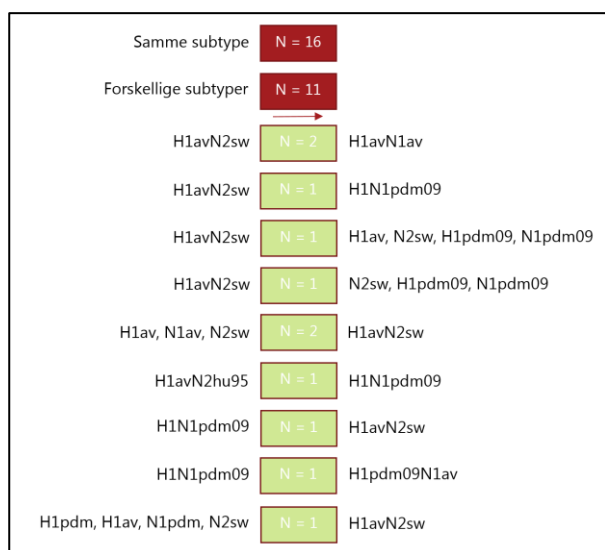
Den europæiske variant af H1huN2sw, der opstod i England i 90'erne, er fortsat ikke påvist i danske svin og det samme gør sig gældende for svine H3swN2sw, som nu ikke har været påvist siden 2014.

En detaljeret fordeling af subtyper kan ses i Tabel 1, hvor antal samt den procentvise fordeling er vist for hver subtype. Denne tabel indeholder også de 11 indsendelser, hvori der blev fundet flere HA og/eller NA gensegmenter i den samme prøve. Den geografiske fordeling af alle subtyper påvist på forskellige CHR-numre fremgår af Bilag 4c.

Tabel 1. Antal indsendelser hvor subtypen af influenza A virus blev bestemt fra årene 2015-2020. 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 subtypede indsendelser.

Subtype	Antal						Kommentar
	2020 n (%)	2019 n (%)	2018 n (%)	2017 n (%)	2016 n (%)	2015 n (%)	
H1avN1av	7 (3,2)	13 (9,4)	9 (5,1)	14 (9,5)	12 (9,8)	11 (6,3)	"Normal" europæisk svineinfluenza A virus subtype "avian-like swine" som har cirkuleret i DK siden 1981.
H1avN2sw	127 (60,2)	98 (70,5)	122 (69,3)	101 (68,7)	75 (61,0)	103 (58,5)	Dansk svineinfluenza A virus subtype fundet første gang i 2003.
H1avN2hu95	2 (0,9)	5 (3,6)	2 (1,1)	2 (1,4)	0 (0)	2 (1,1)	"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	0 (0)	0 (0)	1 (0,6)	0 (0)	3 (2,4)	5 (2,8)	Ny reassortment med humant H3, der cirkulerede i mennesker i DK 2005, sammen med dansk svine N2.
H3hu20N2hu20	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	Human sæson variant. Fundet første gang i danske svin i 2020.
H1N1pdm09	24 (11,1)	12 (8,6)	26 (14,8)	23 (15,6)	23 (18,7)	45 (25,6)	Pandemisk svineinfluenza A virus subtype. Fundet første gang i danske svin januar 2010.
H1pdm09N2sw	8 (3,7)	4 (2,9)	14 (8,0)	5 (3,4)	10 (8,1)	7 (4,0)	Pandemisk H1 sammen med dansk svine N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1pdm09N2hu95	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,4)	0 (0)	3 (1,7)	Pandemisk H1 sammen med human N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1avN1pdm09	0 (0)	1 (0,7)	1 (0,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	Dansk avian-like swine H1 sammen med pandemisk N1.
H1pdm09N1av	33 (15,3)	6 (4,3)	1 (0,6)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	Pandemisk H1 sammen med N1 fra dansk "avian-like swine" H1N1.
H1av N1av, N2sw	2 (0,9)	-	-	-	-	-	"Normal" europæisk svine H1 sammen med N1 fra dansk "avian-like swine" H1N1 og dansk svine N2.
H1av N1pdm09, N2sw	3 (1,4)	-	-	-	-	-	"Normal" europæisk svine H1 sammen med pandemisk N1 og dansk svine N2.
H1pdm09 N1pdm09, N2sw	1 (0,5)	-	-	-	-	-	Pandemisk H1 sammen med pandemisk N1 og dansk svine N2.
H1av, H1pdm09 N1pdm09, N2sw	4 (1,9)	-	-	-	-	-	"Normal" europæisk svine H1 og pandemisk H1 sammen med pandemisk N1 og dansk svine N2.
H1av, H1pdm09 N1av, N2sw	1 (0,5)	-	-	-	-	-	"Normal" europæisk svine H1 og pandemisk H1 sammen med N1 fra dansk "avian-like swine" H1N1 og dansk svine N2.

I 2020 blev der indsendt prøver fra 517 besætninger med forskellige CHR numre. Fra 136 af disse besætninger modtog vi prøver mere end én gang i løbet af 2020, hvoraf 104 blev fundet positive for influenza mere end én gang. Af de 136 besætninger sendte 103 af besætningerne prøver ind to gange, 23 af besætningerne sendte prøver ind tre gange, fem af besætningerne sendte prøver ind fire gange, to af besætningerne sendte prøver ind fem gange, én besætning sendte prøver ind seks gange, mens to besætninger sendte prøver ind henholdsvis otte og ni gange i løbet af 2020. For 27 af de 136 besætninger er der blevet subtypet prøver fra mere end én af indsendelserne. Denne subtypning viste at 16 af besætningerne fik påvist den samme subtype i de forskellige indsendelser, mens der i 11 af besætningerne blev fundet forskellige subtyper i de forskellige indsendelser. Dette er illustreret i Figur 5, hvor skiftet af subtype også er tydeliggjort.

