

Technical University of Denmark



Overvågning af influenza A virus i svin - Slutrapport 2016

Krog, Jesper Schak; Hjulsager, Charlotte Kristiane; Larsen, Lars Erik

Publication date:
2017

Document Version
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

Citation (APA):
Krog, J. S., Hjulsager, C. K., & Larsen, L. E. (2017). Overvågning af influenza A virus i svin - Slutrapport 2016. Frederiksberg C: Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet.

DTU Library
Technical Information Center of Denmark

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Overvågning af influenza A virus i svin

Offentlig anonymiseret udgave

SLUTRAPPORT 2016



Jesper Schak Krog
Charlotte Kristiane Hjulsager
Lars Erik Larsen

2. udgave

Forord

Denne rapport beskriver resultaterne af overvågning af influenza i svin i Danmark i 2016 og sammenholder resultaterne med dem fra de foregående år og udenlandske studier. Laboratorieundersøgelser og databehandling er udført på DTU Veterinærinstituttet. Indledende screening af prøver for tilstedeværelsen af influenza A virus er betalt af indsenderne, mens de øvrige analyser er finansieret af FVST's overvågningsprogram. Slutrapporten er den endelige opgørelse af analyserede indsendelser for det pågældende år. Der kan være mindre afvigelser mellem slutrapport og kvartalsrapporterne, sfa. 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 HA og NA generne, der bestemmer subtypen af influenzavirus, er det vigtigt også at kende de øvrige såkaldte interne gener, da disse er med til at bestemme virulens og værtsspecificitet af et givent influenzavirus. For at kunne karakterisere alle gensegmenterne fra et virus er det mest optimalt at udføre sekvensanalyse på et dyrket virus isolat, da primær materialet (væv, spyt og næsesvabere) potentielt kan indeholde flere forskellige virus, og det da ikke kan afgøres hvordan sekvenser fra segmenterne "hører sammen".

Hvis to influenzavirus inficerer den samme celle samtidigt, kan et ny virus opstå ved at de 8 gensegmenter kombineres på en ny måde i virusafkommet fra den pågældende celle. Et sådant virus kaldes et reassortment.

For at lette læsningen af rapporten vil der i det følgende gives en beskrivelse af de influenzatyper og gensegmenter rapporten indeholder. Denne nomenklatur vil blive benyttet konsekvent gennem rapporten.

H1N1 "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.

H3N2 "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" swine H1N1. Dette virus blev påvist første gang i Danmark i 1990.

H1N2 "H1N2dk". Virus med det samme "avian-like" swine H1 og "avian-like" swine interne gener, men med N2 fra dansk svine H3N2. Dette blev påvist første gang i Danmark 2003.

H1N1pdm09 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.

<u>H1pdm09</u>	Virus med det specifikke HA fra H1N1pdm09.
<u>H1</u>	HA gen fra avian-like H1N1.
<u>N2sw</u>	NA gen fra ”swine” H3N2 og H1N2dk.
<u>N2hu</u>	NA gen beslægtet med NA-genet i H3N2 humant sæson virus, der cirkulerede i mennesker i midten af 90’erne.
<u>H3hu#</u>	HA gen beslægtet med HA-genet fra den humane sæsoninfluenza H3N2 # angiver det årstal genet er observeret i mennesker. Det er forskelligt fra HA genet i svine H3N2.

INDHOLDSFORTEGNELSE

Forord	3
Definitioner	3
Opsummering og konklusion	6
Formål	10
Resultater.....	11
Indsendelser.....	11
Indsendelser med påvist influenza A virus	12
Svineinflenzavirus subtyper	12
Svineinflenzavirus reassortments	15
Resistens og virulens markører	16
Samlet analyseoversigt.....	16
Diskussion	18
Veterinære aspekter.....	18
Zoonotiske aspekter.....	20
Materialer og metoder	21
Bilag 1a. HA fylogeni	22
Bilag 1b	23
Bilag 2a. NA fylogeni	24
Bilag 2b	25
Bilag 3. Fuld genom data	26
Bilag 4. Geografisk fordeling af positive og negative indsendelser	29
Bilag 5. Geografisk fordeling af H1N1pdm09 virus.....	30
Bilag 6. Geografisk fordeling af subtyper	31

Opsummering og konklusion

Der er i 2016 gennemført en systematisk, prospektiv, passiv overvågning af cirkulerende influenzavirus subtyper i danske svin. Det overordnede formål med overvågningen var at identificere hvilke influenzavirus subtyper og stammer, der cirkulerer blandt danske svin, og at kortlægge sygdomsårsager i svinepopulationen med henblik på at sikre det strategiske mål: at mindske antibiotikaforbruget i danske svinebesætninger.

Overvågningen bestod i:

- 1) Undersøgelse for influenzavirus vha. pan-influenza A virus real time RT-PCR på brugerbetalte diagnostiske indsendelser til influenzavirusundersøgelse på DTU-VET
- 2) Test af influenzavirus positive prøver for pandemisk H1N1 (H1N1pdm09) ved real time RT-PCR der specifikt detekterer HA-genet i H1N1pdm09 virus
- 3) Implementering af ny metode til subtypning af influenza, baseret på real time PCR i stedet for sekventering.
- 4) Subtypning af indsendelser ved real time PCR (HA og NA generne)
- 5) Isolation af virus i MDCK celler
- 6) Komplet genom karakterisering af udvalgte virusisolater

Der blev totalt i 2016 iværksat undersøgelse for influenza A virus på 1115 prøver fordelt på 480 indsendelser fra 388 besætninger. I alt havde 227 (47 %) af indsendelserne minimum en positiv prøve, disse repræsenterede 204 forskellige besætninger. Indsendelserne fordelte sig over hele landet og over hele året. Der var flest indsendelser til undersøgelse i vinterhalvåret, men influenza virus blev påvist med næsten samme hyppighed hele året.

I alt blev 176 influenzavirus positive indsendelser subtypet vha. real time RT-PCR. Disse analyser viste, at de to mest almindelige subtyper i danske svin i 2016 var den danske variant af H1N2 og H1N1pdm09. Prævalensen af det almindelige svineinflenzavirus ”avian-like swine” H1N1 var ligesom i 2014 og 2015 meget lav. Det influenzavirus af subtypen H3N2, der har cirkuleret i Danmark siden 1990, men med meget lav prævalens de senere år, blev ligesom i 2015 ikke påvist i 2016. Den centraleuropæiske variant af H1N2, der har et human-like HA gen, er stadig ikke påvist i danske svin.

Virus med subtypen H1pdm09 blev påvist i 52 indsendelser fra 48 besætninger og udgjorde således 23 % af de influenzavirus positive indsendelser. Dette er på niveau med 2014 og 2015. Hos mennesker dominerede H1N1pdm09 i 2015/16 sæsonen mens human sæson H3N2 dominerede 2016/17 sæsonen.¹

Det humane N2 gen, der tidligere har været påvist i svin, blev ikke påvist hvilket betyder at subtyperne H1N2hu og H1pdm09N2hu ikke blev påvist i 2016. Til gengæld er H3huN2sw med

¹ <http://www.ssi.dk/Aktuelt/Nyhedsbreve/INFLUENZA-NYT.aspx>

et humant H3 fra 2005 blevet påvist igen i 2016 i tre besætninger. Dette virus blev første gang påvist i 2013. Ydermere er der i 2016 også fundet en ny variant af H3huN2sw, med HA der svarer til den samtidigt cirkulerende H3 influenza (sæson 2015/16), hvor vi tidligere kun har påvist H3hu fra sæson 2004/05. Det interessante ved dette virus er, at det er en triple-reassortment, hvor alle de interne gener stammer fra H1N1pdm09 subtypen, mens N2 stammer fra H3N2/H1N2 fra svin, og H3 er af human oprindelse. Da det humane H3 gen har cirkuleret i mennesker siden 1968, må det formodes, at der er stor grad af immunitet i den humane population mod denne type. Derimod må det formodes, at hele den danske svinepopulation vil være fuldt modtagelige, da prævalensen af H3 virus har været meget lav i Danmark de senere år. Tilmed viser undersøgelser, at antistoffer dannet mod de kommercielle vacciner, der anvendes i Danmark, har meget begrænset krydsreaktion til dette virus.

