

Overvågning af influenza A virus i svin

Slutrapport 2022

Pia Ryt-Hansen

Charlotte Kristiane Hjulsager

Jesper Schak Krog

Lars Erik Larsen

September 2023



DK-VET rapport - September 2023

Overvågning af influenza A virus i svin – slutrapport 2022

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 2022

Projektperiode 01-01-2022 – 31-12-2022

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 2022, og sammenholder resultaterne med overvågningen fra foregående år, samt udenlandske studier.

Laboratorieundersøgelser og databehandling er udført på Statens Serum Institut (SSI), Københavns Universitet (KU), Institut for veterinær og husdyrvidenskab (KU-IVH) og 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 månedlige rapporter, der løbende er udarbejdet, som følge af forsinkelser i dataregistreringen. De månedlige rapporter er offentliggjort på DK-VETs hjemmeside:

<https://www.vetssi.dk/overvaagning/overvaagningsprogrammer/overvaagning-af-influenza-a-virus-i-svin-i-danmark>

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 definerer virus **genotypen**. Genotypningen kan foretages direkte på RNA fra primært materialet (næsesvaber, spyt eller væv), men en risiko for at prøven potentielt kan indeholde flere forskellige virus, hvorved det ikke kan afgøres hvordan sekvenser fra segmenterne "hører sammen". For at teste virus' fænotypiske egenskaber er skal man have et virusisolat, der sikre at kun én virus er tilstede, og at vi har en høj nok mængde virus til at udføre specifikke analyser.

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 eller nye genotyper, hvis en ny kombination af overflade gener og interne gener opstår. Når dette sker kaldes det også et reassortment event.

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	7
Indledning.....	9
Formål med overvågningen.....	10
Materialer og metode	12
Resultater	13
Indsendelser	13
Indsendelser med påvist influenza A virus.....	14
Svineinfluenza A virus subtyper	15
Svineinfluenzavirus genotyper	18
Resistens og virulens markører	20
Fylogenetiske analyser	22
Samlet analyseoversigt	25
Diskussion	26
Cirkulerende influenza virus i Danmark	26
Veterinære aspekter	27
Zoonotiske aspekter	28
Konklusion	30
Bilag 1. Oversigt over danske genotyper	32
Bilag 2a. H1pdmNx virus fylogeni	33
Bilag 2b: H1avNx virus fylogeni	34
Bilag 3a. HxN1x virus fylogeni	35
Bilag 3b. HxN2x fylogeni	36
Bilag 4. Resultater fra HI-test af H1pdm09Nx virus isolater.....	37
Bilag 5a. Geografisk fordeling af positive og negative indsendelser 2022.....	38
Bilag 5b. Geografisk fordeling af H1pdm09 virus i de positive indsendelser 2022	38
Bilag 5c. Geografisk fordeling af subtyper 2022.....	38

Kort sammendrag

Der er i 2022 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 genotyper, der cirkulerer blandt danske svin.

Totalt blev der i 2022 iværksat undersøgelse for influenza A virus på 1617 prøver fordelt på 487 indsendelser fra 391 besætninger registreret med forskelligt CHR nummer. I alt havde 326 (67 %) af indsendelserne fra 274 forskellige besætninger minimum en positiv prøve, hvilket er en markant stigning i andelen af positive indsendelser i forhold til tidligere år i overvågningen, der har ligget omkring 50-55 %. Indsendelserne fordelte sig over hele landet og over hele året. Der blev modtaget flest indsendelser til undersøgelse i vinterhalvåret, men der blev fundet influenza positive prøver hele året, med en tendens til at en større andel af indsendelserne i februar, marts, april, juli (få indsendelser) og december var positive.

Alle influenzapositive prøver blev testet for tilstedeværelsen af et HA gen med oprindelse i den pandemiske H1N1pdm09 virus fra 2009 (H1pdm09). H1pdm09 blev i 2022 påvist i 118 indsendelser fra 103 besætninger registreret med forskelligt CHR nummer og udgjorde således 36 % af de influenza A virus positive indsendelser, hvilket er en lavere procentdel end i 2021, hvor tallet lå på 42 %, men stadig højere end tidligere år i overvågningen. I alt blev oprindelsen af både HA og NA genet bestemt for 254 influenzavirus positive indsendelser. Tilsammen viste disse analyser, at de oftest påviste subtyper i danske svin i 2022 stadig er H1avN2sw, H1pdm09N1av og H1N1pdm09. Der er dog sket en yderligere stigning i andelen af indsendelser fundet positive for H1pdm09N1av, og denne subtype udgør nu 27 % af alle subtypede indsendelser, samtidig er andelen af H1avN2sw faldet yderligere til 50 %.

For at opnå et bedre overblik over de genetiske karakteristika af de influenzavirus der cirkulerer i danske grise, er fuldgenom karakteriseringen af virus udvidet i årets overvågning. Der er således som udgangspunkt kørt fuld genom sekventering på mindst én prøve fra alle influenza positive indsendelser, hvilket har resulteret i 117 virus hvor den fulde genotype (alle otte gensegmenter) er blevet karakteriseret. I de tilfælde hvor det ikke er lykkedes at bestemme sekvensen af alle gensegmenter, skyldes det oftest at prøven var for svagt positiv til at analysen kunne gennemføres for alle gensegmenter. For yderligere 82 virus som ikke kunne fuldgenom sekventeres er HA og NA genet blevet karakteriseret. Fuld genom sekventering er ydermere foretaget på 129 prøver fra et projekt udført på Københavns Universitet, hvilket har resulteret i 90 ekstra virus, hvor den fulde genotype er blevet karakteriseret og yderligere syv virus, hvor kun HA og NA sekvensen er blevet karakteriseret. Derfor indgår der i alt 296 HA og NA sekvenser i de fylogenetiske analyser, og 207 virus har fået genotypen bestemt og indgår i analysen for resistens og genetiske markører. De fylogenetiske analyser viser tydelige grupperinger/clusters af bestemte genotyper, der indikerer tilstedeværelsen af adskillige nye blandinger af virus gener (reassortant events). Tilmed har resultaterne af genotypningen afsløret en markant fremgang af virus, der bærer én bestemt intern kassette, som også var karakteristisk for to humane svineinfluenza cases i 2021.

Overvågningen i 2022 har fungeret hensigtsmæssigt med henblik på at identificere influenza A virus med nye gensammensætninger og at følge udviklingen, selvom prøvestørrelsen i år er faldet markant. Dette fald i indsendelser er bekymrende, da det øger risikoen for at fundet af nye virus, der langsomt gør fremgang eller har en genkombination, som gør dem til høj-risiko virus, veterinært eller humant ikke erkendes i tide. Resultaterne fra overvågningen har vist sig 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 og genotyper, der potentielt kan spredes til mennesker.

De månedlige resultater fra overvågningen publiceres fortsat 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 2022. The overall purpose of the monitoring was to identify which influenza virus subtypes and genotypes that circulated among Danish pigs.

In 2022, a total of 1617 influenza A virus tests were performed on 487 submissions from 391 herds registered with different CHR no. In total, 326 (67 %) of the submissions from 274 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 the highest proportion of swIAV positive submissions present in February, March, April, July (very few submissions) and December.

Viruses with an HA gene of pandemic H1N1pdm09 origin (H1pdm09) were detected in 118 submissions from 103 herds registered with different CHR no. and thereby accounted for 36 % of the influenza A virus positive submissions. The proportion of H1pdm09 is thereby slightly lower than last year but still higher than all previous years in the surveillance. In total, 254 influenza A virus positive submissions were subtyped for both HA and NA. These analyses revealed that the most common subtypes in Danish pigs in 2022 still were H1avN2sw, H1pdm09N1av and H1N1pdm09. However, the prevalence of the H1pdm09N1av subtype increased further and is now representing 27 % of all submissions for which both HA and NA were subtyped. At the same time, the H1avN2sw subtype has decreased further in prevalence, and only constitutes 50 % of all subtyped submissions.

Special for this year's surveillance was that minimum one sample from each influenza positive submission was subjected to full genome sequencing, which resulted in 117 viruses being genotyped (having all eight segments characterized). In addition, the HA and NA segments were characterized for additional 82 viruses. Full genome sequencing was also applied to 129 project samples from the University of Copenhagen, resulting in additional 90 genotyped viruses and seven HA and NA characterized viruses. In total, 296 HA and NA sequences were included in the phylogenetic analysis, and the genotype was characterized for 207 viruses and thereby included in the analysis for resistance and viral markers. The phylogenetic analyses revealed several unique clusters related to specific genotypes indicating the occurrence of numerous reassortment events. Furthermore, the genotyping revealed an extensive expansion in viruses carrying an internal gene cassette similar to two Danish human zoonotic cases in 2021.

Overvågningen i 2022 har fungeret hensigtsmæssigt med henblik på at identificere influenza A virus med nye gensammensætninger og at følge udviklingen, selvom prøvestørrelsen i år er faldet markant. Dette fald i indsendelser er bekymrende, da det øger risikoen for at fundet af nye virus, der langsomt gør fremgang eller har en genkombination, som gør dem til høj-risiko virus, veterinært eller humant, ikke erkendes i tide. Resultaterne fra overvågningen har vist sig 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 og genotyper, der potentielt kan spredes til mennesker.

The aims of the 2022 surveillance of 2022 was successfully achieved in regards to identifying influenza A viruses with novel gene constellations and follow the evolution, even though the sample size has decreased

drastically. The decrease in submission is however worrying as it increase the risk of not detecting novel viruses, which have a low prevalence or a novel gene constellation, which could make them high-risk viruses are not detected in time. The results of the surveillance have again proved important to evaluate the zoonotic risk, which Danish swine herds constitute, since they have increasing reservoir of different influenza A virus subtypes and genotypes, which potentially can infect people.

The monthly results of the surveillance program for influenza A in swine is continuously published 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. Den intensive svineproduktion bevirker at der konstant er nye naive individer tilstede, hvilket betyder at influenza A virus kan cirkulere kontinuerligt i den enkelte besætninger i måneder til år. Som konsekvens heraf udvikler influenza A virus sig gennem mutationer, hver gang et nyt individ inficeres, og derved kan der konstant opstå nye influenza A virus varianter.

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 antistofpositive svin. Mindst fire subtyper af svineinfluenzavirus kan betragtes som enzootiske i danske svin; H1avN1av og H1avN2sw, som har cirkuleret de sidste hhv. 41 og 19 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 derfor også må antages at være enzootisk forekommende. Introduktionen af H1N1pdm09 har ledt til et utal af nye genotyper med ukendt zoonotisk potentiale, og disse har potentielt en højere risiko for at være zoonotiske, da vi ved at virus af denne subtype førhen har kunnet 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.

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)

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 anmeldningspligtige i EU, herunder Danmark, med mindre det drejer sig om subtyperne H5 og H7, der aldrig er påvist i svin i Danmark. Svinebesætninger med udbrud af influenza pålægges derfor ikke restriktioner af myndighederne. Diagnostik af influenza A virus i danske svin i 2022 blev foretaget på materiale, indsendt direkte til Statens Serum Institut eller Landbrug og Fødevarers veterinært laboratorium, Kjellerup i forbindelse med almindelig rutinediagnostik. Derudover analyseres en betydelig mængde prøver på udenlandske laboratorier, og resultaterne heraf 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 tilrettet danske forhold.

Formål med overvågningen

De overordnede formål var:

- At undersøge hvilke influenza A virus subtyper og genotype, 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 der giver 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.