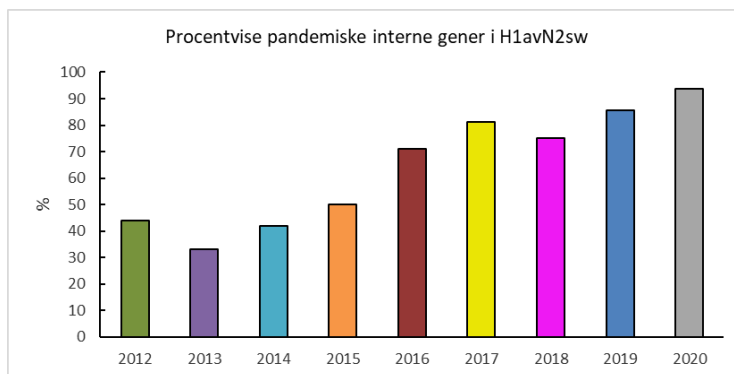


Figur 5. Oversigt over besætninger, som har fået subtypet indsendelser af flere omgange, og ændring i subtype fra den første indsendelse til den næste. "N" angiver antallet af indsendelser.

Svineinfluenzavirus reassortments

For at undersøge hvilke svineinfluenzavirus varianter, der i dag cirkulerer i de danske svin, blev alle gensegmenter fra udvalgte influenza A virus isolater (n=11) og primære prøver (n=24) fra 2020 fuld genom sekventeret vha. NGS. Oprindelsen af de enkelte gener for de undersøgte svineinfluenzavirus blev identificeret ved sammenligning med gensekvenser i tilgængelige databaser og fremgår af Bilag 3. Nedenstående opsummeres resultater 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 14 af de fuld genom sekventerede prøver. En af disse havde "avian-like" interne gener nært beslægtet med de interne gener, som findes i de enzootiske svineinfluenza virus (H1avN1av, H1avN2sw, H3swN2sw). Derudover havde et virus enten et "avian-like" M segment, mens resten af de interne gener var beslægtet med H1pdm09 virus gener. For de resterende 12 virus, var alle interne gener af H1N1pdm09 virus oprindelse. I 2020 blev der dermed observeret et yderligere stigning i andelen af H1avN2sw virus med interne pandemiske, som nu er helt oppe på 94 % af de H1avN2sw virus der er karakteriseret (Figur 6).



Figur 6. Andelen af fuld genom sekventerede isolater/prøver med interne gener af H1pdm09 virus oprindelse i procent af det totale antal H1avN2sw virus fra 2012-2020.

H1avN1av "avian-like" svine. To virus af denne subtype blev i år fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse, og begge havde udelukkende "avian-like" interne gener.

H1N1pdm09. Syv H1N1pdm09 virus blev i år fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse, og de havde alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse.

H1avN2hu95. Et virus af denne subtype blev fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse i 2020, og havde et M og NS gen af H1N1pdm09 oprindelse, men de resterende gener var af "avian-like" oprindelse.

H1pdm09N2hu95. Dette virus blev, ligesom de forgående år, ikke påvist i overvågningen 2020.

H1pdm09N2sw. Tre virus af denne subtype blev i år fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse. To af dem havde udelukkende interne gener af H1N1pdm09 oprindelse, mens den tredje prøve havde udelukkende "avian-like" interne gener. En H1pdm09N2sw virus med udelukkende "avian-like" interne gener er ikke blevet observeret i overvågningen før. Der skal i de kommende år holdes øje med om dette er et enestående tilfælde eller om det er en ny tendens.

H1pdm09N1av. Fire virus af denne subtype blev i år fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse, og de havde alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse.

H3hu20N2hu20. En virus af denne subtype blev fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse, og denne havde interne gener fra den humane sæsoninfluenza i 2020.

Flere HA og NA gensegmenter. Tre af de 11 prøver, som indeholdte flere HA og/eller NA gensegmenter blev fuld genom karakteriseret ved sekvensanalyse. Sekventeringen af disse bekræftede at prøverne indeholdt flere subtyper, da HA og NA gener fra både H1N1pdm09 subtypen og H1avN2sw subtypen blev fundet. De interne gener var alle af H1N1pdm09 oprindelse, med undtagelse af NS genet, som i to af prøverne var af aviær 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 2020, 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 blev fundet i den humane H3Hu20N2Hu20 sæsoninfluenza, som blev fundet i én svinebesætning i år. Denne mutation var også prævalent i H3Hu20N2Hu20 sekvenser fra den influenza overvågningen 2020 i mennesker.

Samlet analyseoversigt

Tabel 3 viser aktiviteter gennemført i overvågningen af influenza A virus i svin for 2020. Til sammenligning er resultaterne for 2015-2019 angivet. Antallet af indsendelser og prøver i 2020 er steget i forhold til de forgående år.

Tabel 3. Samlet oversigt over analyser udført i svineinfluenza overvågningen i 2015-2020.

Parameter	2020	2019	2018	2017	2016	2015
Antal indsendelser undersøgt for influenza A virus ^a	723	586	503	469	480	608
Antal prøver Undersøgt for influenza A virus	2512	1906	1469	1090	1115	1359
Antal indsendelser med min. 1 influenza A virus positiv prøve	400	318	282	240	227	286
Antal influenza A virus positive prøver i alt	950	751	641	446	411	511
Antal prøver testet for H1N1pdm09	946	751	641	446	411	511
Antal H1pdm09 positive indsendelser ^b	115	66	62	49	52	75
Antal H1pdm09 positive besætninger	91	60	57	43	48	66
Indsendelser subtyper på både HA og NA	216	139	176	147	109	176
Resistens undersøgelser ^c	26	25	20	27	29	20
Partiel karakterisering alle segmenter	0	0	0	4	0	
Fuld længde sekventering	26	25	20	23	29	20

^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

Da der i år er blevet publiceret et studie omhandlende den danske svineinfluenza overvågning⁴, som viste grupperinger i de forskellige stammer af influenza virus, er der i år er der blevet lavet fylogenetiske analyser på HA genet af H1pdm09, H1av og H3 separat (Bilag 1a-1c). I årets analyse genfindes det svinespecifikke H1pdm09 cluster, som også er beskrevet i det overstående studie. Sekvenserne i dette cluster stammer fra H1pdmNx virus, som kun er isoleret fra svin, hvorimod at sekvenserne udenfor clusteret grupperer sig