Resultaterne fra overvågningen er vigtige i forhold til såvel zoonotiske som veterinære aspekter ved influenza A virus infektion i svin i Danmark. Undersøgelserne 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 influenzavirus-sæson. Overvågningen har endvidere påvist adskillige nye virus reassortments, hvor gener fra H1N1pdm09 indgår. Bl.a. tyder det på, at H1N2 virus med interne gener fra H1N1pdm09 har etableret sig i den danske svine population. Der er global bevågenhed omkring svineinflenzavirus med interne gener fra H1N1pdm09, da der i flere tilfælde er vist smitte med sådanne virus til mennesker, fx H3N2v i USA. Overvågningen har bidraget til, at vi tidligt har påvist nye virus med zoonotisk potentiale: H3hu05N2sw og H3hu16N2sw. Dette betyder, at der kan foretages en nærmere genetisk og biologisk karakterisering af dette virus, hvilket kan danne evidens-baseret baggrundsviden for risikohåndteringen, i det tilfælde at der konstateres human smitte med dette virus. Den fremtidige overvågning vil bl.a. have fokus på at undersøge, om disse virus bliver etableret i danske svin.

Fra et veterinært synspunkt er det vigtigt at få fastlagt hvilke(n) subtype(r), der cirkulerer i en besætning, da valg af vaccine er afhængig af denne information. Det er derfor positivt, at der, trods et lille fald i år, over de senere år er sket en stigning i antal indsendelser til influenzapåvisning i Danmark, da det øger muligheden for at vaccinere korrekt og derved nedbringe risikoen for antibiotikakrævende sekundære infektioner. Det er også positivt at den H1N2 subtype (med human-like HA-gen), der er dominerende i andre dele af Europa, stadig ikke findes i Danmark. Introduktion af dette virus kan frygtes at få epizootisk karakter, da immuniteten i populationen mod dette virus forventes at være meget lille.

Det kan konkluderes, at den iværksatte overvågning har givet et godt indblik i hvilke influenza A virus, der cirkulerer i danske svin, og at denne information dagligt bruges proaktivt ved håndtering af sygdom i danske svinebesætninger. Overvågningen har endvidere vist, at virus med nye gen kombinationer er blevet etableret i danske svin, og der bør de kommende år holdes øje med, om disse virus smitter til mennesker.

Indledning

Influenza i dyr udgør en trussel mod dyresundheden, dyrevelfærden, produktionsøkonomien, fødevareresikkerheden og har givet anledning til flere pandemier i mennesker. 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 indenfor det veterinære område implementeres effektive systemer til overvågning og karakterisering af influenzavirus i relevante dyrearter. Det danske overvågningsprogram for influenza i svin bygger på anbefalinger vedr. overvågning for influenza beskrevet af OIE², FAO³ samt EFSA⁴.

Der er globalt identificeret utallige varianter af forskellige cirkulerende svineinfluenza subtyper (kombinationer af HA og NA gener). I Europa og Danmark cirkulerer, der for tiden flere forskellige subtyper, der kan betragtes som enzootiske. Herudover er der adskillige rapporter om sporadiske fund af andre 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 indgå i nye influenzavirus, som potentielt kan smitte mennesker.

Influenza er en almindelig sygdom blandt svin i Danmark, idet mere end 90 % af danske svinebesætninger har influenza antistofpositive svin. Fire subtyper af svineinfluenzavirus kan betragtes som enzootiske i danske svin. H1N1, H1N2 og H3N2 som har cirkuleret de sidste 15-35 år, samt H1N1pdm09 virus, der var pandemisk i mennesker i 2009, og første gang blev påvist i danske svin i 2010. Influenzainfektioner hos svin er oftest ukomplicerede, med en varighed på 4-6 dage og kan ikke behandles med antibiotika. Det er en lokal infektion i luftvejene samt eventuelt i tarmkanalen, og findes således ikke i kødet. Dyr som er akut syge af influenza må ikke sendes til slagting. Sygdommen forværres imidlertid af sekundære bakterielle infektioner, som ofte behandles med antibiotika.

Fund af influenzavirus i svin er ikke anmeldeligt i EU, herunder Danmark, med mindre det drejer sig om subtyperne H5 og H7, og disse er ikke påvist i EU. 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 DTU Veterinærinstituttet eller via SEGES Laboratorium for Svinesygdomme i Kjellerup, i forbindelse med almindelig rutinediagnostik, samt på udenlandske laboratorier. Resultater af sidstnævnte er ikke tilgængelige for forfatterne af denne rapport. Influenzavirus i mennesker kommer formodentligt

²<http://www.fao.org/docrep/012/ak738e/ak738e00.pdf> (FAO guidelines for surveillance of pandemic H1N1/2009 and other influenza viruses in swine populations)

³<http://www.offlu.net/fileadmin/home/en/publications/pdf/OFFLUsurveillance.pdf> (OFFLU strategy document for surveillance and monitoring of influenzas in animals)

⁴<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)

oprindeligt fra dyr. Influenzavirus kan i nogle tilfælde smitte mennesker direkte fra fugle (eksempelvis H5N1 og H7N7), hvilket kan give en infektion med dødelig udgang, men fugleinfluenzavirus smitter generelt 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 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

Det overordnede formål med overvågningen var:

- At undersøge hvilke influenzatyper og influenzavirus gener, 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 af molekylære markører, der indikerer øget risiko for human smitte, i de cirkulerende virus.
2. Tidlig påvisning af virus, som indeholder genetiske markører, der indikerer at de er resistente overfor antivirale midler.
3. Identifikation af genetiske ændringer i cirkulerende influenzavirus 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 svineinflenzavirus 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 fanger alle kendte svineinflenzavirus stammer.
4. At kunne dokumentere, specielt overfor eksportmarkeder, hvilke svineinflenzavirus stammer 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 influenzavirus i svin.

Overvågningen i 2016 er udført ligesom overvågningen 2015. Overvågningen bestod af:

1. Subtypning (HA og NA subtype) af influenzavirus fundet i indsendelser til influenza undersøgelse på DTU-VET. Subtypningen er udført ved segment specifikke real time RT-PCR.
2. Test af influenzaviruspositive prøver for H1N1pdm09 ved real time RT-PCR der er specifik for HA-genet i H1N1pdm09 virus.
3. Sekvensanalyse af HA og NA generne på udvalgte prøver
4. Fuld genom karakterisering af udvalgte virusisolater.

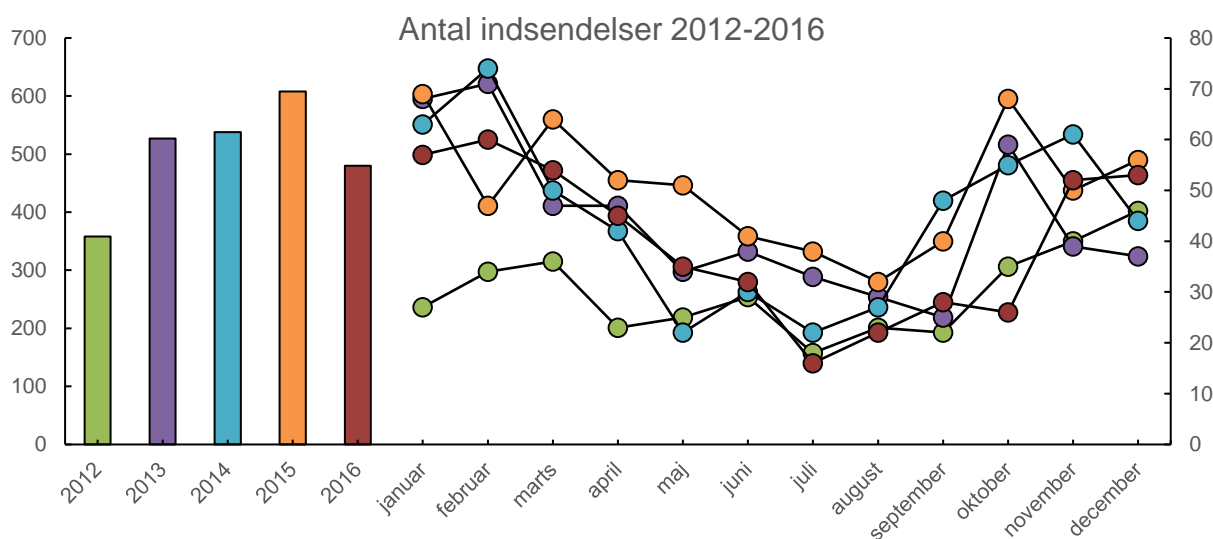
Resultater

Indsendelser

Alle indsendelser fra danske svinebesætninger til DTU Veterinærinstituttet 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. Typisk er der indsendt og testet 1-3 prøver per indsendelse. Prøvematerialet er lungevæv, næsesvabere eller sput. Nogle besætninger har indsendt prøver mere end en gang i løbet af året.