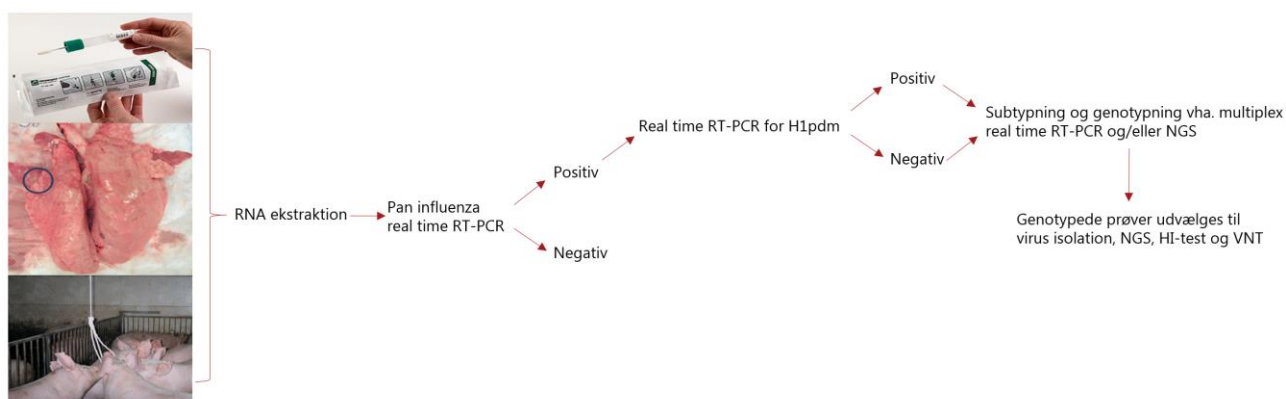
2. At muliggøre en tidlig etablering af virus stocks til hurtig produktion af vacciner mod nye virus subtyper, der giver forøget sygdom i svin.
3. At sikre at de i landet anvendte diagnostiske tests identificere alle kendte influenza A virus subtyper i svin.
4. At kunne dokumentere, specielt over for 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 2022 bestod af:

1. Undersøgelse for influenzavirus vha. pan-influenza A virus real time RT-PCR på brugerbetalte diagnostiske indsendelser til influenzavirusundersøgelse på 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 og genotypning 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 (subtypen) og de interne gener (genotypen).
4. Yderligere subtypning og genotypning af influenza A virus vha. Next generation sequencing (NGS) af udvalgte projektprøver fra Københavns Universitet.
5. Isolation af virus fra udvalgte prøver i cellekultur.
6. Next generation sequencing (NGS) af udvalgte virusisolater.
7. Hemagglutinations inhibition (HI) test af udvalgte virusisolater over for sera rejst mod humane og veterinære influenza vaccinstammer.
8. Virus neutralisationstest (VNT) af udvalgte virusisolater ved brug af sera rejst mod humane og veterinære influenza vaccinstammer.

Materialer og metode

Den overordnede arbejdsgang er illustreret i Figur 1. Startmaterialet kan være næsesvaber, spytpøve, lungevæske eller lungestykker. Herfra oprenses RNA og der køres pan-influenza A real time RT-PCR assay for at bestemme om prøven er positiv for influenza A virus. Alle influenzavirus positive prøver analyseres med et real time RT-PCR assay specifikt for H1pdm09. Minimum én influenza positiv prøve udvælges til subtypning og genotypning vha. multiplex real time RT-PCR og/eller NGS. 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 i alt otte subtyper af HA og NA, der er relevante for den danske svinepopulation. Vha. NGS opnår man både en karakterisering af HA og NA (subtypen), men også de interne gener (genotypen). Herved er det muligt at påvise en eventuel introduktion af en ny influenza A virus subtype og/eller genotype og lave detaljerede fylogenetiske analyser for at følge virus evolution. I år er der yderligere inkluderet 129 influenza positive projektindsendelser fra Københavns Universitet (KU) til genotypning vha. NGS. Disse prøver er udvalgt på baggrund af mængden af influenza virus i prøven, for at øge chancen for en succesfuld genotypning.



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 ét rør og udført på RNA oprenset fra primær materialet (næsesvaber, spyt eller lunge). PCR produkterne oprenses og sekventeres med NGS på Illumina MiSeq sekventeringsplatformen. Rådata databehandles via en internt udviklet 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 genetiske markører og resistens mutationer. På baggrund af disse analyser er der udvalgt specifikke virus til dyrkning i celler for at opnå et virusisolat. Efterfølgende foretages der NGS på virusisolaterne for genetisk karakterisering. Udvalgte virusisolater anvendes derefter i to fænotypiske tests; HI-test og VNT, for at teste krydsreaktionen til antistoffer rejst mod humane og veterinære influenza vaccine virus stammer. I årets overvågning er disse tests kørt på isolater med et HA gen af H1N1pdm09 oprindelse mod vaccine sera rejst mod forskellige H1N1pdm09 virus.

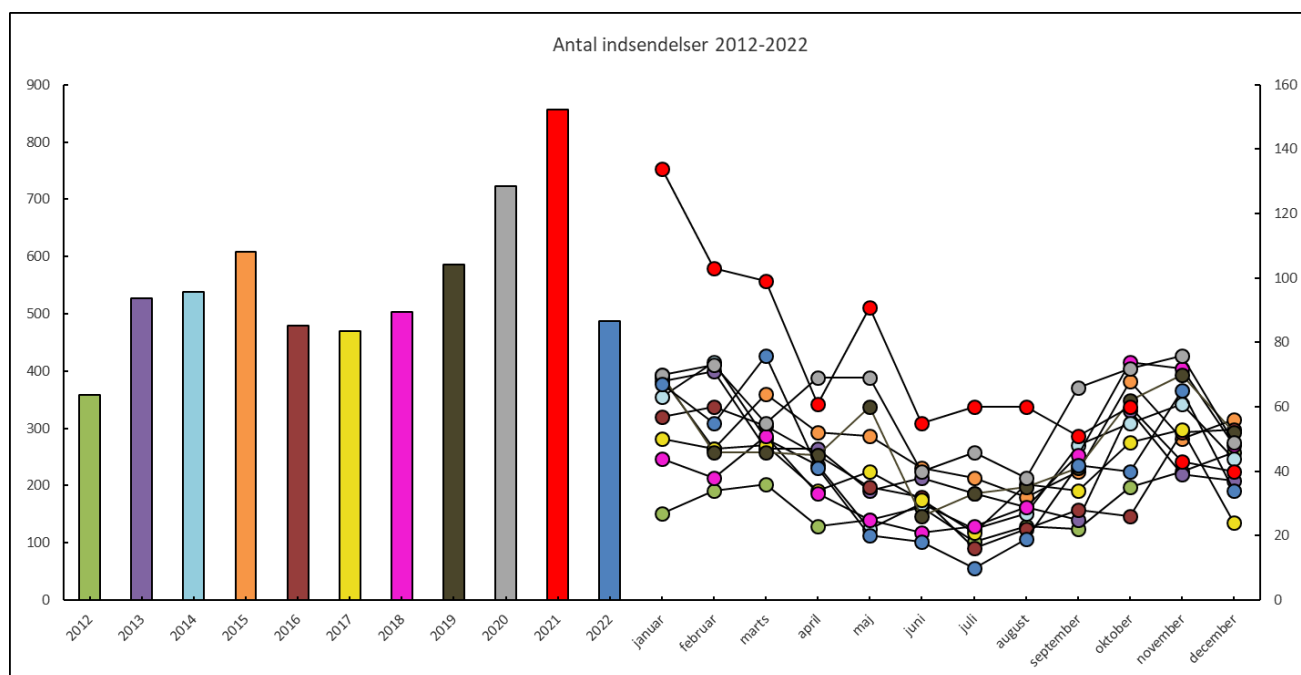
Resultater

Indsendelser

Alle indsendelser fra danske svinebesætninger til Statens Serum Institut og Landbrug og Fødevarers veterinært laboratorium, Kjellerup (VLK) i 2022 med ønske om undersøgelse for influenzavirus blev testet og indgår i rapporten. Prøverne var udtaget fra svin med anamnesen respirationsvejslidelse.

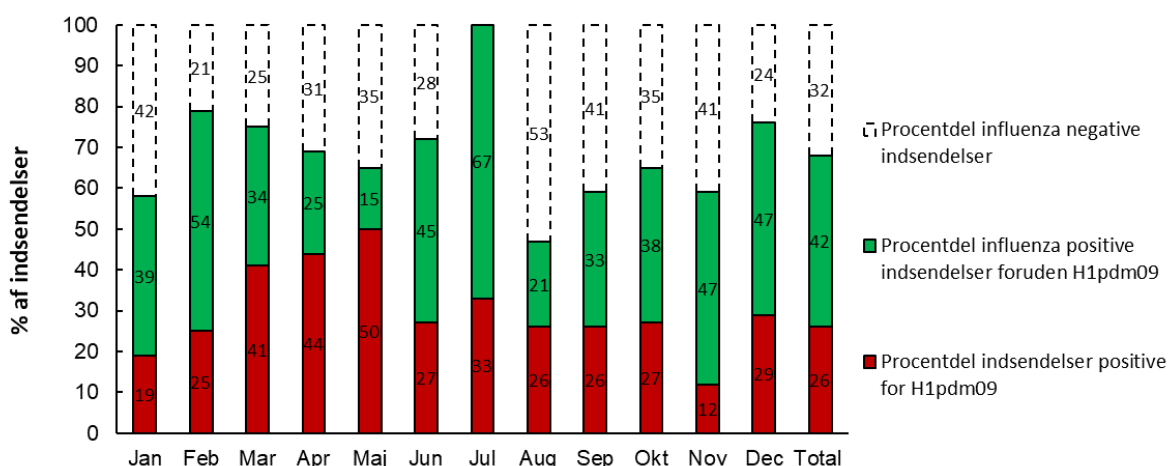
Omkostningerne til influenzaviruspåvisning, der foretages med real time RT-PCR, blev løbende faktureret de indsendende dyrlæger, eller medicinalfirmaet Ceva Animal Health A/S, som sponsorerede cirka 38 % af indsendelserne i år. Der blev i gennemsnit indsendt 3,3 prøver per indsendelse, hvilket er sammenligneligt med de foregående to år.

I 2022 blev der totalt modtaget 1617 prøver fordelt på 487 indsendelser til undersøgelse for influenza A virus fra 391 danske svinebesætninger fordelt over hele landet (Figur 2 og Bilag 5a). Der var indsendt prøver til undersøgelse for influenzavirus mere end én gang fra 40 forskellige besætninger. I år blev der ydermere inkluderet 129 influenza A virus positive projektindsendelser fra Københavns Universitet til genotypning.



Figur 2. Fordelingen af antallet af indsendelser til diagnostik af influenza A virus i svin fra 2012 til 2022 fordelt på år (søjler til venstre) og måned (graf til højre) med tilsvarende farve.

Antallet af indsendelser i 2022 er faldet markant i forhold til de foregående tre år, og i forhold til antallet af indsendelser i 2021 er faldet på 44 %. Den generelle tendens i det månedlige antal indsendelser ligner de tidligere år, hvor der modtages flest indsendelser i efterårs- og vintermånedene (Figur 2).

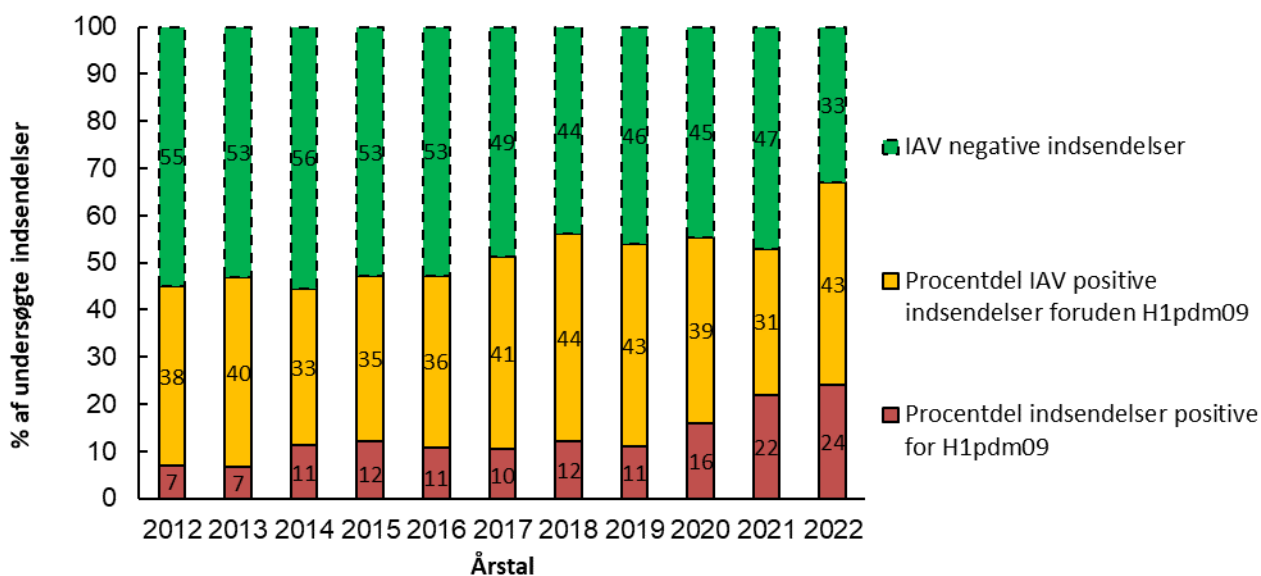


Figur 3. Den månedlige andel (%) af de undersøgte indsendelser, der testede positiv for influenza A virus og andelen der var positiv for H1pdm09 i 2022.

Andelen af positive indsendelser varierede månedligt fra 47-100 % med den højeste andel positive indsendelser registreret i februar, marts, juni, juli og december (Figur 3). Det skal dog bemærkes at antallet af indsendelser var meget lavt i juli, hvilket gør usikkerheden større.