⁴ Co-circulation of multiple influenza A reassortants in swine harboring genes from seasonal human and swine influenza viruses by Pia Ryt-Hansen, Jesper Schak Krog, Solvej Østergaard Breum, Charlotte Kristiane Højlsager, Anders Gorm Pedersen, Ramona Trebbien and Lars Erik Larsen, 2021 (<https://elifesciences.org/articles/60940>)

sammen med H1N1pdm09 sekvenser fra den humane influenza overvågning. Dette tyder på at der stadig sker et spillover af human sæson H1N1pdm09 influenza i danske svinebesætninger, men også at der er opstået et cluster af H1pdm09Nx virus, som formentligt er bedre tilpasset svin, og cirkulere uafhængigt af den humane sæsoninfluenza. I år indgår 53 % af H1pdm09 sekvenserne opnået ved fuldgenom sekventeringen i det svine specifikke cluster. I det samme fylogenetiske træ (Bilag 1b), ses det at alle H1pdm09N1av sekvenserne grupperer sig samlet i et nyt cluster, sammen med en enkelt H1pdm09N2sw virus fra 2020.

I det fylogenetiske træ (Bilag 1a) over H1avNx virus er der i år inkluderet den omtalte G4 subtype, som er en ny svineinfluenza opstået via reassortments i Kina. I studiet der beskriver fundet af denne subtype, er der også set serologiske beviser for smitte til mennesker⁵, og der har derfor været debat om denne virus mulige pandemiske potentiale. I den fylogenetiske analyse, ses det at de danske H1av ligger forholdsvis langt væk fra H1av sekvensen fra G4 subtype, og at H1av sekvensen maximalt er 91,4 % identisk med de danske H1av sekvenser. I samme træ ses det også at der er adskillige clustre, og en stor genetisk variation blandt de danske H1av sekvenser. Tilmed ses et stort cluster, som hovedsageligt består af H1avNx virus, som har interne gener af H1N1pdm09 oprindelse, hvilket kan tyde på at de interne gener kan spille en rolle i forhold til virus evolution.

Det fylogenetiske træ (Bilag 1c) over H3Nx sekvenser, dokumenterer at det H3hu20N2hu20 virus som smittede en svinebesætning i år, er næsten identisk med sekvenser fra den humane sæsoninfluenza fra 2020, hvilket stærkt antyder at fundet af H3hu20N2hu20 i svinebesætningen er et resultat af et reverse-zoonose event, hvor influenza smittede mennesker har introduceret H3hu20N2hu20 i besætningen.

Diskussion

Cirkulerende influenza virus i Danmark

Forekomsten af influenza A virus i svin i Danmark er undersøgt systematisk over en periode på 10 år, hvorved der er opnået en dynamisk indsigt i hvilke influenzavirus, der cirkulerer blandt danske svin. Overordnet set har forekomsten af de forskellige subtyper været relativt stabil med dominans af de enzootiske virus, men introduktionen af H1N1pdm09 har medført dannelsen af en række nye virus med kombinationer af gener fra dette virus og de enzootiske svineinfluenzavirus, H1avN1av og H1avN2sw. Fund af virus i svin med gener fra de humane sæson influenza virus viser at der med jævne mellemrum sker smitte fra mennesker til svin svineproduktion, som efterfølgende medfører dannelse af nye reassortments. Specielt introduktion af humane sæson virus af typen H3N2 er bekymrende da der på nuværende tidspunkt er lav immunitet imod denne type i besætningerne, og da der ikke er nogen vaccine tilgængelig med god krydsbeskyttelse. Heldigvis er disse H3hu virus ikke blevet udbredt endnu. Igennem overvågningen er der blevet påvist seks nye reassortments (H1pdmN2sw, H3huN2sw, H1pdm09N1av, H1avN1pdm09, H1pdm09N2sw og H1pdm09N2hu). Samtlige af disse reassortments indeholder gener fra H1N1pdm09, som er kendt for at have zoonotiske egenskaber. Der bør derfor holdes øje med disse virus varianter og deres zoonotiske potentiale bør undersøges i dybden.

⁵ Prevalent Eurasian avian-like H1N1 swine influenza virus with 2009 pandemic viral genes facilitating human infection. PNAS, July 21, 2020. (<https://doi.org/10.1073/pnas.1921186117>).

H1avN2sw har siden overvågningens start været den mest påviste subtype, men for første gang er der i år sket et fald i andelen af denne subtype, hvilket understreger at de nyere reassortments vinder indpas. Som i de tidligere år, er der dog stadig sket en stigning i andelen af H1avN2sw virus, der indeholder interne gener af H1N1pdm09 oprindelse. Sammenholdt med stigningen af reassortments 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.

Reassortments med H1N1pdm09 gener er påvist i adskillige andre lande i Europa, Asien og Nordamerika, hvilket viser, at introduktionen af dette virus har medført en 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 i år ikke var blevet observeret et virus med overflade gener af H1N1pdm09 oprindelse, som udelukkende havde "avian-like" interne gener. Dog er der i 2020 blevet fundet en H1pdmN2sw med udelukkende interne gener af aviær oprindelse. Om dette er en ny tendens skal der holdes øje med i de kommende år. Der er global bevågenhed omkring svineinfluenzavirus med interne gener fra H1N1pdm09, da der i flere tilfælde er vist smitte med sådanne virus til mennesker, f.eks. H3N2v i USA.

Der er i år blevet påvist prøver indeholdende 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. Derfor fremgår disse resultater separat i årets overvågning. Fundet af flere HA og NA gener i én prøve i årets overvågning, 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 reassortments. Opgørelsen over subtypningen fra besætninger der har indsendt prøver flere gange i løbet af året, viser at en stor andel af disse besætninger har introduceret nye subtyper, eller at flere subtyper cirkulerer i besætningen samtidig, og understreger derved overstående problematik.