I 2016 blev der totalt modtaget 1115 prøver fordelt på 480 indsendelser til undersøgelse for influenza A virus fra danske svinebesætninger fordelt over hele landet (se Bilag 4).

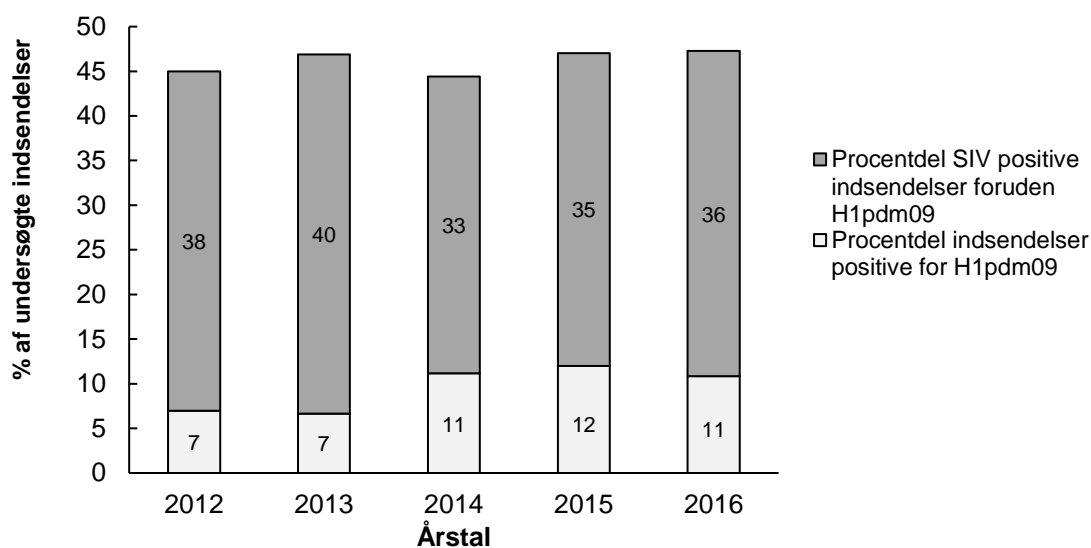
Antallet af indsendelser til influenzavirusundersøgelse i årene 2012 til 2016 fremgår af Figur 1. Den månedlige fordeling af indsendelser for hvert af de fire år fremgår ligeledes af Figur 1. Antallet af indsendelser i 2016 er faldet 21 % i forhold til året før. Dog var antallet af indsendelser højt de sidste to måneder af året. I årene 2009- 2012 var antallet af indsendelser på samme niveau, mens der var en markant stigning fra 2012 til 2013 (Figur 1). Stigningen var ikke tidsmæssigt sammenfaldende med lovbestemte ændringer i forbindelse med flokmedicinering af svin. Stigningen skyldtes formodentligt en øget opmærksomhed blandt producenter og praktiserende dyrlæger på influenzavirus som årsag til respirationslidelser hos svin. Dette bekræftes af, at der i samme periode skete en stigning i salget af vacciner mod influenzavirus. Stigningen i 2015 kom på trods af tilbud om gratis diagnostik på et tysk laboratorium udbudt af vaccineproducenten. Denne gratis diagnostik fortsatte i 2016, og vi modtager en opgørelse derfra. Der er kun indsendt 37 sager til diagnostik og dette kan dermed ikke forklare faldet i antallet af indsendelser.



Figur 1. Fordelingen af antallet af indsendelser til diagnostik af influenzavirus i svin fra 2012 til 2016 fordelt på år (søjler til venstre) og måned (graf til højre) med tilsvarende farve.

Indsendelser med påvist influenza A virus

Prøver til undersøgelse for influenza A virus blev først undersøgt med en generel influenza A real time RT-PCR test, som kan genkende alle kendte influenza A virus. I 2016 var i alt 227 indsendelser positive for influenza A virus i minimum 1 prøve, hvilket svarer til 47 % af de 480 undersøgte indsendelser. Det totale antal indsendelser fordelte sig på 388 forskellige besætninger registreret med forskellige CHR-numre, hvoraf 204 fik påvist influenza A virus. Figur 2 viser hvor mange procent af de undersøgte indsendelser, der i årene 2012 til 2016 blev fundet positive for influenza A virus. Det fremgår af opgørelsen, at andelen af positive prøver de seneste år har stabiliseret sig på omkring 45 %.



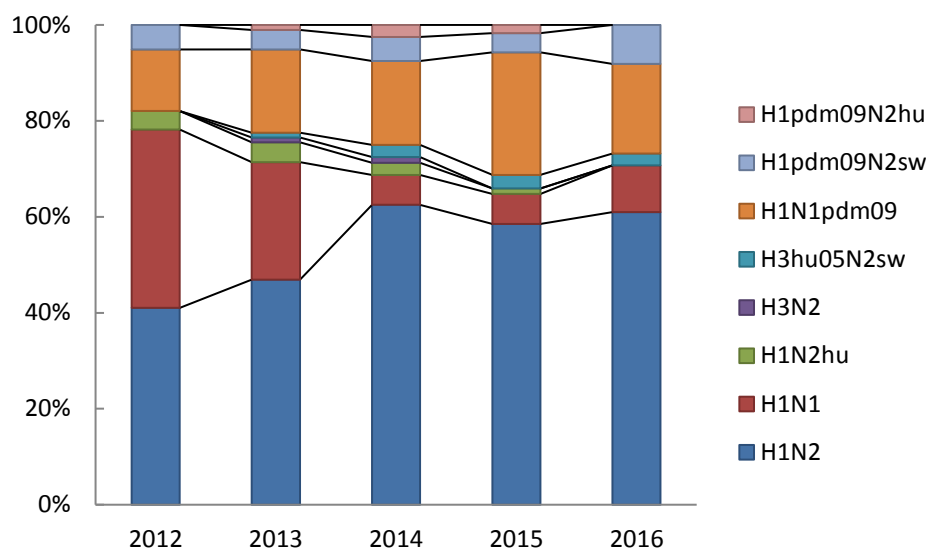
Figur 2. Andelen (%) af de undersøgte indsendelser der testede positiv for influenza A virus og andelen der var positiv for H1pdm09 i årene 2012 til 2016.

Der blev fundet positive prøver i alle landsdele (Bilag 4), hvilket følger billedet fra de forrige år. Alle prøver fundet positive for influenza A virus blev undersøgt for H1N1pdm09 med en real time RT-PCR analyse, der er specifik for HA-genet i dette virus. I 2016 blev 411 influenza A positive prøver fra 204 besætninger undersøgt for H1N1pdm09, hvoraf 52 (23 %) af indsendelserne var positive, repræsenterende 48 forskellige besætninger (Figur 2). Det høje niveau siden 2014 opretholdes dermed. Den geografiske fordeling fremgår af bilag 5. Af figur 2 fremgår andelen af indsendelser der indeholder H1pdm09, forstået således at tallene omfatter både reassortments hvor H1pdm09 indgår samt indsendelser hvor flere subtyper blev konstateret. H1pdm09 positive indsendelser udgør således stadig en stor del af de positive indsendelser.

Svineinflenzavirus subtyper

I 2016 var 227 indsendelser positive for influenza A virus og af disse blev subtypen bestemt for 123 forskellige indsendelser svarende til ca. 54 % af de positive indsendelser.

Fordelingen af subtyper i procent ud af det totale antal af subtypede indsendelser fremgår af Figur 3 for årene 2012-2016. Antallet af indsendelser, der var positive for de forskellige subtyper, er beskrevet i Tabel 1. Der bliver kun subtypet på den mest positive prøve fra hver subtype. I årets overvågning fandt vi ikke flere subtyper i samme indsendelse/prøve.