Indsendelser med påvist influenza A virus

I 2022, var i alt 326 indsendelser positive for influenza A virus i minimum én prøve, hvilket svarer til 67 % af de 487 undersøgte indsendelser (Figur 4). Dette er markant højere end alle tidligere år i overvågningen, hvor andelen af positive indsendelser har ligget omkring 50-55 %. Det totale antal indsendelser fordelte sig på 391 forskellige besætninger registreret med forskellige CHR numre, hvoraf 274 fik påvist influenza A virus, svarende til 70 % af de indsendende besætninger, hvilket også er en markant stigning i forhold til tidligere år.



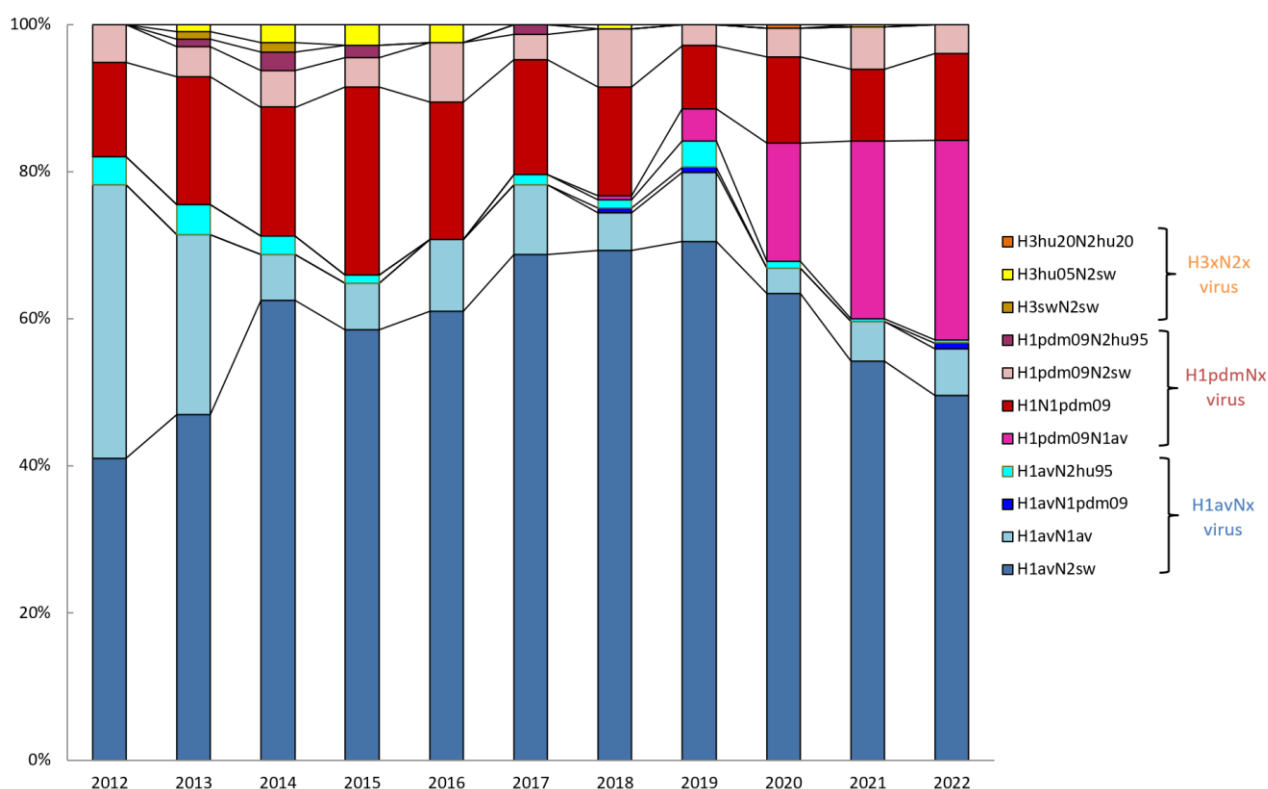
Figur 4. Andelen (%) af de undersøgte indsendelser, der testede positiv for influenza A virus og andelen der var positiv for H1pdm09 i årene 2012 til 2022.

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 2022 blev H1pdm09 fundet i 118 (36 %) indsendelser ud af de 326 influenza A positive indsendelser, disse repræsenterede 103 forskellige besætninger. Derved er andelen af H1pdm09 positive indsendelser faldet 6 procentpoint i forhold til niveauet i 2021. Den geografiske fordeling af H1pdm09 virus fremgår af Bilag 5b, hvor det ses at denne H type, i lighed med sidste år, er fundet i alle landsdele. Af Figur 4 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 2022 var 326 indsendelser positive for influenza A virus og af disse blev subtypen (både HA og NA genet) bestemt for 254 forskellige indsendelser svarende til 78 % af de positive indsendelser, hvilket er markant højere end alle tidligere år, og 9 % højere end i 2021. I yderligere 9 indsendelser blev der fundet mere end en subtype, og disse indsendelser er ikke indregnet i nedenstående figur over fordelingen af subtyper.

Den procentvise fordeling af subtyper for de 254 indsendelser, der kun indeholdt én subtype, fremgår af Figur 5 for årene 2012-2022. 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 fremgår af Tabel 1.



Figur 5. Fordeling af subtyper i procent ud af de subtypede influenza A virus positive indsendelser for årene 2012-2022.

H1pdm09N1av er igen i år i markant fremgang, og udgjorde 27 % af alle de fuldt subtypede (både H og N genet) indsendelser. Sammenfaldende med stigningen af H1pdm09N1av i 2020-2022, er der sket et

yderligere fald i andelen af H1avN2sw til 50 % for andet år i træk. Der er sket en mindre stigning i andelen af den originale H1N1pdm09 subtype i forhold til sidste år, og den udgør nu 12 % af alle subtypedede indsendelser, mens andelen af H1pdm09N2sw er faldet til 4 %. Andelen af H1avN1av, som var den første influenza A subtype, der blev påvist i Danmark, er sammenlignelig med sidste år. Af de mindre prævalente subtyper, blev der fundet én indsendelse som var positiv for H1avN2hu95 og to indsendelser der var positiv for H1avN1pdm09.

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 ni 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 5c.

Subtype	Antal						Kommentar
	2022 N (%)	2021 N (%)	2020 n (%)	2019 n (%)	2018 n (%)	2017 n (%)	
H1avN1av	16 (6,3)	16 (5,4)	7 (3,4)	13 (9,4)	9 (5,1)	14 (9,5)	"Normal" europæisk svineinfluenza A virus subtype "avian-like swine" som har cirkuleret i DK siden 1981.
H1avN2sw	126 (49,6)	161 (54,2)	130 (63,4)	98 (70,5)	122 (69,3)	101 (68,7)	Dansk svineinfluenza A virus subtype fundet første gang i 2003.
H1avN2hu95	1 (0,4)	1 (0,3)	2 (1)	5 (3,6)	2 (1,1)	2 (1,4)	"Normal" europæisk avian-like svine H1 i kombination 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)	1 (0,3)	0 (0)	0 (0)	1 (0,6)	0 (0)	Ny reassortment med humant H3, der cirkulerede i mennesker i DK 2005, sammen med dansk svine N2.
H3hu20N2hu20	0 (0)	0 (0)	1 (0,5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	Human sæson variant. Fundet første gang i danske svin i 2020.
H1N1pdm09	30 (11,8)	29 (9,8)	24 (11,6)	12 (8,6)	26 (14,8)	23 (15,6)	Pandemisk svineinfluenza A virus subtype. Fundet første gang i danske svin januar 2010.
H1pdm09N2sw	10 (3,9)	17 (5,8)	8 (3,9)	4 (2,9)	14 (8,0)	5 (3,4)	Pandemisk H1 sammen med dansk svine N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1pdm09N2hu95	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (1,4)	Pandemisk H1 sammen med human N2. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1avN1pdm09	2 (0,8)	0 (0)	0 (0)	1 (0,7)	1 (0,6)	0 (0)	Dansk avian-like H1 sammen med pandemisk N1.
H1pdm09N1av	69 (27,2)	72 (24,2)	33 (16,2)	6 (4,3)	1 (0,6)	0 (0)	Pandemisk H1 sammen med N1 fra dansk "avian-like" H1N1.
H1av N1av, N2sw	1	3	2	-	-	-	
H1av N1pdm09, N2sw	0	0	3	-	-	-	
H1pdm09	0	0	1	-	-	-	

N1pdm09, N2sw							
H1av, H1pdm, N2sw	2	2	0	-	-	-	
H1pdm, N1pdm, N1av	0	1	0	-	-	-	
H1av, H1pdm09 N1pdm09, N2sw	0	2	4	-	-	-	
H1av, H1pdm, N1av, N2sw	0	2	0	-	-	-	
H1av, H1pdm09 N1av, N2sw	0	2	1	-	-	-	
H1av, H1pdm, N1av, N2sw	5	2	0	-	-	-	
H1pdm, N1pdm, N1av, H1av, N2sw	0	1	0	-	-	-	
H1pdm, N1av, N2sw	1	0	0	-	-	-	

Table 1. Antal indsendelser hvor subtypen af influenza A virus blev bestemt fra årene 2017-2022. 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 subtyperede indsendelser.

I 2022 blev der indsendt influenza positive prøver fra 274 besætninger med forskellige CHR numre. I alt sendte 34 (12 %) af besætningerne prøver ind af flere omgange, hvor subtypen blev bestemt mere end én gang. I 25 (73 %) af disse besætninger blev der fundet den samme subtype ved alle indsendelser, mens der i 9 (27 %) af indsendelserne blev fundet forskellige subtyper i de forskellige indsendelser. Skiftet af subtype over tid i disse besætninger er illustreret i Figur 6.

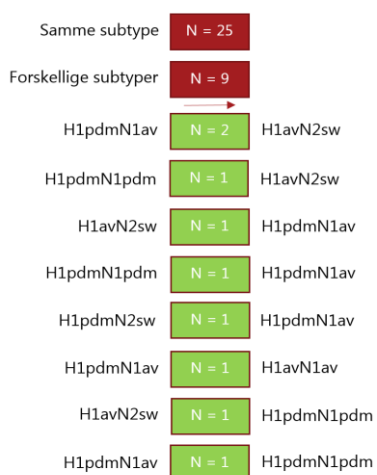
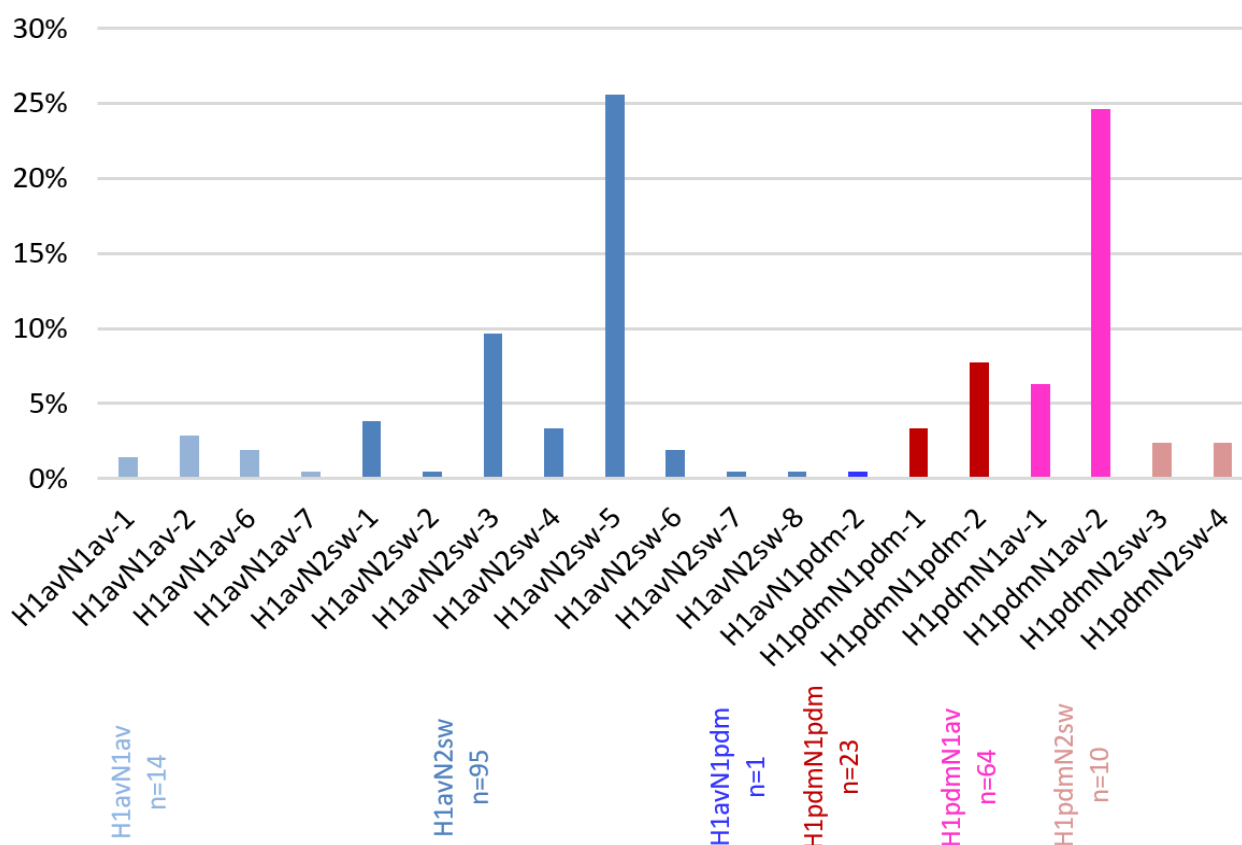


Figure 6. Oversigt over besætninger, som har fået subtypet indsendelser indsendt over flere gange i løbet af 2022, og overblik over ændringen i subtype fra den første indsendelse til den efterfølgende. "N" angiver antallet af besætninger, hvor den pågældende ændring er sket.