Danmark skiller sig stadig ud fra de andre europæiske lande ved ikke at have H1huN2sw, men derimod have en høj forekomst af H1avN2sw. Det er dog observeret at H1avN2sw, er ved at blive udbredt i Europa, formentligt har Danmarks store eksport af levende svin til andre EU lande bidraget væsentligt hertil. Sideløbende med en høj prævalens af H1avN2sw og en stigende prævalens af de nyere reassortants, er der sket et yderligere fald i H1avN1av. H3huN2sw, som blevet påvist i et lavt niveau tidligere år, er nu ikke set de seneste to år. Dog vil det tidligere lave niveau af denne subtype, også kræve at der skal screenes for denne subtype i en større andel af de danske besætninger for at sandsynliggøre fundet af denne virus. Som nævnt de tidligere år, skal vi 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 da serologiske undersøgelser har vist en meget begrænset krydsreaktion mellem dette H3huN2sw virus, og det H3swN2sw virus, der er inkluderet i den kommercielle vaccine tilgængelig i Danmark. For det tredje kan dette virus have en øget zoonotisk potentiale, da både HA genet og de interne gener har human oprindelse, og derved må siges at have haft evnen til at inficere mennesker.

Veterinære aspekter

I 2020 er der igen sket en markant stigning (19 %) i antallet af indsendelser til overvågningsprogrammet i forhold til 2019. 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 (55 %) 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 med kliniske respirationsvejssymptomer, 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 ekstremt vigtigt i forhold til vaccinevalg. I år er der tilmed fundet et komplet humant virus i svin for første gang, hvilket understreger vigtigheden af overvågningen. Et fuldt humant virus kan give anledning til alvorlige sygdomsudbrud, da immuniteten i danske svin er lav, og de nuværende tilgængelige veterinære influenza vacciner beskyttet ikke mod denne type. 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.

Zoonotiske aspekter

For første gang i overvågningen, er der i år påvist en komplet human sæsoninfluenza virus af subtypen H3hu20N2hu20 i danske svin. Dette virus blev fundet i foråret i en besætning, men er efterfølgende ikke blevet påvist i andre besætninger eller i den pågældende besætning. Ud over overfladegenerne HA og NA, viste fuld genom karakteriseringen at de interne gener også var af human oprindelse. Samtidig afslørede den fylogenetiske analyse, at dette virus var næsten identisk med H3hu20N2hu20 virus fra samme års sæsoninfluenza hos mennesker. Tilsammen var der altså flere beviser for at udbruddet i svinene var forårsaget af en reverse-zoonotisk begivenhed, hvor smittede mennesker, havde bragt en sæsoninfluenza ind i en besætning.

Fund af et "helt" humant influenza virus i svin er bekymrende af flere årsager. Hvis dette virus spreder sig og bliver udbredt i svinebesætninger vil det udgøre et permanent reservoir for infektion af mennesker. Endvidere blev der, i PB2 genet, påvist mutationen E627K, som er forbundet med høj virulens hos mennesker. Dette pointerer den store risiko, der er ved at få introduceret human sæsoninfluenza ind i vores svinebesætninger, da vi gennem ressourcements kan få indført disse mutationer i de svine specifikke virus. Der bør derfor være forbud mod syge personer i besætningen og krav om årlig influenza vaccination til personalet.

Et af de nyere reassortments, H1pdm09N1av, som første gang blev dokumenteret i 2018, er i 2020 fundet i flere indsendelser end den oprindelige H1N1pdm09, hvilket gør den til den anden mest påviste subtype. Denne subtype indeholder syv ud af otte gener fra H1N1pdm09, som vi ved tidligere har haft evnen til at indgå i virus, der kan smitte til og mellem mennesker. HA genet fra denne virus grupper sig samlet i en ny gruppe af H1pdm09Nx virus i det fylogenetiske træ, og skiller sig derved ud fra de ældre H1pdmNx sekvenser. Den markante fremgang af H1pdmN1av og dens unikke genkonstellation understreger vigtigheden af at holde øje med udbredelsen af denne virus og dens zoonotiske potentiale. Virus af denne type bør udvælges til yderligere test, for at vurdere dens evne til at smitte mennesker.

Andre virus, der potentielt kan udgøre en zoonotisk trussel, er de H1pdmNx virus, der grupper sig i det såkaldte svinespecifikke cluster i det fylogenetiske træ. Disse virus adskiller sig både genetisk og antigenet markant fra de humane H1N1pdm09 cirkulerende virus. Et nyligt publiceret studie med fokus på de genetiske sekvenser opnået gennem den danske svineinfluenza overvågning⁴, har dokumenteret at ændringerne mellem H1pdm09Nx sekvenserne i det svinespecifikke cluster, og de resterende H1pdmNx sekvenser, netop hovedsageligt er lokaliseret i de steder i HA proteinet, som er vigtig for antistof-binding. Endvidere har vi preliminaire data der viser, at der er begrænset krydsreaktion mellem virus fra disse clusters. Lignende svinespecifikke clustre er også dokumenteret i andre lande som f.eks. Frankrig⁶. I januar 2021 blev der for første gang påvist infektion af en dansk patient med et svineinfluenza virus, og dette virus tilhører netop gruppen af svineadapterede virus. Eksperimentelle infektioner udført i projektet FluZooMark har vist at de svineadapterede stammer kan inficere både fætter og grise, men aerosol smitten mellem fætterne var begrænset. Samlet set peger disse data mod at de svineadapterede H1pdm09Nx virus kan smitte mennesker, men med begrænset udskillelse og transmission (ikke publiceret).

Også i udlandet er der forekommet zoonotiske infektioner af mennesker. I Holland og Italien er der observeret human smitte med en "avian-like" H1avN1av med oprindelse i svin. Den hollandske patient fik en alvorlig respiratorisk infektion men kom sig, hvorimod den italienske patient udviklede akut lungesvigt, og blev behandlet med oseltamivir. Disse virus er nært beslægtet med de "avian-like" H1avN1av, vi ser hos svin i Danmark, og man må derfor formode, at lignende introduktioner kan ske her. I 2020 blev der publiceret et kinesisk studie, der viste at folk der arbejdede i svineproduktionen havde en øget prævalens af antistoffer mod en ny svineinfluenza virus kaldet G4, sammenlignet med den generelle befolkning⁵. Resultaterne af dette studie indikerede derved at der kunne ske smitte fra svin til mennesker med denne G4 influenza virus, og lig de overnævnte studier havde dette virus og et HA gen af aviær oprindelse. I årets fylogenetiske analyse har vi derfor inkluderet HA genet fra G4, og resultatet viser at dette virus er markant forskelligt fra de danske aviære HA sekvenser. Den humane befolkning forventes at have lav immunitet mod virus med et HA med aviær oprindelse, og dermed er der et stort potentiale for at et sådant virus kan spredes bredt i befolkningen, hvis der første sker smitte mellem mennesker. Derfor er det vigtigt at der i den humane influenza overvågning overvåger for smitte med svinespecifikke virus.