Figur 3. Fordeling af subtyper i procent ud af de subtypede influenzavirus positive indsendelser for årene 2012-2016.

Fordelingen af subtyper i 2016 skiller sig ud ved at subtyper med N2hu ikke er påvist. Derudover er der en fremgang i andelen af påviste H1pdm09N2sw. H1N1av holder sit lave niveau og H1avN2sw dominerer igen i år.

En detaljeret fordeling af subtyper kan ses i Tabel 1. Den europæiske variant af H1N2, der opstod i England i 90'erne, er fortsat ikke påvist i danske svin. I bilag 6 er et kort, der viser den geografiske fordeling af subtyper i Danmark.

Tabel 1. Indsendelser hvor subtypen af influenzavirus blev bestemt ved sekventering af HA og NA gen for årene 2012 til 2014 og real time RT-PCR i 2015. Tallene angiver antallet af subtyper fundet, og en indsendelse, hvor der er fundet to subtyper vil derfor tælle flere steder.

Subtype	Antal					Kommentar
	2016	2015	2014*	2013	2012	
H1N1	12 (9,8 %)	11 (6,3 %)	5 (6,3%)	24 (25%)	29 (37%)	”Normal” europæisk svineinfluenza A virus subtype “avian-like swine” som har cirkuleret i DK siden 1981.
H1N2	75 (61,0 %)	103 (58,5 %)	50 (62,5%)	46 (47%)	32 (42%)	Dansk svineinfluenza A virus subtype fundet første gang i 2003.
H1N2hu	0 (0 %)	2 (1,1 %)	2 (2,5%)	4 (4%)	3 (4%)	”Normal” europæisk svine H1 subtype sammen med human N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H3N2	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (1,25%)	1 (1%)	0	”Normal” svine H3N2 virus. Ikke detekteret 2010-2011.
H3hu05N2sw	3 (2,4 %)	5 (2,8 %)	2 (2,5%)	1** (1%)	0	Ny reassortment med humant H3, der cirkulerede i mennesker i DK 2005, sammen med dansk svine N2
H1N1pdm09	23 (18,7 %)	45 (25,6 %)	14 (17,5%)	17 (17%)	10 (13%)	Pandemisk svineinfluenza A virus subtype. Fundet første gang i danske svin januar 2010.
H1pdm09N2sw	10 (8,1 %)	7 (4 %)	4 (5%)	4 (4 %)	4 (5 %)	Pandemisk H1 gen sammen med dansk svine N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
H1pdm09N2hu	0 (0 %)	3 (1,7%)	2 (2,5 %)	1 (1 %)	0	Pandemisk H1 gen sammen med human N2 gen. Fundet første gang i danske svin i 2011.
Totale antal med HA og NA type	123	176	80	98	78	
Subtypet for H1pdm09 PCR	52	75	60	35	25	Pandemisk virus påvist med H1pdm09 specifikt real-time RT-PCR assay.

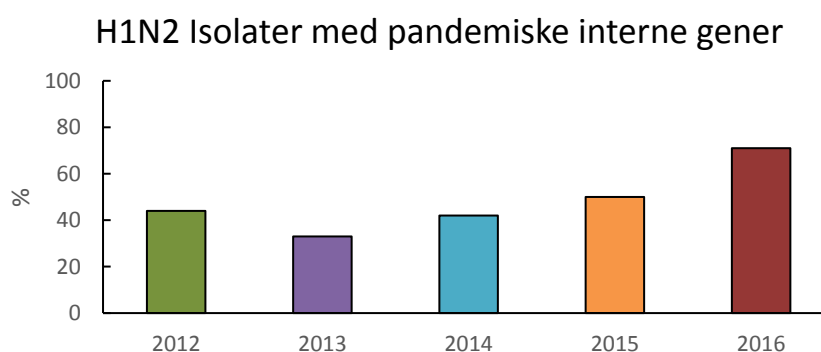
*Tallet i parentes angiver andelen i procent i forhold til antal subtypedede indsendelser.

** Den nye reassortment blev detekteret retrospektivt i en prøve fra 2013. Den var derfor ikke inkluderet i rapporten i 2013.

Svineinflenzavirus reassortments

For at undersøge hvilke svineinflenzavirus stammer der i dag cirkulerer i de danske svin, blev alle gensegmenter fra 29 influenzavirus isolater fra 2016 sekventeret. Oprindelsen af de enkelte gener for de undersøgte svineinflenzavirus blev identificeret ved sammenligning med gensekvenser i tilgængelige databaser og fremgår af bilag 3. I nedenstående opsummeres resultater for de enkelte subtyper baseret på både screening, subtypning og total gen karakterisering ved sekventering.

H1N2 udgjorde 14 af de 29 sekventerede isolater. Fire af disse havde interne gener identisk med de gener, der findes i de enzootiske svineinflenza virus (H1N1, H1N2, H3N2). De resterende 10 virus havde alle interne gener fra H1N1pdm09 virus og grupperer sig tæt sammen når man sammenholder deres genetiske data for både HA og NA. Det er en markant stigning i andelen af H1N2 med pandemiske interne gener der tidligere har været fordelt ligeligt. Dette skift i den genomiske sammensætning indikerer at influenzavirus med pandemiske interne gener har en fordel.



Figur 4: Andelen af isolater med pandemiske interne gener i procent i isolater af subtypen H1N2

H1N1 "avian-like"-swine. Fire virusisolater med denne subtype blev karakteriseret ved sekvensanalyse. Disse havde alle avian like interne gener.

H1N1pdm09. Ni H1N1pdm09 virus blev karakteriseret ved sekvensanalyse og alle havde udelukkende gener af H1N1pdm09 oprindelse. I et tilfælde var HA sekvenserne 100% identisk med virus fundet i mennesker i samme periode (personlig kommunikation, Ramona Trebbien, SSI). Dette viser at der er sket en ny introduktion af H3hu. Det har desværre ikke været muligt at isolere dette virus i cellekultur. Dette virus er markeret med * i fylogenen i bilag 1a – 2b.

H1N2hu. Dette virus blev ikke påvist i 2016,

H1pdmN2hu. Dette virus er ikke påvist i 2016.

H1pdmN2sw. Denne subtype blev fundet i 10 indsendelser. Subtypekombinationen er også blevet fundet udbredt i Tyskland og mere sporadisk i Italien og Holland. Der blev isoleret virus fra én prøve. Fuld genom karakterisering viste, at alle gener, undtagen NA, var identisk med gener fra H1N1pdm09. I Nordvesttyskland er dette virus mere prævalent end det oprindelige H1N1pdm09 virus, og i Danmark er forekomsten fordoblet i forhold til sidste år.

H3hu05N2sw. Virusset, der første gang blev påvist i 2013, blev fundet i fire indsendelser. Et enkelt virus blev karakteriseret og indeholdt som tidligere udelukkende pandemiske interne gener⁵. Hvor der tidligere altid er fundet H3hu med størst lighed med det humant cirkulerende virus fra influenzasæsonen 2004/5 blev der i år fundet et virus med H3hu fra sæsonen 2015/16. I et veterinært specialeprojekt (*Nielsen and Pedersen, 2017. Characterization of influenza A virus H3hu05N2sw with zoonotic potential*) blev H3hu05N2sw yderligere fundet i 4 besætninger, som havde forbindelse til besætninger, hvor virus var påvist i forbindelse med overvågningen. Disse tal er ikke inkluderet i oversigterne i denne rapport.

H3N2. H3N2 med svinegener er ikke detekteret.

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 H274Y og N294S i N1 og R292K og E119G/D/A/V i N2 blev undersøgt i alle NA sekvenser fra 2016. Derudover blev PB2 generne undersøgt for mutationen E627K der er forbundet med høj virulens. Ingen af de oven nævnte mutationer blev fundet i de sekventerede virus.

Samlet analyseoversigt

Tabel 2 viser aktiviteter gennemført i overvågningen af influenza i svin for 2016 sammenholdt med det planlagte antal der var aftalt for 2016. Til sammenligning er resultaterne for 2013-2015 angivet. Antallet af indsendelser og prøver i 2016 er faldet, og det er antallet af H1N1pdm09 analyser dermed også.