Svineinflenzavirus genotyper

Som noget nyt i 2022, er én prøve fra alle influenza A virus positive indsendelser forsøgt genotyperet vha. NGS. Genotypen blev bestemt for i alt 117 virus indsendt til overvågningen, og H og N genet blev bestemt for yderligere 82 virus indsendt til overvågningen. For at opnå et større antal genotyperede virus fra 2022, blev der forsøgt genotypning på yderligere 129 projektindsendelser modtaget på og testet for influenza A virus på Københavns Universitet. Disse indsendelser omfatter prøver fra 129 besætninger fra to af de store danske svinepraksis udtaget i forbindelse med en screening for forskellige luftvejspatogener. Disse indsendelser repræsenterer derfor noget der minder om en "aktiv" overvågning, da grisene ikke nødvendigvis har haft symptomer på influenza virus infektion. Dog vil der ofte være taget prøver fra grise med luftvejssymptomer, hvis de forekom. I alt blev genotypen bestemt for 90 af disse projektindsendelser og subtypen (H og N genet) bestemt for yderligere syv indsendelser. I alt er der dermed i 2022 blevet genotyperet 207 forskellige virus, og HA og NA er bestemt for i alt 296 virus. Oprindelsen af de enkelte gensegmenter for de undersøgte svineinflenzavirus blev identificeret ved sammenligning med udvalgte reference gensekvenser. Den procentvise andel af de forskellige genotyper ud af det totale antal genotyperede virus fremgår Figur 7. For en nærmere beskrivelse af oprindelsen af de forskellige gensegmenter for hver enkelt genotype henvises til tabellen i Bilag 1.



Figur 7. Andelen af hver genotype fundet i 2022 på baggrund af NGS data fra 117 virus fra overvågningen og 90 virus fra projektprøver. Nederst i figuren er det sammenlagte antal af genotyper karakteriseret for de nævnte subtyper angivet.

Nedenstående opsummerer prævalensen af de enkelte genotyper, og giver en beskrivelse af genotyperne identificeret inden for hver af de enkelte subtyper. De omtalte humane zoonotiske cases fra 2021 er publiceret⁴.

H1avN2sw virus udgjorde 95 (46 %) af de genotypedede virus. Den mest prævalente genotype med denne subtypevar H1avN2sw-5, som har en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse og udgjorde 56 % af de genotypedede H1avN2sw virus. Denne genotype har tidligere i overvågningen også været den dominerende, dog baseret på et langt mindre antal genotypedede indsendelser. En anden genotype, der også dominerer, er H1avN2sw-3, som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse bort set fra NS-segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse. Denne kombination af interne gener blev set for første gang i H1avN2sw virus i 2021, og er lig den interne kassette fundet i to zoonotiske humane cases fra 2021. H1avN2sw-3 udgør 10 % af de genotypedede H1avN2sw virus. Af mindre prævalente H1avN2sw genotyper ses H1avN2sw-1, som er den "oprindelige" genotype fundet i Danmark, indeholdende en komplet intern kassette af "avian-like swine" H1N1 oprindelse og denne udgør 4 % af de genotypedede H1avN2sw virus. På samme niveau ses H1avN2sw-4, som har alle gener på nær PB1 af H1N1pdm09 oprindelse. Hver af de resterende H1avN2sw genotyper er kun set i 1-2 indsendelser i 2022.

H1avN1av "avian-like swine" virus udgjorde 14 (7 %) af de genotypedede virus og fire forskellige H1avN1av genotyper er påvist i 2022. Størstedelen af disse virus var af H1avN1av-2 genotypen (43 %), som har alle gener af "avian-like swine" H1N1 oprindelse på nær M segmentet, som var af H1N1pdm09 oprindelse. En anden dominerende H1avN1av genotype var H1avN1av-6 (29 %), som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS-segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse. Dette er som tidligere nævnt lig den interne kassette fundet i to zoonotiske humane cases i 2021.

H1avN1pdm09 virus udgjorde blot et af de genotypedede virus, og blev fundet i form af H1avN1pdm-2 genotypen, som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS-segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse og er lig den interne kassette fundet i de humane zoonotiske cases.

H1N1pdm09 virus udgjorde 23 (11 %) af de genotypedede virus, og kun to genotyper er indtil videre detekteret herunder. Den mest dominerende genotype er H1pdmN1pdm-2 (70 %), som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS-segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse. Denne genotype er identisk med den første zoonotiske humane case fra januar 2021. De resterende 30 % H1N1pdm09 virus udgøres af H1pdmN1pdm09-1 genotypen, som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse.

H1pdm09N1av virus udgjorde 64 (31 %) af de genotypedede virus, og der er indtil videre kun fundet to forskellige genotyper. Den mest dominerende genotype er H1pdmN1av-2 (80 %), som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS-segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse og er identisk med den anden zoonotiske humane case påvist i november 2021. De resterende 20 % af H1pdmN1av virus udgøres af H1pdmN1av-1 genotypen, som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse.

⁴ Reassortant Influenza A(H1N1)pdm09 Virus in Elderly Woman, Denmark, January 2021, DOI: 10.3201/eid2712.211361 and Severe Human Case of Zoonotic Infection with Swine-Origin Influenza A Virus, Denmark, 2021, DOI: 10.3201/eid2812.220935.

H1pdm09N2sw virus udgjorde 10 (5 %) af de genotypede virus, og fandtes i år i form af to forskellige genotyper, som begge udgjorde 50 %. Den ene genotype var H1pdmN2sw-3, som har alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse, mens den anden genotype H1pdmN2sw-4 havde alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS-segmentet, som var af "avian-like swine" H1N1 oprindelse, og igen er lig den interne kassette fundet i de to humane zoonotiske cases fra 2021.

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 E119G/D/A/V og R292K i N2 blev undersøgt i alle NA sekvenser fra 2022, men ingen af disse mutationer blev fundet i de genotypede 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 2022.

Samtlige NP sekvenser blev analyseret for tilstedeværelsen af seks tidligere beskrevne "MxA escape" mutationer (48Q, 53D, 98K, 99K, 100I/V og 313V)⁵, 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. Modsat den manglende tilstedeværelse i virus fra 2021, blev der blandt virus fra 2022 fundet 18/206 virus (9 %) med 48Q mutationen og 8/206 (4%) virus med 53D mutationen. Derudover havde henholdsvis 18 (9 %) og 19 (9 %) virus også 98K og 99K mutationerne, og disse var de samme virus, som også havde 48Q mutationen. I alt havde 153/206 virus (74 %) 100I/V mutationen, og 188/206 (91 %) 313V mutationen.

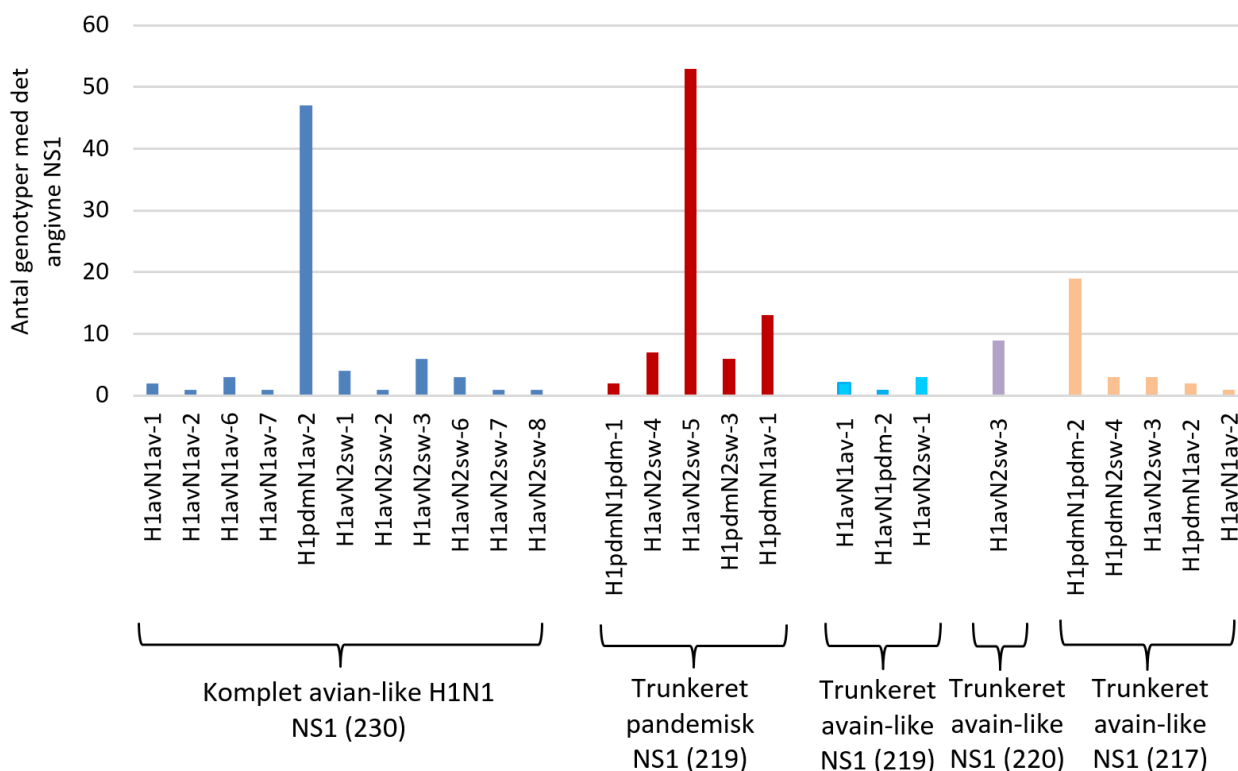
I en publikation fra 2022 er fire nye mutationer (V100I, N321K, I330V, og A639T) identificeret i PA genet, og associeret med øget patogenicitet og transmission af H1avN1av virus i fitter, som agerer som model for human influenza infektion⁶. Fjorten af de danske genotypede virus fra 2022 havde ikke tilstrækkelig god kvalitet af PA gen sekvensen til at blive undersøgt for mutationerne, men de resterende 191 virus er alle undersøgt. I alt havde otte virus (4 %) alle fire mutationer, og én af disse virus blev valgt ud til virus isolation, og der er opnået et virusisolat (A/swine/Denmark/01457-2/2022). For de resterende virus havde 95/191 (50 %) tre af mutationerne, 46/191 (24%) havde to af mutationerne, 37/191 (19 %) havde én af mutationerne og 5/191 (3%) ingen af mutationerne.

I 2021 havde vi de første danske humane zoonotiske infektioner med influenza A virus med oprindelse i svin. Den ene af disse zoonotiske virus (den første zoonotiske case), havde et trunckeret NS1 gen af H1N1 "avian-like" oprindelse på 217 aminosyrer, mens den anden zoonotiske case bar et fuldt længde "avian-like swine" H1N1 NS1 gen på 230 aminosyrer. Derfor blev alle NS1 gener fra 2022 af både "avian-like swine" H1N1 og H1N1pdm09 oprindelse undersøgt for tilstedeværelsen af trunkeringer. Der er på nuværende tidspunkt fem mulige varianter af NS1 genet i danske svin. Dette er illustreret i Figur 8. Øverst er angivet den komplette fuld længde udgave NS1 genet af "avian-like swine" H1N1 oprindelse, som er 230

⁵ 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>.

⁶ 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>.

H1N1 oprindelse på nær M segmentet, der er af H1N1pdm09 oprindelse.



Figur 9. Tabellen angiver antallet af specifikke genotyper, der bærer den specifikke udgave af NS1 genet.