Samtidig ser vi, som nævnt tidligere, en stigning i både antallet af reassortments 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. I år har vi set en kraftig stigning i

⁶ Spatiotemporal Distribution and Evolution of the A/H1N1 2009 Pandemic Influenza Virus in Pigs in France from 2009 to 2017: Identification of a Potential Swine-Specific Lineage. Journal of Virology, 30 august, 2018 (<https://doi.org/10.1128/JVI.00988-18>).

H1pdm09N1av, som indeholder har syv ud af otte gener af H1N1pdm09 oprindelse, og derfor bør det evalueres om disse virus kan smitte til mennesker. Samtidig bør det også testes om der stadig er krydsreaktion mellem H1pdm09Nx virus fra det svine specifikke cluster og de humane sæsoninfluenza H1N1pdm09 virus.

Konklusion

Overvågningen fungerer 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.

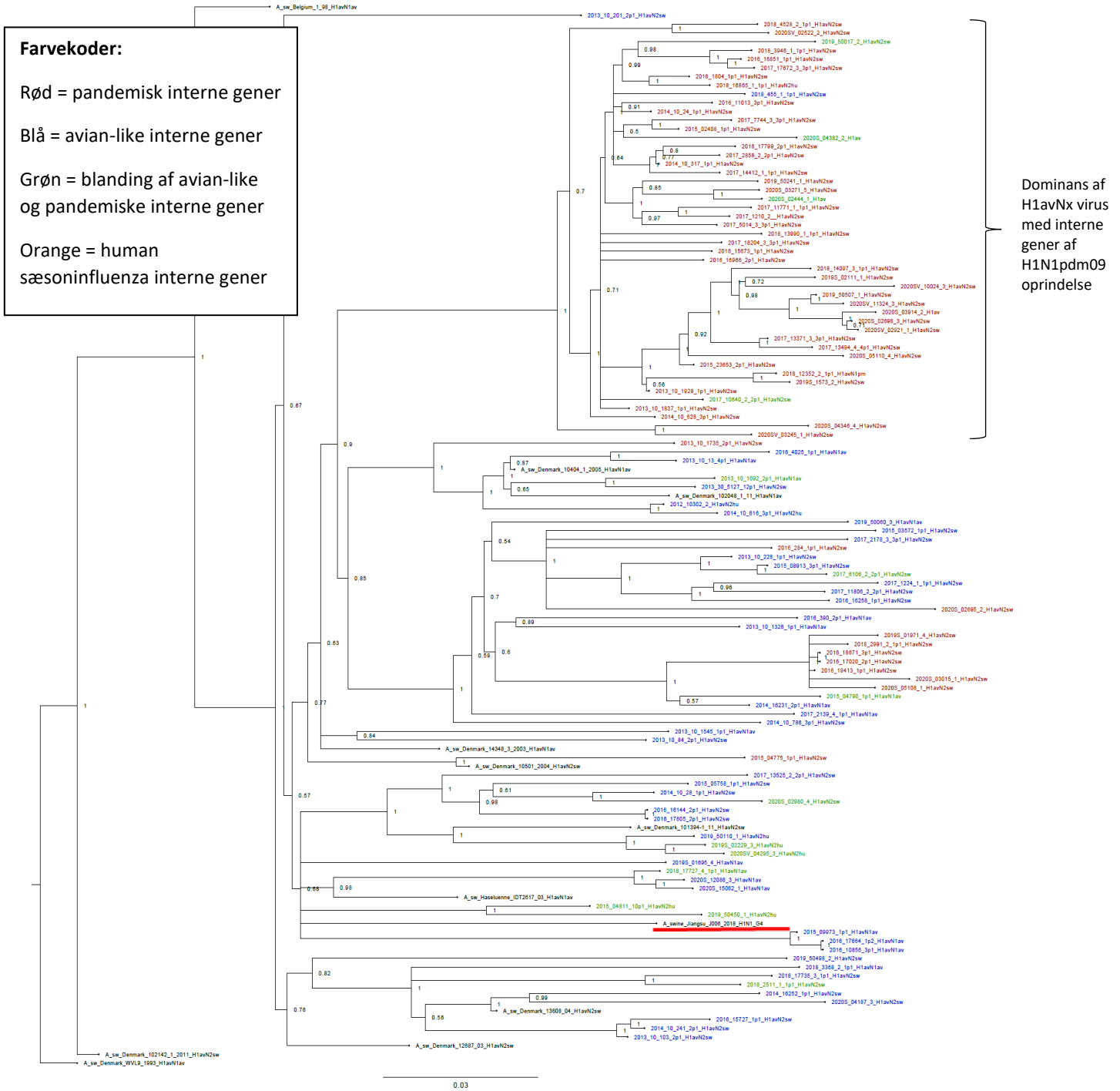
Resultaterne fra overvågningen gennem de seneste år har bekræftet at H1N1pdm09, som stadig må betragtes som en zoonose, nu er etableret i den danske svinepopulation, hvor den cirkulerer uafhængigt af den humane influenzasæson. Overvågningen har endvidere påvist en stigning i antallet af nye virus reassortments, hvor gener fra H1N1pdm09 indgår. Af de to nyere subtyper H1avN1pdm09 og H1pdm09N1av, der blev identificeret for første gang i 2018, er det kun H1pdm09N1av, der er blevet påvist i år. Til gengæld tyder det på at denne nye kombination af gener kan have en fordel, da der er sket en stigning fra 4 % af de subtypede indsendelser i 2019 til 15 % i 2020.