⁵ Krog, J. S., Hjulsager, C. K., Larsen, M. A., & Larsen, L. E. (2017). Triple-reassortant influenza A virus with H3 of human seasonal origin, NA of swine origin, and internal A(H1N1) pandemic 2009 genes is established in Danish pigs. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. DOI: 10.1111/irv.12451

Tabel 2. Samlet oversigt over analyser udført i svineinfluenza overvågning i 2016 sammenlignet med budget og resultaterne for overvågningen i 2013 - 2015.

Parameter	Forventet 2016	Endelig opgørelse 2016	Endelig opgørelse 2015	Endelig opgørelse 2014	Endelig opgørelse 2013
Antal indsendelser undersøgt for influenza A virus	550 ^a	480	608	538	527
Antal prøver undersøgt for influenza A virus		1115	1359	1173	1252
Antal indsendelser med min. 1 influenza A virus positiv prøve		227	286	239	247
Antal influenza A virus positive prøver i alt		411	511	435	436
Antal prøver testet for H1N1pdm09	450	411	511	435	436
Antal H1pdm09 positive indsendelser ^b		52	75	60	35
Antal H1pdm09 positive besætninger		48	66	55	35
Indsendelser subtypet på både HA og NA	275	109	176	80 ^d	95 ^d
Resistens undersøgelser ^c	-	29	20	71	36
Partiel karakterisering alle segmenter	15	0		18	21
Fuld længde sekventering	10	29	20	15	16

^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

^dSubtypet ved sekventering

Diskussion

Benchmarking

Forekomsten af influenza A virus i svin i Danmark er undersøgt systematisk over en periode på 7 år, hvorved der er opnået en dynamisk indsigt i hvilke virus, 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 gener fra både dette virus og de enzootiske svineinfluenzavirus, H1N1 og H1N2. H1pdm09N2sw (1. generation eller dobbelt reassortment) er et eksempel på et af disse nye reassortments. I overvågningen 2014 blev der for første gang påvist et 2. generations virus (trippel reassortment), H3hu05N2sw med interne gener fra H1N1pdm09. Overvågningen i 2015-16 har vist at dette virus har spredt sig yderligere til flere egne af Danmark. Reassortments med H1N1pdm09 gener er også påvist i andre lande i Europa, i Asien og i Nordamerika, hvilket viser, at introduktionen af dette virus har medført en signifikant ændring af influenza virus dynamikken i svin globalt.

Ud fra data i overvågningen kan man se en tendens til, at de interne gener fra pandemisk influenza H1N1pdm09 og N2sw vinder frem på bekostning af hhv. enzootiske ”avian-like”-svine interne gener og N1 generne. Dette indikerer, at disse gener eller gen-konstellationer er en fordel for virus. I år ses endnu en stigning i andelen af virus, der havde interne pandemiske gener, så totalt set har 71 % af svineinfluenzavirus med ikke-pandemiske overfladeproteiner nu pandemiske interne gener. Samtidig viser det også, at det mest succesfulde svinevirus lige nu er H1avN2sw med pandemiske interne gener. At interne pandemiske gener udgør en fordel understreges af, at der indtil nu ikke er observeret et virus med H1pdm, der har ”avian-like” eller andre interne kassetter. N2sw blev påvist i sammenhæng med alle varianter af HA, hvorimod N1 og N1pdm09 altid var sammen med deres respektive parent HA variant. Andelen af reassortet H1pdmN2sw er fordoblet siden sidste år.

I perioden 2010-2013 blev der i regi af et EU projekt (ESNIP3) gennemført en systematisk udveksling af overvågningsdata i 20 Europæiske lande inklusiv Danmark. Der var ret store forskelle mellem de enkelte lande, men i gennemsnit var 54 % af de karakteriserede virus af subtypen avian-like H1N1, 16 % var H1N2 (human-like som ikke findes i Danmark); 9 % var H3N2 og 14 % var pdm09H1N1. Udbredelsen af H1N1pdm09 ses altså også i andre lande, men Danmark er anderledes end andre europæiske lande ved fravær af human-like H1N2 og med en høj forekomst af H1N2 med et ”avian-like” svine HA gen. Sidstnævnte subtype er de senere år fundet sporadisk i en række europæiske lande.

Veterinære aspekter

Der er i 2016 blevet observeret et fald i antal indsendelser, men antallet er stadig på et langt højere niveau end da overvågningsprogrammerne startede. Selvom der var et fald i 2016, lå de sidste 2 måneder af året på niveau med ”rekordåret” 2015. I 2016 var andelen af positive

indsendelser igen 47 %. Sammenholdt med at hovedparten af indsendelserne var fra besætninger med kliniske respirationsvejssymptomer, understreger dette at influenza hos svin kan have signifikante sundhedsmæssige og velfærdsmæssige konsekvenser i besætningerne. Det øgede fokus på influenzavirus som årsag til kliniske symptomer har i henhold til VETSTAT medført en kraftig stigning i antallet af solgte vaccinedoser mod influenza A virus til svin. Alt andet lige vil den øgede diagnostik sammenholdt med øget forebyggelse ved vaccination bidrage til at nedbringe forbruget af antibiotika til behandling af respirationsvejslidelser i svinebesætningerne.

Den kommercielt tilgængelige vaccine på det danske marked har begrænset krydsbeskyttelse mod infektion med den ”pandemiske” subtype H1N1pdm09. Fra 2012 har det derfor været muligt at få dispensation til at anvende en vaccine, der specifikt beskytter mod H1N1pdm09 virus, men kun hvis denne type er påvist i besætningen. Da alle positive influenza prøver testes for H1pdm09 subtypen, bidrager overvågningen til, at der kan forebygges mere effektivt mod svineinfluenza, da den rigtige vaccine kan vælges. Salget af vaccinen mod H1N1pdm09 virus er således også steget kraftigt de senere år, men det har i sidste del af 2016 og starten af 2017 ikke været muligt at skaffe denne vaccine, hvilket er et problem for ramte besætninger. Situationen forventes at forbedres når en ny kommerciel registreret vaccine bliver tilgængelig i 2017/2018.

I overvågningen i 2016 blev reassortments med humane N2 gener, som er rapporteret tidligere år, ikke påvist. Disse kan være udkonkurreret, og har til alle tider været sjældent forekommende. Derimod ser vi en stigning af H1pdmN2sw som er den mest fremtrædende nyere reassortment. Overvågningen fungerer hensigtsmæssigt med henblik på at identificere influenzavirus med nye gensammensætninger hurtigt, selvom stikprøvestørrelsen, set i forhold til den samlede population af svin, er begrænset. H3huN2sw er et eksempel på en ny reassortment, der blev opdaget i overvågningen. De sidste par år har der pågået flere studier af dette virus, som det må formodes, at danske grise ikke har immunitet imod. Derudover er der meget begrænset krydsreaktion mellem antistoffer dannet mod de tilgængelige vacciner, der blev også rapporteret om manglende effekt af vaccination i smittede besætninger. Det må formodes at danske og udenlandske svinebesætninger er helt mangler immunitet over for dette virus. Det indledende studie af H3hu05N2sw virus er netop publiceret⁶. Derudover har vi i et specialeprojektstudie belyst, hvordan dette virus kan genfindes i besætninger et år efter forrige detektion. I specialet var de studerende i kontakt med dyrlæger, der havde massive sundhedsproblemer i besætningerne pga. dette. Ud over samarbejdet omkring H3huN2sw arbejdes der også sammen med IDT og SEGES i et PhD studie hvor dynamikken og betydningen af influenza A virus i besætninger belyses.

Endnu et interessant aspekt er, at vi i overvågningen har fundet samtidige sæsoninflenzavirus fra mennesker i grise. Det gælder både H1pdmN1pdm og H3hu15/16N2sw. Dette indikerer, at

⁶ Krog, J. S., Hjulsager, C. K., Larsen, M. A., & Larsen, L. E. (2017). Triple-reassortant influenza A virus with H3 of human seasonal origin, A of swine origin, and internal A(H1N1) pandemic 2009 genes is established in Danish pigs. *Influenza and Other Respiratory Viruses*. DOI: 10.1111/irv.12451

svin er modtagelige for influenzavirus fra mennesker, og at nye virus kan opstå ved at mennesker smitter svin med influenza i besætningerne. I tilfældet med H3hu15N2sw betyder det, at endnu et virus, der ikke er dækket af vaccinen, er opstået og kan være skyld i forøget antibiotikaforbrug og økonomiske tab i besætningen.