Fylogenetiske analyser

Der er i år genereret 296 HA og NA sekvenser fra danske svineinfluenza virus, og disse sekvenser indgår alle i de fylogenetiske analyser. Som beskrevet tidligere har vi publiceret et studie med data fra den danske svineinfluenzavirus overvågning, som viste specifikke grupperinger⁷, og disse virus har udviklet sig yderligere. De fylogenetiske analyser er udført på henholdsvis H1pdm09Nx, H1avNx, H1xN1x og H1xN2sw virus (Bilag 2a-3b). Inkluderet i de fylogenetiske virus er reference stammer fra de tidligere danske clusters fundet i forbindelse med den nævnte publikation, og reference stammer fra humane zoonotiske tilfælde observeret i 2020-2022.

H1pdm09Nx fylogeni

For virus bærende et HA gen af H1N1pdm09 oprindelse ser vi, i lighed med sidste år, tre overordnede grupperinger/clusters (Bilag 2a).

1. H1pdmN1av-1/2 dominerende cluster: Dette cluster indeholder hovedsageligt H1pdm09N1av virus, som blev detekteret første gang i 2018 i Danmark, og sidenhen har spredt sig hurtigt og udgør 27 % af alle subtyper identificeret i 2022. Der er adskillige subclusters inden for dette store cluster, hvor vi blandt andet ser et cluster, der primært indeholder virus med genotypen H1pdmN1av-1 (pink) og et andet mindre cluster med genotypen H1pdmN1av-2 (mørk rød), som formentligt afspejler at disse to genotyper er

⁷ 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>.

opstået ved to forskellige reassortment events, da de indeholder forskellige interne gener. Der er enkelte undtagelser fra dette, hvilket kan tyde på at der fortsat sker reassortment events inden for disse virus. Derudover finder vi også to H1pdm09N2sw virus i dette cluster, som igen understreger at flere reassortant events må have fundet sted. Disse to H1pdm09N2sw virus findes også i to forskellige clusters afhængig af deres interne gener. Som tidligere nævnt findes den anden danske zoonotiske case fra 2021 i dette H1pdmN1av-1/2 dominerende cluster (angivet med *).

2. *H1pdmN1pdm/N2sw, der ligner human sæsoninfluenza cluster*: Dette cluster indeholder reference sekvenser for human sæson influenza af H1N1pdm09 oprindelse, samt to zoonotiske cases fra Brasilien i 2020 og 2022. Derudover indgår der tidligere danske svine H1pdmN1pdm09 sekvenser, og tre af dette års H1pdmN1pdm-0/1 og H1pdmN2sw-3 virus, som ligner den nuværende humane sæsoninfluenza. Disse virus afspejler formentlig såkaldte "reverse zoonotiske events", hvor influenzasmittede medarbejdere kan have smittet grisene i stalden.

3. *Svineadapteret H1pdmN1pdm/N1av/N2sw cluster*: Dette cluster indeholder reference sekvenser fra både Danmark, Italien og Tyskland, som stammer fra den tidligere nævnte danske publikation, hvori dette cluster blev defineret. I 2022 ses det, at dette cluster primært indeholder H1pdmN1pdm virus af begge genotyper, samt nogle H1pdmN2sw virus og få H1pdmN1av-2 virus. Det ses at clusteret kan opdeles i minimum to subclusters, hvoraf det ene primært indeholder genotyperne H1pdmN1pdm-1 (lys grøn) og H1pdmN2sw-3 (orange), som begge har en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse. Det andet cluster består derimod primært af genotyperne H1pdmN1pdm-2, H1pdmN2sw-4 og H1pdmN1av-2, som alle har en intern kassette med alle gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse. I dette subcluster findes også den første danske zoonotiske case virus. Denne inddeling i subclusters illustrerer igen at de forskellige genotyper er opstået i forbindelse med forskellige reassortment events.

Nederst i det fylogenetiske træ ses den veterinære H1N1pdm09 vaccine stamme fra RespiPorc FLUpan H1N1 (Ceva Animal Health), som er en human H1N1pdm09 virus fra 2009, der er tæt beslægtet med de første cases fra den humane influenza pandemi i 2009. Det fremgår at denne genetisk ligger langt fra de nuværende cirkulerende svine H1pdmNx virus.

H1avNx fylogeni

For virus bærende et HA gen af "avian-like swine" H1N1 oprindelse ser vi, at der er en gruppering af virus i forskellige clusters, alt efter hvilken genotype de udgør (Bilag 2b). Dette afspejler formentlig, at disse genotyper er opstået ved forskellige reassortment events. Af større clusters ses et cluster, der indeholder langt størstedelen af H1avN2sw-5 virus "H1avN2sw-5 dominerende cluster", som har en komplet intern kassette af H1N1pdm09 oprindelse. Der er dog to subclusters i dette store cluster; ét primært indeholdende H1avN2sw-4 (gul), som har alle gener på nær PB1 segmentet af H1N1pdm09 oprindelse, og et cluster udelukkende indeholdende H1avN2sw-6 (grøn) med alle gener af "avian-like swine" H1N1 oprindelse på nær NP segmentet. Et andet unikt H1avN2sw cluster, "H1avN2sw-3/H1avN1pdm-2 cluster", der primær består af H1avN2sw-3 virus (lilla), som alle har den karakteristiske interne genkassette fundet i de to danske humane zoonotiske cases. H1avN1av virus er fordelt i forskellige clusters i det fylogenetiske træ, men et mindre cluster udgøres primært H1avN1av-6 og H1avN1av-7 virus, "H1avN1av-6/7 cluster", med enten den klassiske interne genkassette fra de zoonotiske cases eller en lignende, der inkluderer et M segment af "avian-like swine" H1N1 oprindelse. Et større H1avN1av cluster ses også, "H1avN1av-2

dominerende cluster”, hvori de fleste virus udgøres af H1avN1av-2 genotypen. Øverst i træet ser vi nogle af de ældre H1avNx virus fundet i Europa og Danmark, og en mindre gruppe af forskellige nuværende danske H1avN1av og H1avN2sw virus, som grupperer sig i nærheden af disse ”H1avNx virus, der ligner ældre H1avNx stammer”. I dette område af træet findes den veterinære H1av influenza vaccine stamme fra Respiporc FLU3 (Ceva Animal Health). Denne virus stammer fra 2003 og mange af de danske H1avNx virus ligger genetisk langt fra denne stamme.

H1xN1x fylogeni

Det næste træ indeholder virus, der alle bærer på et NA segment af N1 typen, men af enten ”avian-like swine” H1N1 eller H1N1pdm09 oprindelse, hvilket afspejler sig i opbygningen af træet (Bilag 3a). Øverst i træet ser vi virus med et N1 gen af H1N1pdm09 oprindelse. De to øverste clusters er tydeligt opdelt alt efter om genotypen er H1pdmN1pdm-1 eller H1pdmN1pdm-2, hvilket understreger den samme opdeling i clusters som vi fandt for HA segmentet fra de samme to genotyper, og igen indikerer tilstedeværelsen af to unikke reassortment events. Det næste mindre cluster udgøres af virus, der har et N1pdm gen, der er tæt beslægtet med human sæsoninfluenza, og viser at mennesker til stadighed introducerer deres sæsoninfluenzavirus til danske svinebesætninger. Dette cluster viser også at disse humane sæsoninfluenza virus efterfølgende kan indgå i forskellige reassortment events, da der blandt andet ses to H1avN1pdm virus i dette cluster, som er en blanding af svine influenza virus og NA med oprindelse i human sæsoninfluenza. I den nedre del af træet ses forskellige H1xN1av virus, der også opdeles i unikke clusters. Øverst har vi to clusters, der primært indeholder H1avN1av virus, hvoraf det øverste cluster er tættere beslægtet med udenlandske N1av sekvenser, og den nuværende veterinære N1av vaccine stamme, ”H1avN1av cluster”, mens det andet cluster ligger tættere på det store H1pdmN1av cluster, ”H1avN1av cluster beslægtet med H1pdmN1av virus”. Det store H1pdmN1av cluster nedenunder kan opdeles i to subclusters. Et indeholdende primært H1pdmN1av-2 virus og et indeholdende en blanding af H1pdmN1av-1 (mørk rød) og H1pdmN1av-2 (pink) virus. Der ses dog igen flere undtagelser, hvilket afspejler kontinuerlige reassortment events.

H1xN2sw fylogeni

Virus der bærer et NA gen af N2sw oprindelse afspejler til en vis grad de forskellige clusters observeret i H1avNx træet i forhold til H1avN2sw virus. Der ses igen tre clusters primært indeholdende henholdsvis H1avN2sw-3 (lilla), H1avN2sw-4 (gul) og H1avN2sw-6 (grøn) virus, som igen tyder på unikke reassortment events. H1avN2sw-5 virus findes i alle dele af træet, og det samme gør sig gældende for H1pdmN2sw virus. Det ses igen at den veterinære N2sw vaccine stamme fra 2002 viser stor genetisk forskellighed sammenlignet med størstedelen af de danske N2sw sekvenser påvist i 2022 (Bilag 3b).

Fænotypisk virus karakterisering

HI-test

Ud over den genetiske karakterisering, er der i årets overvågning også udvalgt virusisolater til fænotypisk karakterisering ved brug af HI-test og VNT, for at undersøge deres krydsreaktivitet med sera rejst mod humane eller veterinære vaccine virus stammer. I året overvågning har vi valgt at fokusere på H1pdmNx virusisolater, da disse tidligere har været årsag til zoonotiske cases i Danmark. Resultaterne fra HI-testen kan ses i bilag 4.

Overordnet set viste resultaterne at fritte sera rejst mod H1N1pdm09 stammen inkluderet i den nuværende humane sæson influenza vaccine "A/Sydney/5/2021", havde krydsreagerende antistoffer mod 5/12 H1pdmN1x virus isolater fra danske svin i 2022, og den maksimale titer lå på 40/80. For de resterende virus var der en meget svag/ingen krydsreaktion, og titeren var ikke højere overfor sera rejst mod ældre H1N1pdm09 sæsoninfluenza stammer. Det hyperimmune svineserum rejst mod Respiorc FLUpa H1N1, viste god krydsreaktion til alle H1pdmNx virus isolaterne. Dette kan måske afspejle at dette serum er fremstillet vha. en anden metode, i et andet dyr, og ved brug af en vaccine med adjuvans, da selve vaccinstammen ellers er nærmest identiske med den humane vaccinstamme inkluderet i HI-testen "A/California/07/2009", som viste en lav grad af krydsreaktivitet mod de 12 virusisolater.

VNT

I denne virus neutralisationstest har vi testet i hvilken koncentration tre udvalgte antisera kan fortyndes for at inhiberer 50 % virus infektion med et givet svineinfluenzavirus isolat i MDCK cellekultur. Tre udvalgte antisera blev inkluderet, hvoraf de to første repræsenterer fritte antisera rejst mod den nyligste og den ældste H1N1pdm09 humane sæsoninfluenza vaccinstamme, og den tredje er hyperimmunt svine serum rejst mod den veterinære vaccine Respiorc FLUpa H1N1.

	A/Sydney/5/2021	A/California/07/09	Respiorc FLUpa H1N1
A/swine/Denmark/00009-4/2022	<20	<20	640

Tabel 2. Resultater fra VNT. Horisontalt er angivet de tre antisera (A/Sydney/5/2021, A/California/07/09 og Respiorc FLUpa H1N1) som virus isolatet "A/swine/Denmark/00009-4/2022 er testet overfor. De tre sera er de samme som er anvendt i HI-testen, hvoraf de to første sera er fritesera rejst mod en nylig og en ældre human H1N1pdm09 vaccinstamme og den tredje er hyperimmunt svinesera rejst mod den veterinære vaccine Respiorc FLUpa H1N1.

Indtil videre er resultatet fra virus neutralisationstesten kun klar for én virus af H1pdmN1av-2 genotypen. Det ses ud fra resultatet at antisera rejst mod både den nyligste og den ældste H1N1pdm09 sæson influenza ikke kan hæmme infektionen med A/swine/Denmark/00009-4/2022 i MDCK cellekultur. Dog ses det at der skal en høj fortynding af det hyperimmune svineserum rejst mod den veterinære vaccine Respiorc FLUpa H1N1 til, før at vi ser at virus ikke er i stand til at inficerer 50 % af cellekulturen (Tabel 2).

Samlet analyseoversigt

Tabel 3 viser aktiviteter gennemført i overvågningen af influenza A virus i svin i 2022. Til sammenligning er resultaterne for 2017-2021 angivet. Antallet af indsendelser og prøver i 2022 er faldet i forhold til de seneste tre år, og ligner nu niveauet fra 2018 og tidligere.

Tabel 3. Samlet oversigt over analyser udført i svineinfluenza overvågningen i 2017-2022.