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. Dermed 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. Dette betyder, at der kan foretages en nærmere genetisk og biologisk karakterisering af virus, som kan danne evidens-baseret baggrundsviden for risikohåndteringen, i det tilfælde at der konstateres human smitte. 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

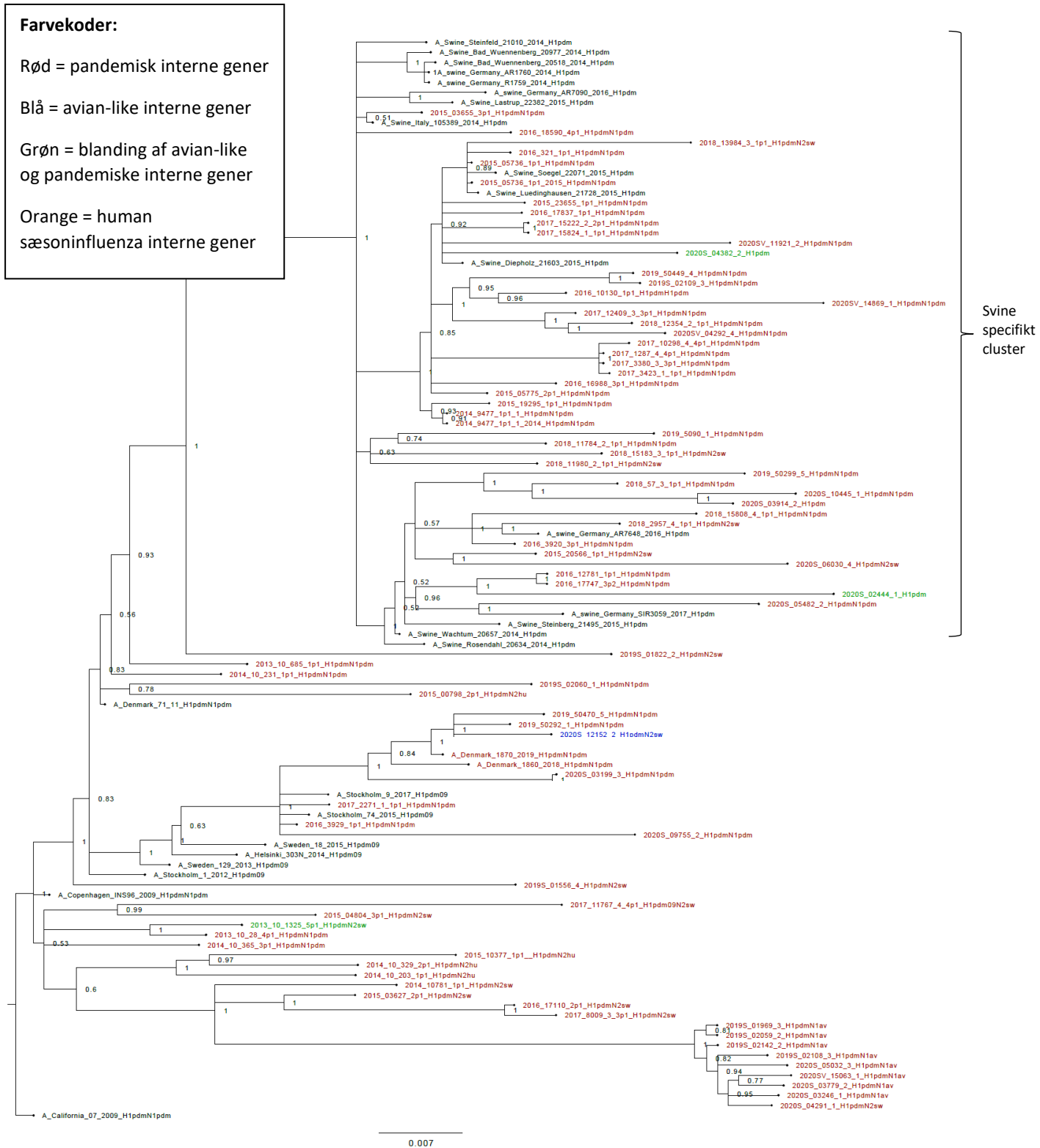
Bilag 1a. H1av fylogeni

Fylogenetisk træ af "avian like" H1 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2020 baseret på MUSCLE alignment og Bayesian træ fylogeni, der inkluderer posterior probabilities. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen, hvorimod de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. Subtypen for hver prøve er angivet sidst i sekvensnavnet. Den kinesiske H1av sekvens fra G4 subtypen er markeret med en rød streg under navnet.