Zoonotiske aspekter

I USA er der rapporteret om mere end 364 tilfælde i perioden 2011-2016 af human infektion med et svineinfluenzavirus af subtypen H3N2, som har optaget et pandemisk M gen, dette virus kaldes H3N2v ifølge international nomenklatur. I 2016 har der været rapporteret 18 tilfælde. Der er fra europæisk side stor fokus på at overvåge, om dette virus spredes til mennesker eller svin i Europa ⁷.

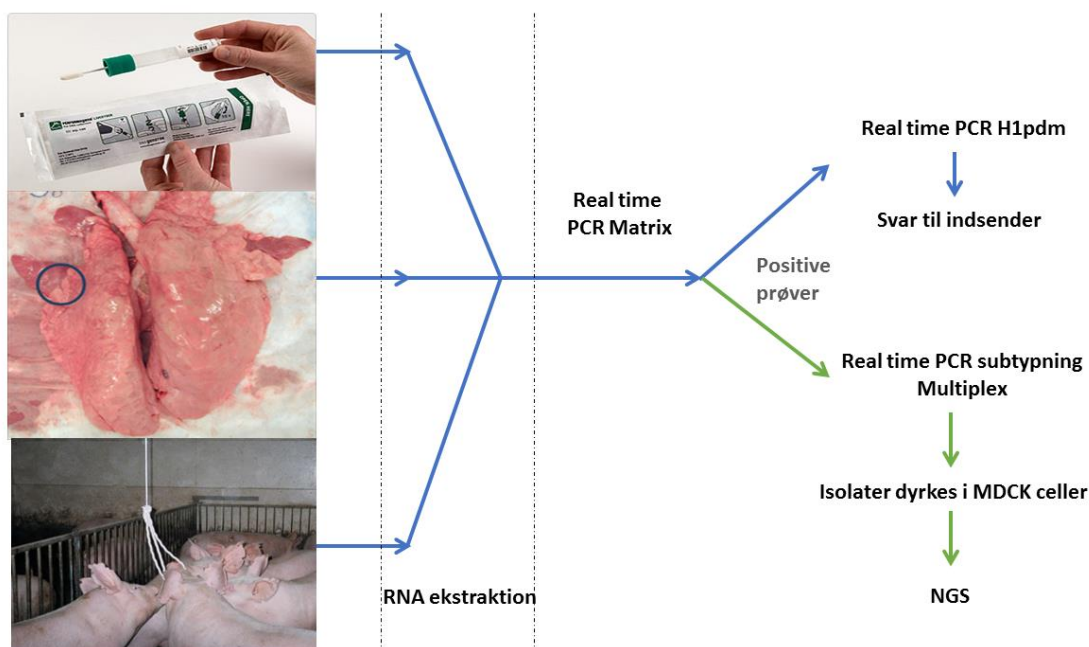
På baggrund af den overvågning der er foretaget i Danmark i 2010-16, kan det konkluderes, at det er meget usandsynligt at dette virus er til stede i den danske svinepopulation. Det nye reassortment H3hu05N2sw, med interne H1N1pdm09 gener, minder i sammensætning om det amerikanske H3N2v, der også har et pandemisk M gen, men da H3 fra H3hu05N2sw har cirkuleret i den danske og globale humane population i mange år, må man formode, at der er en god immunitet mod dette virus, hvilket vil reducere omfanget af smittede, hvis dette virus skulle smitte til mennesker.

⁷ <http://www.ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/Scientific-opinion-risk-swine-origin-influenza-A%28H3N2%29-EFSA-EMA.pdf>

Materialer og metoder

Den overordnede arbejdsgang er illustreret i Figur 5. Der modtages næsesvabere, lungestykker eller spytprøver fra praktiserende dyrlæger. RNA ekstraheres fra de enkelte prøver og testes for influenza A virus med et real time RT-PCR assay, der er rettet mod matrix-genet. Influenzaviruspositive prøver bliver screenet for om virus har H1pdm09 varianten af HA-genet med et specifikt real time RT-PCR assay. Resultatet svares herefter ud til indsender.

De influenzaviruspositive prøver subtypes yderligere vha. multiplex PCR analyse, der består af to real time RT-PCR reaktioner som hver især multiplexer 4 forskellige assays. Derved testes for de 8 segmenter af HA og NA der er relevante for den danske svinepopulation. Ved negativt resultat sekventeres segmenterne, for at kunne påvise eventuel introduktion af en ny variant af HA og/eller NA.

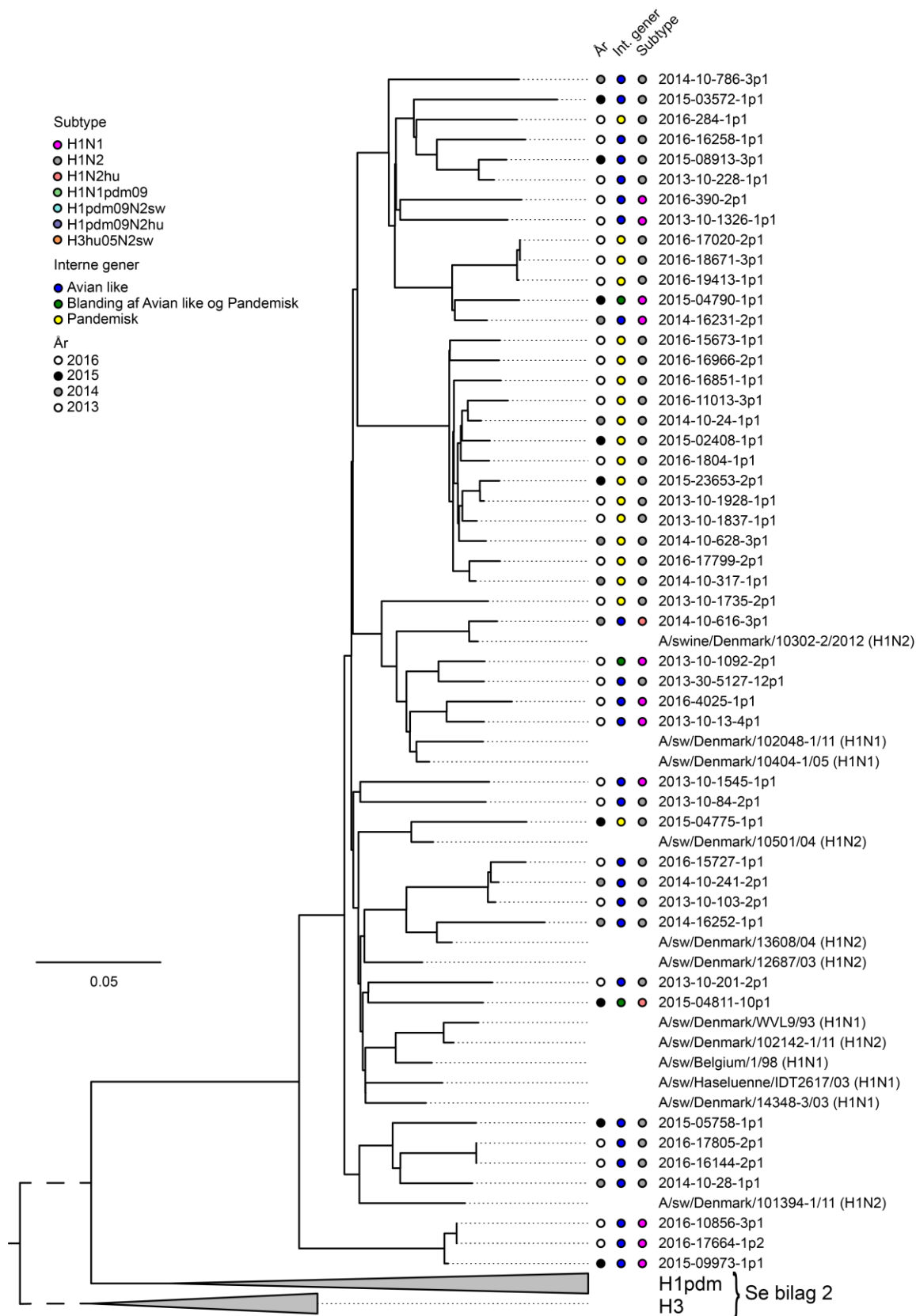


Figur 5: Arbejdsgang fra modtagelse af prøver fra besætningerne til endt analyse. Blå pile angiver processer der foregår i rutinediagnostikken. Grønne pile angiver processer der varetages af forskningsafdelingen.