Parameter	2022	2021	2020	2019	2018	2017
Antal indsendelser undersøgt for influenza A virus ^a	487	856	723	586	503	469
Antal prøver Undersøgt for influenza A virus	1617	2895	2512	1906	1469	1090

Antal indsendelser med min. 1 influenza A virus positiv prøve	326	453	400	318	282	240
Antal influenza A virus positive prøver i alt	873	1177	950	751	641	446
Antal prøver testet for H1N1pdm09	873	1177	946	751	641	446
Antal H1pdm09 positive indsendelser ^b	118	189	115	66	62	49
Antal H1pdm09 positive besætninger	103	164	91	60	57	43
Indsendelser subtypet på både HA og NA	254	297	216	139	176	147
Resistens undersøgelser ^c	296	38	26	25	20	27
Partiel karakterisering alle segmenter	89	0	0	0	0	4
Fuld længde sekventering	206	38	26	25	20	23
Fænotypisk karakterisering	12	-	-	-	-	-

^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

Diskussion

Cirkulerende influenza virus i Danmark

Forekomsten af influenza A virus i svin i Danmark er undersøgt systematisk over en periode på 13 år, hvorved der er opnået en dynamisk indsigt i hvilke influenzavirus, der cirkulerer blandt danske svin. Igennem årenes løb har H1avN2sw virus domineret, men de seneste år er der sket et fald i andelen af H1avN2sw virus. Dette er sket samtidig med at vi har haft en markant fremgang i en ny subtype "H1pdmN1av". Dette virus blev første gang detekteret i blot én enkelt indsendelse i 2018, og udgør nu næsten en tredjedel af alle de subtypede indsendelser, hvilket indikerer, at netop dette virus har en særlig fordel i den danske svinpopulation. I 2019 blev de første fire H1pdmN1av virus genotyperet, hvilket viste at de interne gensegmenter alle var af H1N1pdm09 oprindelse, og det samme sås i 2020. Sidste år viste genotypnings resultaterne dog en ny intern genkonstellation. Denne nye H1pdmN1av reassortant havde alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS segmentet, som var af "avian-like swine" H1N1 oprindelse. Netop denne nye reassortant gav anledning til Danmarks anden zoonotiske case i november 2021. I de foregående år har målet være at genotype cirka 20 danske svine influenza A virus, men i år var målet at alle influenza positive indsendelser skulle forsøges genotyperet. Dette lykkedes i høj grad, og i alt 206 virus er blevet genotyperet, og har afsløret interessante udviklinger og nye genotyper, vi ikke før har identificeret. Den massive genotypning har tilmed vist at den "nye" H1pdmN1av reassortant, der ligner den anden zoonotiske case i Danmark, er dominerende og udgør 80 % af de H1pdmN1av genotyperne. Dette resultat viser klart, at det tidligere beskedne antal prøver til genotypning, har været for lille til at følge udviklingen på mere end et overordnet plan. Et andet meget interessant resultat af årets massive genotypning er, at flere danske svine influenza virus indeholder en lignende intern genkassette, som er lig den der er identificeret i begge de zoonotiske danske cases. Dette gælder ikke kun virus med overflade

gener af H1N1pdm09, men også vores "ældre" danske enzootiske virus H1avN2sw og H1avN1av. Dette kan igen tyde på at netop denne kombination af interne gener, er en fordel for virus. Den eksakte mekanisme bag dette er ukendt, men kunne have relation til immunresponset, da NS genet, som er unikt i denne interne genkassette, normalt er involveret i at modulere værtens immunrespons mod influenza infektion. Derudover kan kombinationen af interne gener potentielt have betydning for effektiviteten af replikationen i værten og transmission mellem værter.

Der er igen i 2022 påvist virus med gensegmenter af human sæson influenza oprindelse. Dette gælder både segmenter fra den nuværende H1N1pdm09 sæsoninfluenza, men også et ældre "N2hu95" gensegment, som til stadighed cirkulerer i den danske svinepopulation. Introduktionen af de nylige pandemiske gener understreger at der hvert år introduceres nye humane gensegmenter eller fulde virus i den danske svinepopulation, hvor de kan indgå i nye reassortants og undergå konstant evolution, hvilket skaber nye potentielle zoonotiske virus. Virus hvor gener af H1N1pdm09 oprindelse er særligt bekymrende da vi ved at disse virus før har haft den egenskab at kunne inficere mennesker, og har ledt til to zoonotiske cases i 2021. Derudover er det også problematisk at der cirkulerer virus indeholdende ældre humane sæson influenza segmenter, da der vil være en større og større del af befolkningen, der ikke har mødt disse virus før og dermed ikke er fuldt beskyttet, hvis virus skulle springe fra svin til mennesker.

Også i år, er der 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, afspejler at flere 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 cirka en tredjedel af disse besætninger får introduceret nye subtyper og understreger derved også den ovenstående problematik.

Der er i år ikke påvist nogle virus af H3huN2sw subtypen, hvilket er fordelagtigt, da virus af denne type kan være bekymrende af flere 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. Der skal dog tages højde for at der i år har været en nedgang på 40 % i antallet af indsendelser, og det dermed er svære at detektere virus af lav prævalens. Inklusionen af projektprøverne til genotypning fra yderligere 97 indsendelser, har dog heller ikke vist tegn på tilstedeværelsen af H3huN2sw typen.

Veterinære aspekter

I 2022 sket et markant fald (40 %) i antallet af indsendelser til overvågningsprogrammet i forhold til 2021. Dette skyldes formentlig flere faktorer. For det første er DTU veterinærinstituttet lukket og modsat tidligere år, er der ikke modtaget indsendelser herfra. For det andet har medicinal firmaet Ceva Animal Health, som sponsorerer en stor del af indsendelserne, nedsat antallet af gratis indsendelser for dyrlægerne. Tilmed er

flere dyrlægepraksis begyndt rutinemæssigt at screene deres besætninger for forskellige luftvejspatogener, heriblandt influenza, en gang om året, hvilket kan betyde færre indsendelser til overvågningen. Sidst men ikke mindst er der specifikke dyrlægepraksis, som sender deres diagnostiske prøver fra svin til udlandet for at opnå en mere fordelagtig pris, hvilket yderligere nedsætter antallet af prøver til den nationale svineinfluenza overvågning. Det lave antal indsendelser og den markante nedgang er et problem for svineinfluenza overvågningen, da andelen af undersøgte besætninger bliver lavere, og dermed stiger usikkerheden i tendenserne observeret i overvågningen. En lavere stikprøvestørrelse gør, som nævnt tidligere, også, at det bliver sværere at påvise lav-prævalente virus.

Der er i år sket en markant stigning i andelen af influenza positive indsendelser, som nu ligger på et niveau på 67 % af alle indsendelserne. Dette afspejler enten en markant reel stigning i influenza smittede besætninger, evt. grundet virus med forbedret transmission. Det kan også afspejle at dyrlægerne har været mere selektive i hvilke besætninger, de har indsendt prøver fra, grundet det lavere antal af gratis indsendelser sponsoreret af Ceva Animal Health, og dermed har valgt besætninger med tydelig klinik forårsaget af influenza infektion. Sammenholdt med at hovedparten af indsendelserne til overvågningen er fra besætninger med kliniske respirationsvejssymptomer, understreger den høje andel af positive indsendelser, at influenzavirus hos svin har signifikante sundhedsmæssige og velfærdsmæssige konsekvenser i besætningerne.

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. De 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 27 % 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 det nye 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 swine" og 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. Resultatet fra det ene isolat, der er kørt i VNT viser at det hyperimmune serum rejst mod svineinfluenza vaccinen Respiporc FLUpan H1N1 er i stand til at forhindre vækst af dette specifikke H1pdm09N1av virus i celler.

Zoonotiske aspekter

På trods af et mindre fald, udgør andelen af positive indsendelser med tilstedeværelse af H1pdm09 36 % af alle de influenza positive indsendelser. Dette er til stadighed bekymrende, da vi ved, at virus med H gen af

H1N1pdm09 oprindelse er i stand til at inficere mennesker, hvilket blev eksemplificeret to gange i 2021. 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 udkonkurrere den danske H1avN2sw, som har været dominerede i Danmark siden overvågningsens start. Dette er bekymrende ud fra et folkesundhedsperspektiv, da netop et virus med denne subtype gav anledning til det andet humane zoonotiske tilfælde 2021. Endvidere har eksperimentelle infektioner KU har udført i projektet FluZooMark⁸ vist, at begge genotyper af H1pdmN1av-1 virus effektivt kan inficere fritter, og H1pdmN1av-1 genotypen viste sig også at kunne spredes via aerosoler mellem fritterne (manuskript under forberedelse). Tilmed har årets overvågning inkluderet en fænotypisk karakterisering af specifikke H1pdmN1x virus isolater, som har vist en meget begrænset eller manglende krydsreaktion til de nuværende humane tilgængelige H1N1pdm09 vacciner både i HI-test og VNT. Dette bekræftes yderligere af den store genetiske diversitet, der observeres mellem humane sæson influenza virus, og vores to store clusters "svineadapteret H1pdmN1pdm/N1av/N2sw cluster" og "H1pdmN1av-1/2 dominerende cluster". Derfor bør både H1pdm09N1av og svineadapteret H1N1pdm09 virus være i hovedfokus, når vi skal vurdere risiko for human smitte.

Lig sidste år, ser vi en yderligere stigning i virus, der indeholder et NS segment af "avian-like swine" oprindelse. Der har ellers tidligere været en formodet nedgang i virus, der havde interne gener af "avian-like swine" oprindelse. I år er det meget tydeligt at en intern kassette med alle gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS genet af avian-like H1N1 oprindelse er i fremgang. Tilmed ses denne interne kassette nu udtrykt i en genotype i alle de subtyper, der er påvist i overvågningen i år. Dette indikerer at netop denne interne kassette er en fordel for virus, og understreger at reassortment event sker jævnlige i de danske svinebesætninger, siden denne interne kassette er udbredt inden for alle subtyper. Den store mængde af virus genotypet i år er hovedårsagen til at vi har gjort dette vigtige fund, og kan arbejde videre med at forstå, hvordan virus bærende denne interne kassette har en fordel ude i besætningerne. Samtidig er det vigtigt at huske at netop denne interne kassette også var tilstede i begge de zoonotiske cases i 2021, og derfor kan det også spille en vigtig rolle for virus zoonotiske potentiale, og disse virus bør undergå flere fænotypiske tests for at kortlægge deres replikation, transmission og interaktion med immunforsvaret. Det store antal genotypedede virus i 2022, har også givet et bedre billede af hvilke genetiske markører, vi har tilstede i de danske svineinfluenza virus i forhold til tidligere år, hvor dette var baseret på et meget snævert udvalg af virus. I år har vi været i stand til at påvise otte virus, som havde alle fire PA mutationer, som tidligere har været relateret til øget transmission og patogenicitet i fritter, som er model for human influenza infektion. På baggrund af disse undersøgelser, blev et af de otte virus udvalgt til virus isolation, og det er lykkedes at opnå et virusisolat, som kan anvendes til at teste om dette virus har lignende egenskaber. Derudover har vi identificeret et stort antal af virus der indeholder før beskrevne NP-mutationer, som også kan have betydning for virus zoonotiske potentiale, da de koder for Mx1 resistens. Mx1 er et antiviralt protein, der findes i pattedyr inklusiv mennesker, og som spiller en vigtig rolle i bekæmpelse af influenza infektioner. Virus bærende disse mutationer bør også udvælges til flere fænotypiske test. Vi har endvidere undersøgt NS1 generne for at kortlægge oprindelsen og trunkeringen af disse. Da de to zoonotiske cases havde forskellig længde af NS1 genet, kan svinevirus lignende disse være potentielle kandidater til at teste for deres zoonotiske potentiale. Der ses tydelige mønstre i hvilke virus,

⁸ <https://fluzoomark.dk/>

der bærer hvilke typer af NS1 gener, og det må derfor være have en betydning for de forskellige genotyper. Yderligere undersøgelser bør foretages for at undersøge dette i dybden.

Selvom vi kun har set zoonotiske tilfælde med H1pdmNx virus i Danmark, bør vi også holde øje med H1avNx virus, da netop disse virus har ledt til flere zoonotiske tilfælde i Europa i 2020/2021. Holland, Tyskland og Frankrig har reporteret om human smitte med en "avian-like swine" H1avNx virus med oprindelse i svin. Disse virus er nært beslægtet med de "avian-like swine" 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 swine" 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 overvåges for smitte med svinespecifikke virus.

Konklusion

Overvågningen i 2022 har fungeret hensigtsmæssigt med henblik på at identificere influenza A virus med nye gensammensætninger og at følge udviklingen, selvom prøvestørrelsen i år er faldet markant. Dette fald i indsendelser er bekymrende, da det øger risikoen for at fundet af nye virus, der langsomt gør fremgang eller har en genkombination, som gør dem til høj-risiko virus, veterinært eller humant. 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 og genotyper, 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 udkonkurrere H1avN2sw. Derudover indeholder H1pdm09N1av gener fra virus, der tidligere har kunne inficere mennesker, og vi havde i 2021 også haft en zoonotisk infektion med et virus af netop denne subtype.