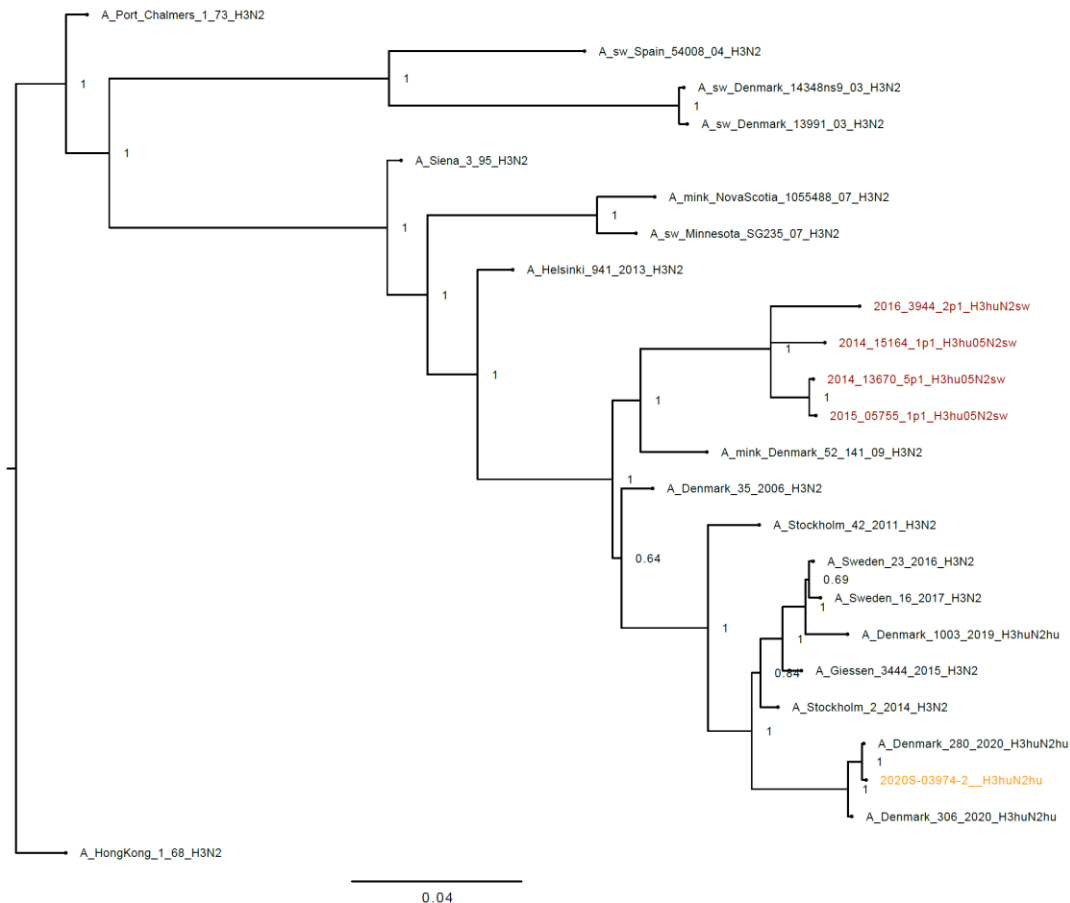
Bilag 1b: H1pdm fylogeni

Fylogenetisk træ af "pandemisk" H1 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2020 baseret på MUSCLE alignment og Bayesian træ fylogeni, der inkluderer posterior probabilities. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen, hvorimod de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. Subtypen for hver prøve er angivet sidst i sekvensnavnet. Det svinespecifikke cluster fundet i et nyligt studie⁴, er markeret i træet.



Bilag 1c: H3 fylogeni

Fylogenetisk træ af H3 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2020 baseret på MUSCLE alignment og Bayesian træ fylogeni, der inkluderer posterior probabilities. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen, hvorimod de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. Subtypen for hver prøve er angivet sidst i sekvensnavnet.



Farvekoder:

Rød = pandemisk interne gener

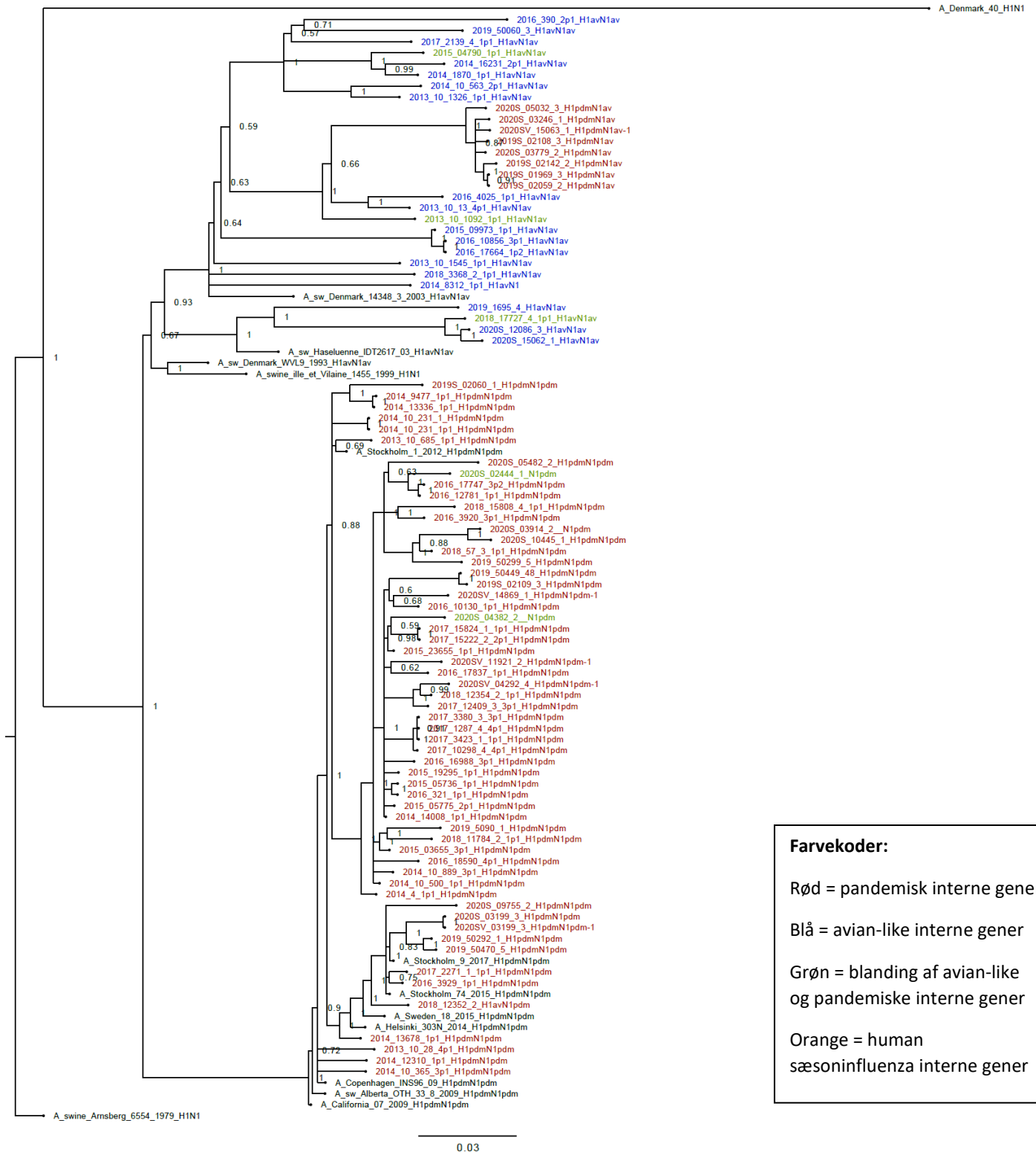
Blå = avian-like interne gener

Grøn = blanding af avian-like og pandemiske interne gener

Orange = human sæsoninfluenza interne gener

Bilag 2a. N1 fylogeni

Fylogenetisk træ af N1 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2020 baseret på MUSCLE alignment og Bayesian træ fylogeni, der inkluderer posterior probabilities. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen, hvorimod de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. Subtypen for hver prøve er angivet sidst i sekvensnavnet, og dette træ indeholder på N1 gener af "avian-like" oprindelse og pandemisk oprindelse.