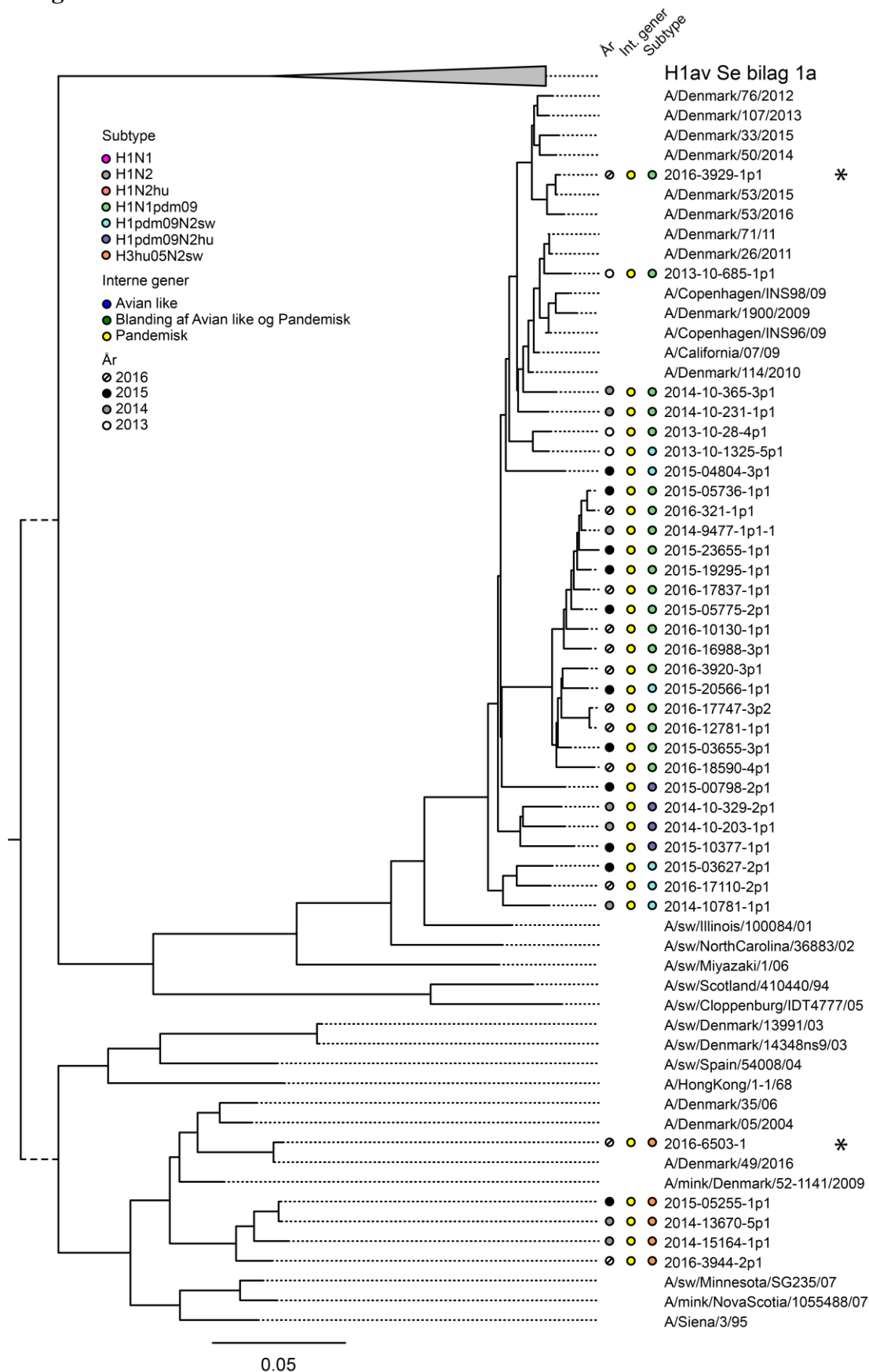
Ud fra subtypningen udvælges prøver til fuld genom karakterisering ved next generation sequencing (NGS i Figur 5). Virus isoleres fra de udvalgte prøver ved dyrkning i MDCK celler. NGS udføres på fuld længde PCR produkter fra alle 8 segmenter. De 8 PCR produkter oprenses og blandes i et forhold så de repræsenterer et virus. Hver prøve med de 8 opformerede segmenter sendes til NGS (DMAK, Lyngby). Rådata databehandles (CLC genomics workbench, QIAGEN) og consensussekvenser for hvert segment analyseres med fylogenetiske analyser (CLC main workbench, QIAGEN).

Bilag 1a. HA fylogeni

Fylogenetisk træ af fuld længde HA gen fra fuld genom karakteriserede isolater fra overvågningen i 2013-16 baseret på MUSCLE alignment og neighbor-joining fylogeni. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. * angiver prøver hvor HA stammer fra stammer identiske med humane fra 15/16 sæsonen.