Helt generelt kan vi på baggrund af genotypningen dokumentere, at gener fra H1pdm09 virus ("pandemiske gener") stadig er vidt udbredt i de danske virus, men at en ny genkonstellation bestående af virus med alle interne gener af H1N1pdm09 oprindelse på nær NS segmentet, som er af "avian-like swine" H1N1 oprindelse vinder indpas, og nu findes i alle de cirkulerende subtyper, vi har identificeret i 2022. Dette er bekymrende, da begge de zoonotiske virus fra 2021 havde denne genkonstellation. Tilsammen er data fra genotypningen 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 grundige karakterisering af influenza virus i den danske svine population, betydet at vi hurtigt kunne opspore ophavet til virus i de to humane zoonotiske tilfælde i den danske svinepopulationen. Derudover gør denne karakterisering det muligt at være forberedte, hvis en specifik virus pludselig øges i prævalens, og der er behov for genetiske analyser for at afdække hvilke ændringer, der er sket over tid, som kunne forklare fremgangen. Samtidig muliggør genotypningen en mere pålidelig analyse af prævalensen 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.

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 dog nedslående at der i år er sket et stort fald i antallet af indsendelser til overvågningen. Genotypning af projektprøverne har sikret et større prøveantal, men det er usikkert om dette kan fortsætte i fremtiden. Det er vores vurdering at influenza diagnostikken i Danmark ikke som sådan er faldende, men bare foretages på andre udenlandske laboratorier, for at nedsætte analyseprisen. I fremtiden kan det være nødvendigt at finde løsninger for at beholde disse prøver på danske laboratorier, så prøveresultaterne kan inkluderes i overvågningen, for at sikre at vi ikke står på ukendt land i forhold til karakteriseringen af de cirkulerende danske svine influenza virus. Alt i alt, kan det dog stadig 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, og tillige bidrager med viden der skal bruges såfremt der opstår zoonotiske tilfælde.

Bilag 1. Oversigt over danske genotyper

Hver subtype fundet i Danmark er repræsenteret med fed skrift, og nedenunder angives de detekterede genotyper identificeret i overvågningen siden 2011. Hvert gensegment er angivet med en farve og en forkortelse, der beskriver oprindelsen af det enkelte segment. "av" står for "avian-like swine" H1N1 oprindelse, "pdm" står for H1N1pdm09 oprindelse, "sw" står for svine H3N2 oprindelse, og "hu#" står for human sæson influenza oprindelse og den givne sæson angivet i tal.

Genotyper

H1avN2sw

	HA	NA	PB2	PB1	PA	NP	M	NS
H1avN2sw-1	av	sw	av	av	av	av	av	av
H1avN2sw-2	av	sw	av	av	av	av	pdm	av
H1avN2sw-3	av	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	av
H1avN2sw-4	av	sw	pdm	av	pdm	pdm	pdm	pdm
H1avN2sw-5	av	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
H1avN2sw-6	av	sw	av	av	av	pdm	av	av
H1avN2sw-7	av	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	av	av
H1avN2sw-8	av	sw	av	pdm	pdm	pdm	pdm	av

H1avN1av

H1avN1av-1	av	av	av	av	av	av	av	av
H1avN1av-2	av	av	av	av	av	av	pdm	av
H1avN1av-3	av	av	av	av	av	pdm	av	av
H1avN1av-4	av	av	pdm	pdm	pdm	pdm	av	pdm
H1avN1av-5	av	av	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
H1avN1av-6	av	av	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	av
H1avN1av-7	av	av	pdm	pdm	pdm	pdm	av	av

H1avN2hu95

H1avN2hu95-1	av	hu95	av	av	av	av	av	av
H1avN2hu95-2	av	hu95	av	av	av	av	pdm	av
H1avN2hu95-3	av	hu95	av	av	av	av	pdm	pdm
H1avN2hu95-4	av	hu95	pdm	pdm	pdm	av	av	av
H1avN2hu95-5	av	hu95	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm

H1avN1pdm09

H1avN1pdm-1	av	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
H1avN1pdm-2	av	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	av
H1avN1pdm-3	av	pdm	av	av	av	av	av	av

H1pdmN1pdm

H1pdmN1pdm-1	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
H1pdmN1pdm-2	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	av

H1pdm09N2sw

H1pdmN2sw-1	pdm	sw	av	av	av	av	av	av
H1pdmN2sw-2	pdm	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	av	pdm
H1pdmN2sw-3	pdm	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
H1pdmN2sw-4	pdm	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	av

H1pdm09N1av

H1pdmN1av-1	pdm	av	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
H1pdmN1av-2	pdm	av	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	av

H1pdmN2hu95

H1pdmN2hu95-1	pdm	hu95	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
---------------	-----	------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

H3hu05N2sw

H3hu05N2sw-1	hu05	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
--------------	------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

H3hu16N2sw

H3hu16N2sw-1	hu16	sw	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm	pdm
--------------	------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

H3huN2hu

H3huN2hu-1	hu	hu	hu	hu	hu	hu	hu	hu
------------	----	----	----	----	----	----	----	----

H3swN2sw

H3swN2sw-1	sw	sw	av	av	av	av	av	av
------------	----	----	----	----	----	----	----	----

Bilag 2a. H1pdmNx virus fylogeni

Maximum likelihood fylogenetisk træ af 2022 H1N1pdm09 H1 nukleotid sekvenser fra fuldt genotypedede virus og virus, hvor kun HA og NA er karakteriseret. Derudover indgår forskellige danske og udenlandske reference stammer fra svin og mennesker.

Index:

H1pdmN1av-1 (rød)

H1pdmN1av-2 (pink)

H1pdmN1pdm-1 (grøn)

H1pdmN1pdm-2 (blå)

H1pdmN2sw-3 (orange)

H1pdmN2sw-4 (turkis)

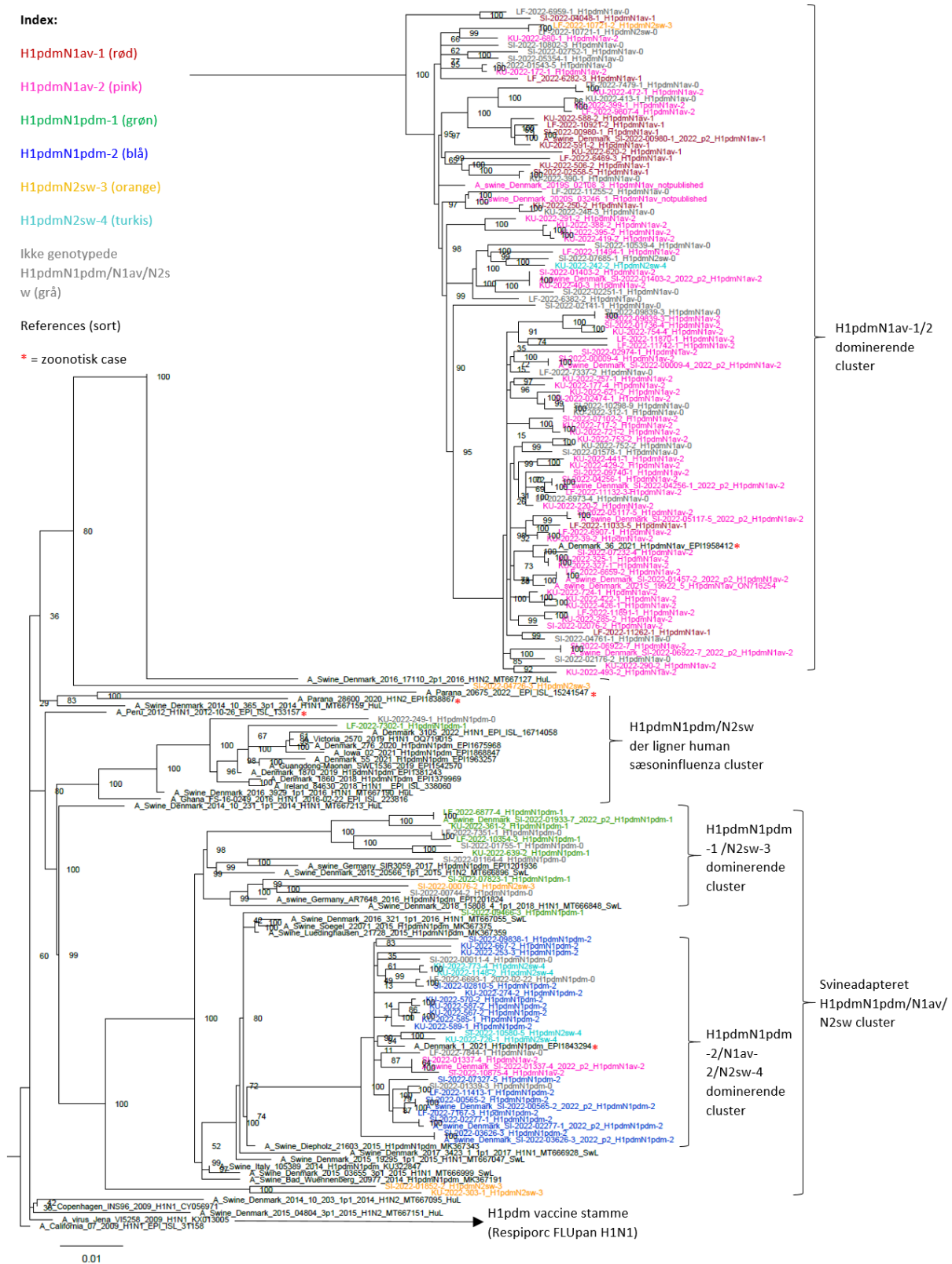
Ikke genotypedede

H1pdmN1pdm/N1av/N2sw

w (grå)

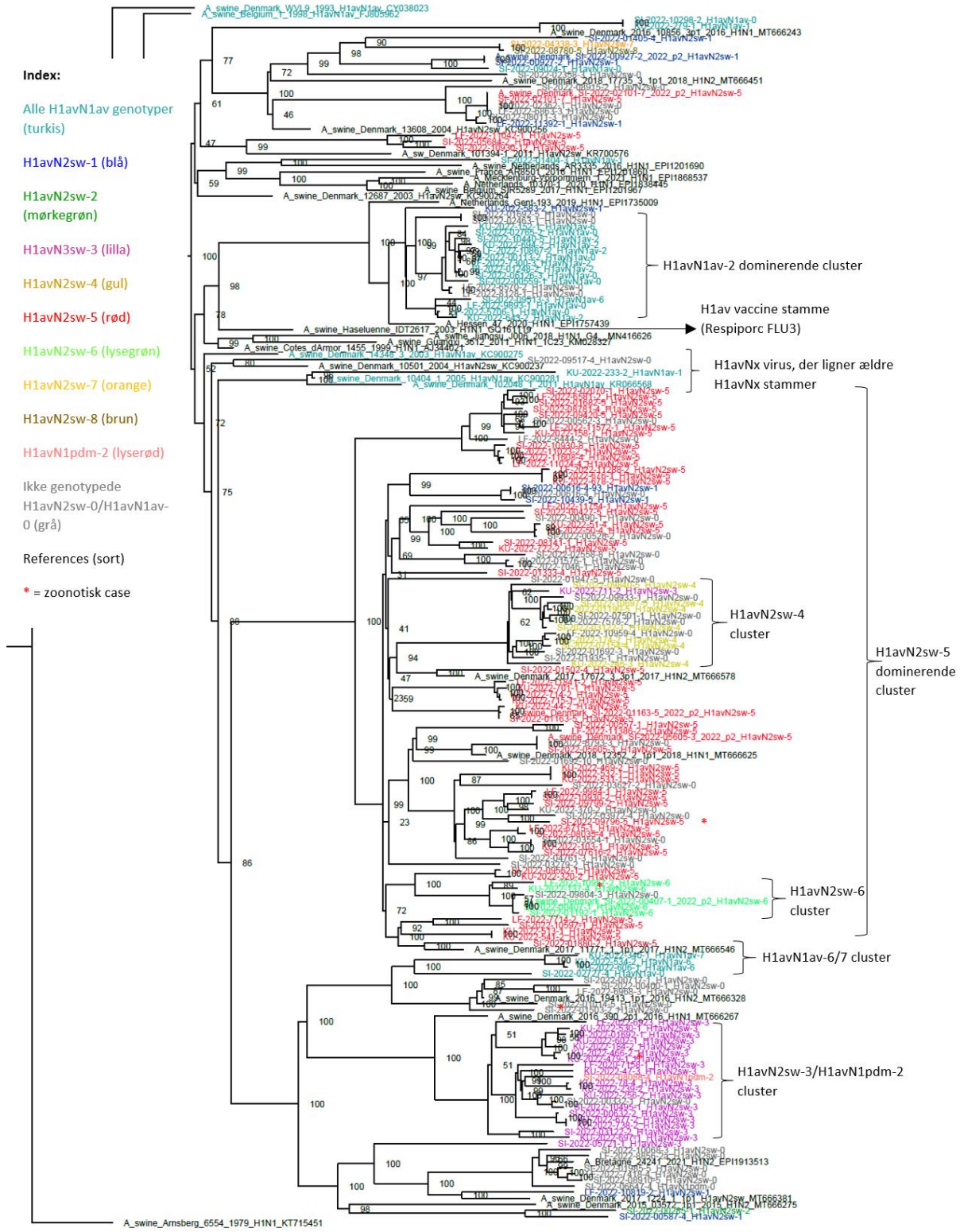
References (sort)