Bilag 2b. N2 fylogeni

Fylogenetisk træ af N2 nukleotid sekvenser fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen 2012-2020 baseret på MUSCLE alignment og Bayesian træ fylogeni, der inkluderer posterior probabilities. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen, hvorimod de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. Subtypen for hver prøve er angivet sidst i sekvensnavnet.

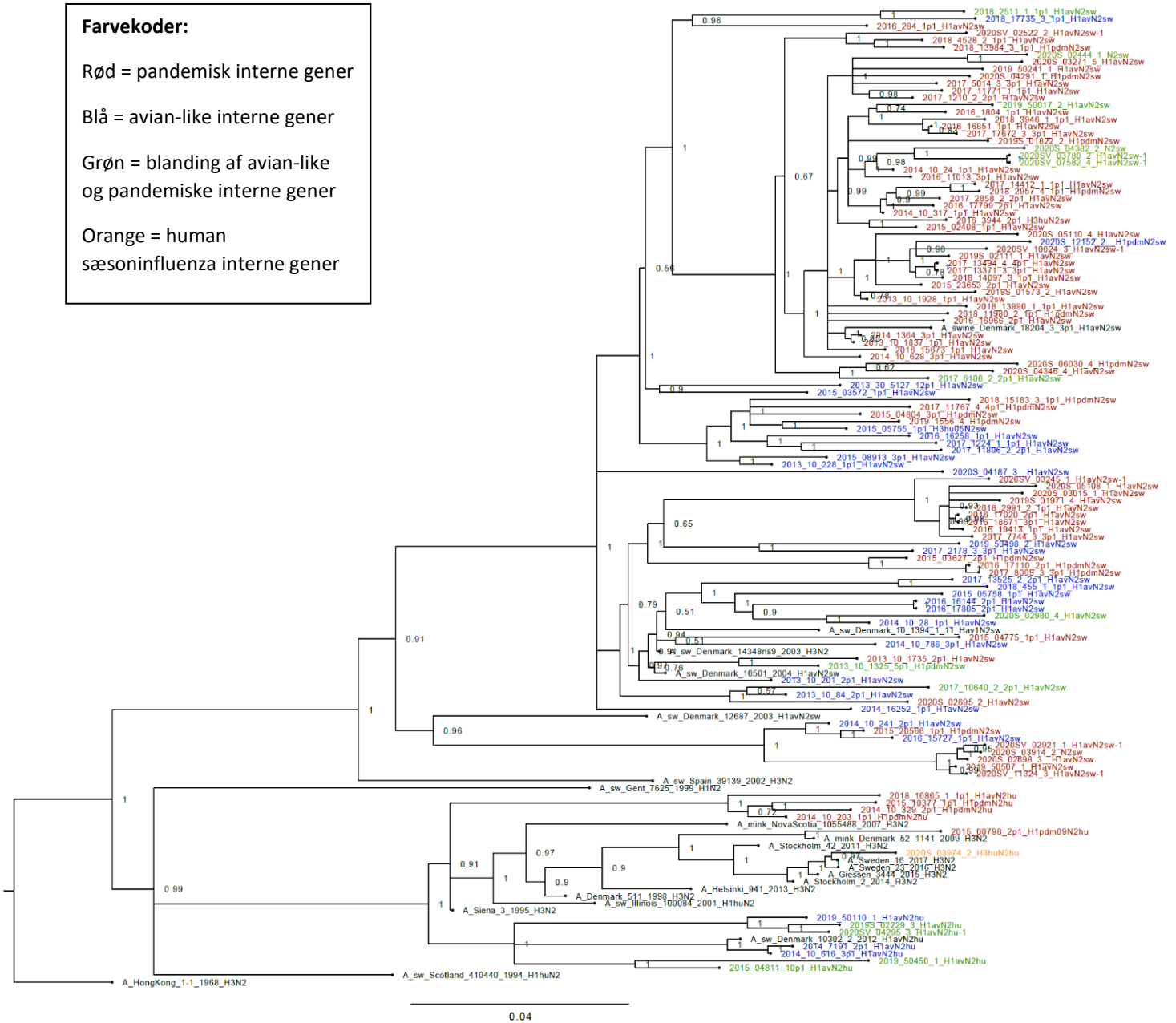
Farvekoder:

Rød = pandemisk interne gener

Blå = avian-like interne gener

Grøn = blanding af avian-like og pandemiske interne gener

Orange = human sæsoninfluenza interne gener



Bilag 3. Fuld genom data

Skematisk præsentation af oprindelsen af alle otte segmenter fra de undersøgte prøver fra 2019 og 2020, 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	2019
H1avN2sw										
Genotype 1									1	0
Genotype 2									1	1
Genotype 3									0	1
Genotype 4									12	5
H1avN1av										
Genotype 1									2	2
Genotype 2									0	0
Genotype 3									0	0
Genotype 4									0	0
H1avN2hu95										
Genotype 1									0	1
Genotype 2									0	0
Genotype 3									1	1
Genotype 4									0	1
Genotype 5									0	0
H1N1pdm09										
Genotype 1									7	7
H1pdm09N2sw										
Genotype 1									1	0
Genotype 2									0	0
Genotype 3									2	2
H1pdm09N1av										
Genotype 1									4	4
H1pdm09N2hu95										
Genotype 1									0	0
H3hu05N2sw										
Genotype 1									0	0
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							