* = zoonotisk case



Bilag 2b: H1avNx virus fylogeni

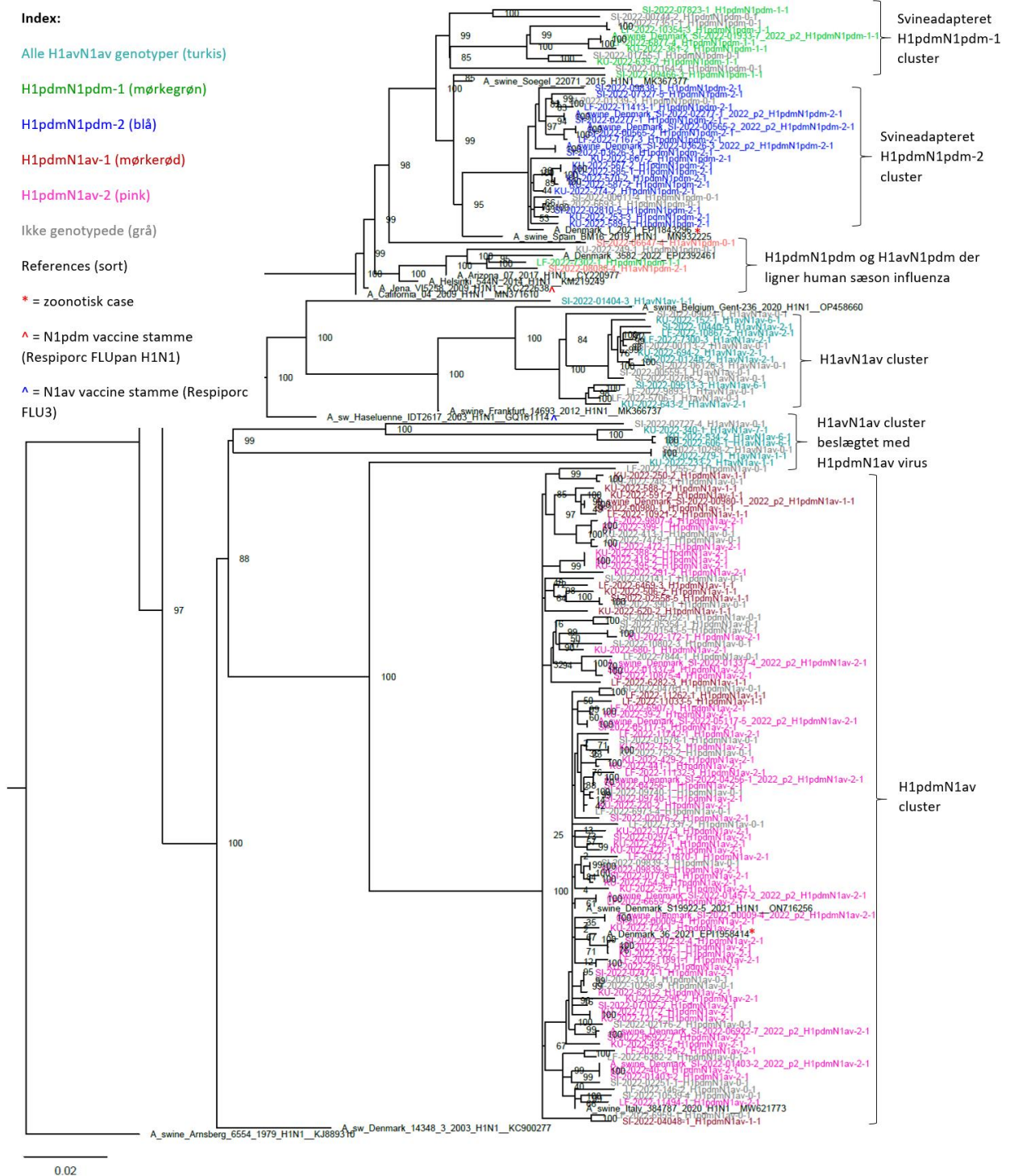
Maximum likelihood fylogenetisk træ af 2022 "avian-like" H1 nukleotid sekvenser fra fuldt genotyperede virus og virus, hvor kun HA og NA er karakteriseret. Derudover indgår forskellige danske og udenlandske reference stammer fra svin og mennesker.



0.02

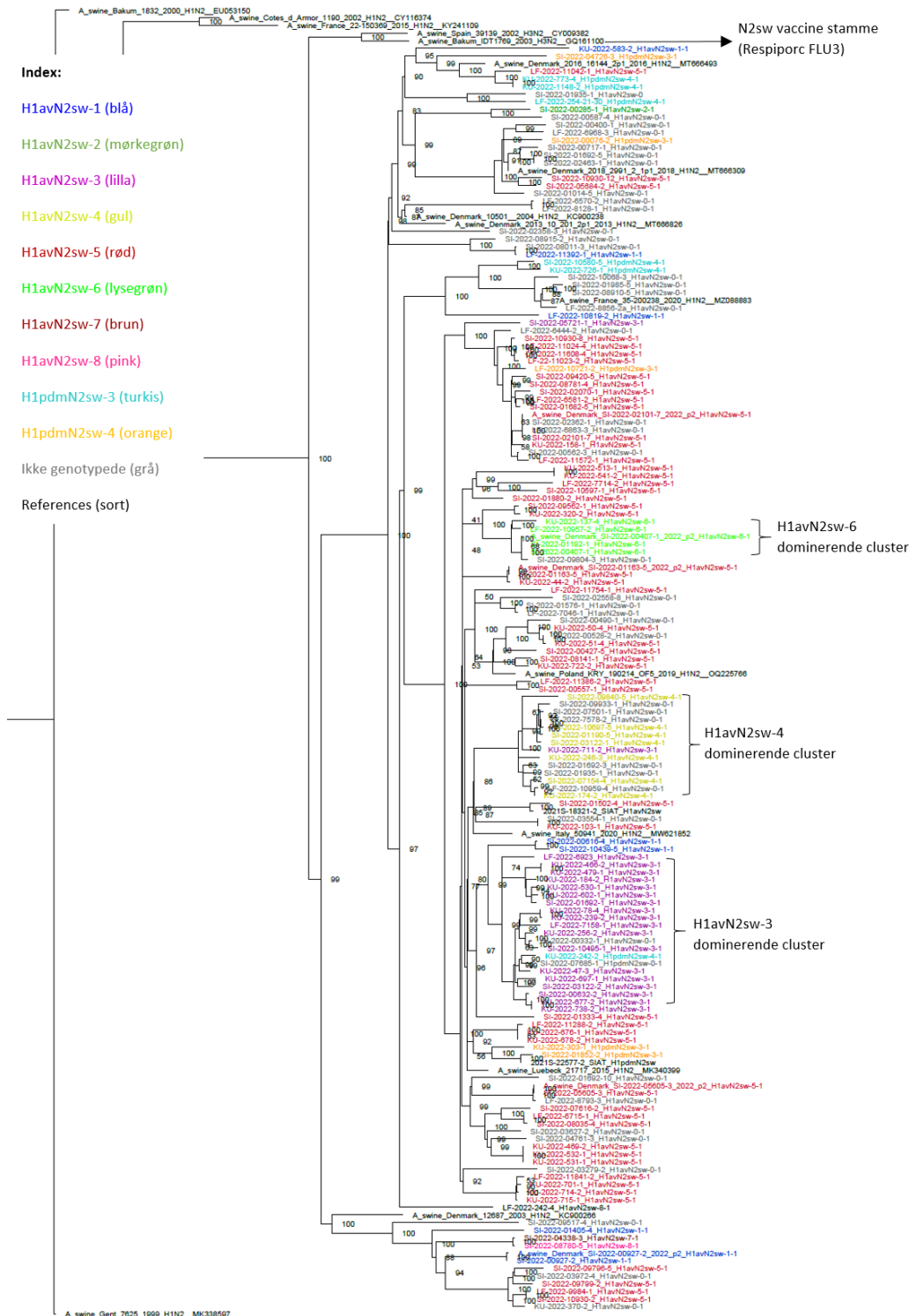
Bilag 3a. HxN1x virus fylogeni

Maximum likelihood fylogenetisk træ af 2022 N1 nukleotid sekvenser af både "avian-like" og H1N1pdm09 oprindelse fra fuldt genotypedede virus og virus, hvor kun HA og NA er karakteriseret. Derudover indgår forskellige danske og udenlandske reference stammer fra svin og mennesker.



Bilag 3b. HxN2x fylogeni

Maximum likelihood fylogenetisk træ af 2022 N2sw nukleotid sekvenser fra fuldt genotypedede virus og virus, hvor kun HA og NA er karakteriseret. Derudover indgår forskellige danske og udenlandske reference stammer fra svin og mennesker.



0.03

Bilag 4. Resultater fra HI-test af H1pdm09Nx virus isolater

Herunder ses resultatet for HI-testen af 12 danske H1pdmNx virus isolater fra 2022 testet for krydsreaktion med fritte antisera rejst mod nuværende og tidligere humane H1N1pdm09 sæson influenza stammer, samt svineserum rejst mod den veterinære vaccine RespiPorc FLUpan H1N1pdm09, der indeholder en H1N1pdm09 virus stamme. Tallet angiver antistoftiteren i det pågældende sera mod den pågældende virus. En minimumstiter på 40 er ønsket for at opnå en vis grad af beskyttelse.

Fritte H1N1pdm09 vaccine antisera mod human H1N1pdm09 sæsoninfluenza

Svine H1N1pdm09 vaccine hyperimmunt sera

	Fritte H1N1pdm09 vaccine antisera mod human H1N1pdm09 sæsoninfluenza					Svine H1N1pdm09 vaccine hyperimmunt sera
	A/Sydney/5/2021	A/Victoria/2570/2019	A/Brisbane/02/2018	A/Michigan/45/2015	A/California/07/2009	RespiPorc FLUpan H1N1
A/swine/Denmark/00009-4/2022 (H1pdmN1av-2)	20	20	20	NEG	20	320
A/swine/Denmark/00565-2/2022 (H1pdmN1pdm-2)	20	20	20	NEG	20	80/160
A/swine/Denmark/00980-1/2022 (H1pdmN1av-1)	20	20	20	NEG	20	320
A/swine/Denmark/01337-4/2022 (H1pdmN1av-2)	20	20	20	NEG	20	160/320
A/swine/Denmark/01403-2/2022 (H1pdmN1av-2)	20	NEG	NEG	NEG	NEG	40/80
A/swine/Denmark/01457-2/2022 (H1pdmN1av-2)	40	40	40	NEG	NEG	320
A/swine/Denmark/03626-3/2022 (H1pdmN1pdm-2)	20	20	20	NEG	20	160/320
A/swine/Denmark/02277-1/2022 (H1pdmN1pdm-2)	NEG	NEG	20	NEG	NEG	160
A/swine/Denmark/01933-7/2022 (H1pdmN1pdm-1)	40	40	20	20	20	80
A/swine/Denmark/05117-5/2022 (H1pdmN1pdm-2)	40	40	20	20	20	80/160
A/swine/Denmark/04256-1/2022 (H1pdmN1av-2)	40	40/80	20	20/40	20	80/160
A/swine/Denmark/06922-7/2022 (H1pdmN1av-2)	40/80	40/80	20/40	20/40	20/40	640/1280
A/Victoria/2570/19 3.MDCK (human H1N1pdm09)	2560	1280	80	160	20/40	1280

Human sæson H1N1pdm09 kontrol Danske svine H1pdmNx isolater fra 2022

Bilag 5a. Geografisk fordeling af positive og negative indsendelser 2022

Eftersendes

Bilag 5b. Geografisk fordeling af H1pdm09 virus i de positive indsendelser 2022

Eftersendes

Bilag 5c. Geografisk fordeling af subtyper 2022

Eftersendes