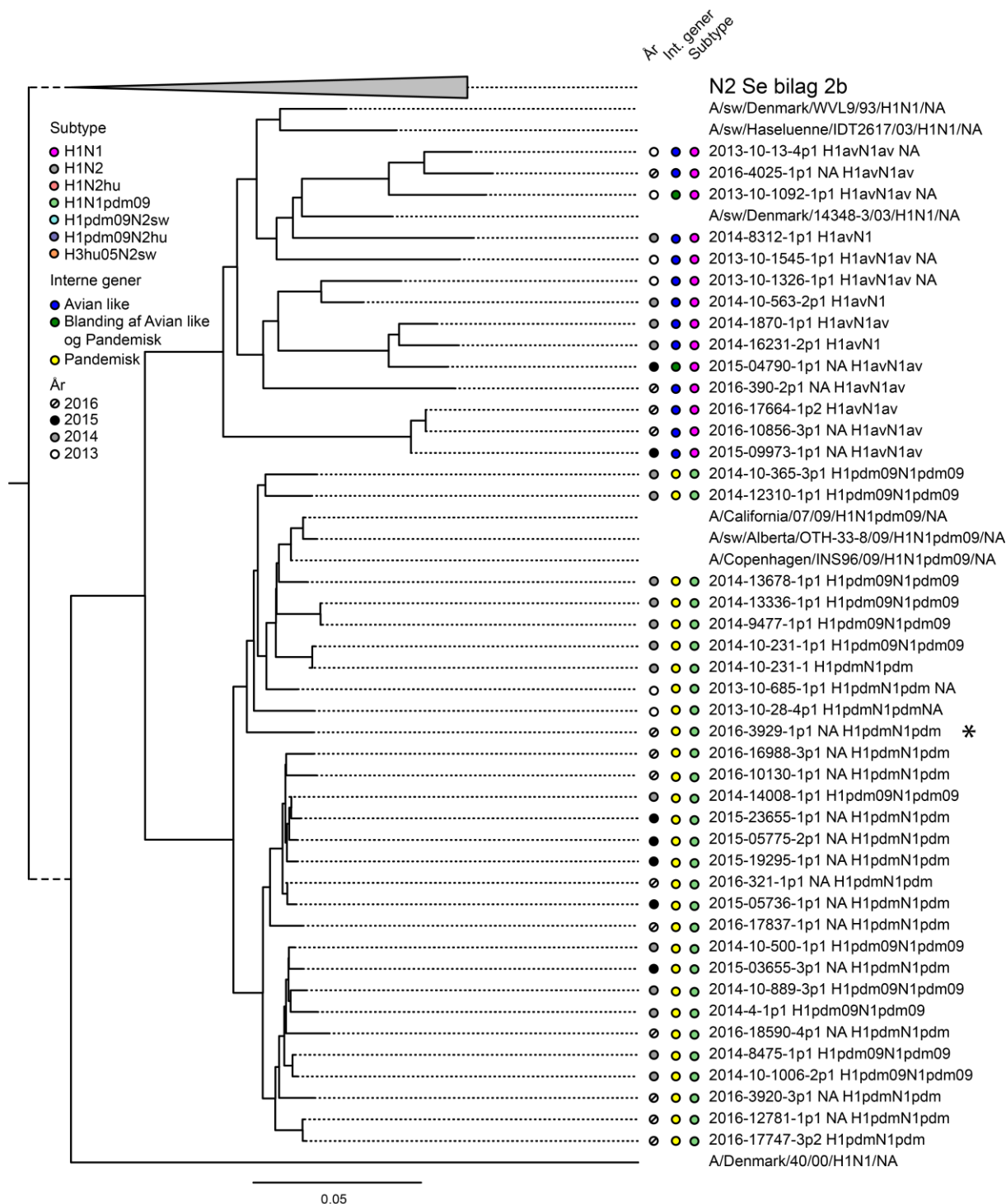


Bilag 1b

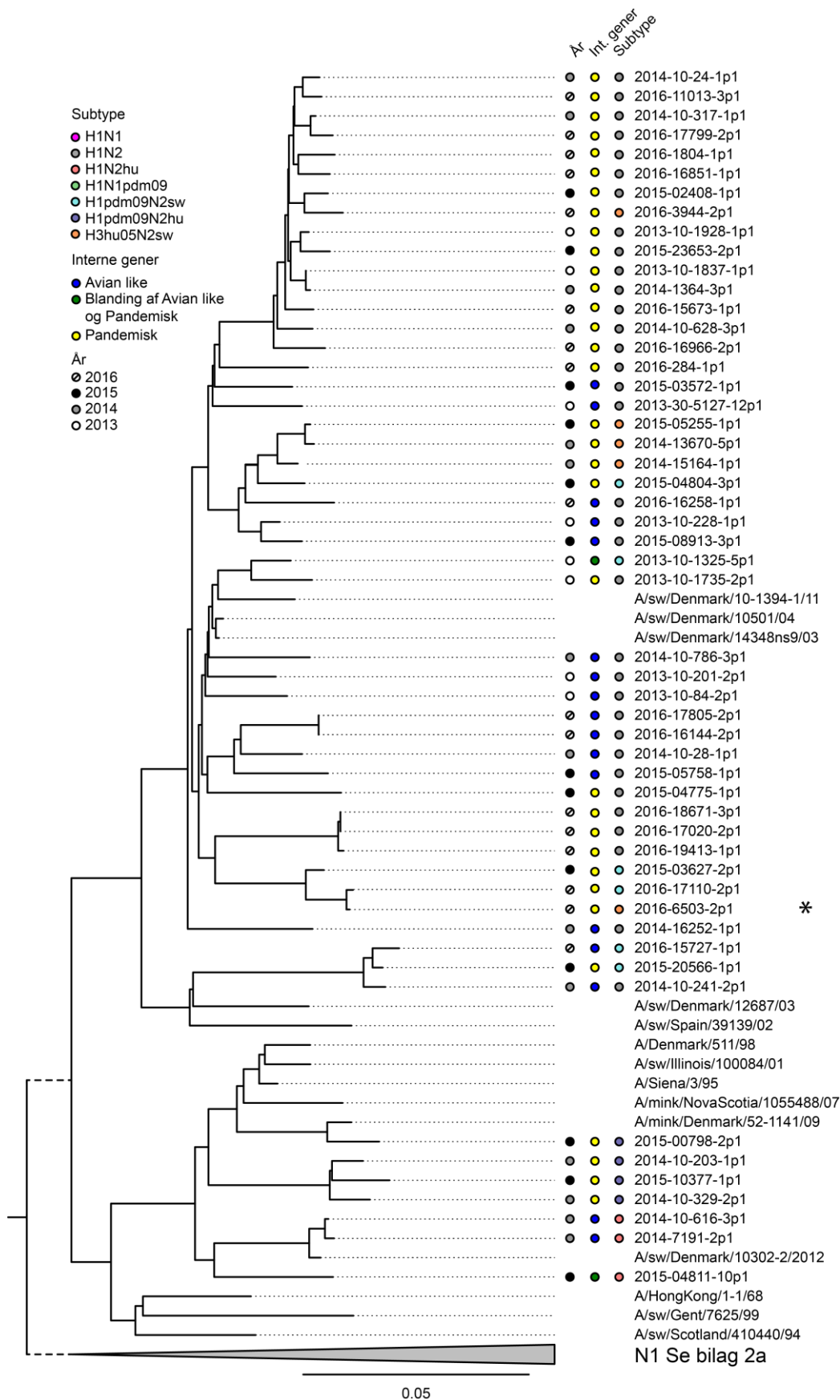


Bilag 2a. NA fylogeni

Fylogenetisk træ af fuld længde NA gen baseret på MUSCLE alignment and neighbor-joining fylogeni træ, fra fuldgenom karakteriserede isolater fra overvågningen i 2013-16. Navne startende med årstal er prøver fra overvågningen, de øvrige er referencer fra tidligere danske prøver eller GenBank. * angiver prøver hvor HA stammer fra stammer identiske med humane fra 15/16 sæsonen.



Bilag 2b



Bilag 3. Fuld genom data

Skematisk præsentation af oprindelsen af alle otte segmenter fra de undersøgte isolater fra 2012-2016. Hvert gensegment er farvekodet i henhold til deres oprindelse.

	H1	H3	N1	N2	M	NP	NS	PA	PB1	PB2
H1N2										
2012-10-258-1p1										
2012-10-297-1p1										
2012-10-345-1p1										
2012-10-448-3p1										
2012-10-779-2p1										
2012-10-789-1p1										
2012-10-801-2p1										
2012-10-802-1p1										
2012-10-1844-3p1										
2013-10-84-2p1										
2013-10-103-2p1										
2013-10-201-2p1										
2013-10-228-1p1										
2013-30-5127-12p1										
2013-10-1782-1p1										
2013-10-1735-2p1										
2013-10-1837-1p1										
2013-10-1928-1p1										
2014-10-24-1p1										
2014-10-28-1p1										
2014-10-241-1p1										
2014-10-317-1p1										
2014-10-628-3p1										
2014-10-786-3p1										
2014-16252-1p1										
2015-02408-1p1										
2015-03572-1p1										
2015-04775-1p1										
2015-05758-1p1										
2015-08913-3p1										
2015-23653-2p1										
2016-284-1p1										
2016-1804-1p1										
2016-11013-3p1										
2016-15673-1p1										
2016-15727-1p1										
2016-16144-2p1										
2016-16258-1p1										
2016-16851-1p1										
2016-16966-2p1										
2016-17020-2p1										
2016-17799-2p1										
2016-17805-2p1										
2016-18671-3p1										
2016-19413-1p1										
Farvekode										
Svineinfluenza (H1N1, H1N2, H3N2) oprindelse						H1N1pdm09 oprindelse				
Nylige humane H3N2						Ikke sekventeret				

	H1	H3	N1	N2	M	NP	NS	PA	PB1	PB2
H1N1										
2012-10-85-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-146-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-169-3p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-235-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-363-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-1143-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2012-10-1245-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-13-4p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-214-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-691-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	White	Blue	Blue
2013-10-1092-2p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Green	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-1326-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-1545-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2014-16231-3p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	White	Blue	Blue	Blue	Blue
2015-4790-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Green	Green	Green	Green	Green
2015-09973-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2016-390-2p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2016-4025-1p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2016-10856-3p1	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2016-17664-1p2	Blue	Grey	Blue	Grey	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	White
H1N2hu										
2012-10-302-2p1	Blue	Grey	Grey	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-212-3p1	Blue	Grey	Grey	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2013-10-493-1p1	Blue	Grey	Grey	Red	Blue	Blue	Blue	White	Blue	Blue
2014-10-616-3p1	Blue	Grey	Grey	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2014-7191-2p1	Blue	Grey	Grey	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
2015-04811-10p1	Blue	Grey	Grey	Red	Green	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue
Farvekode										
Svineinfluenza (H1N1, H1N2, H3N2) oprindelse						H1N1pdm09 oprindelse				
Nylige humane H3N2						Ikke sekventeret				

	H1	H3	N1	N2	M	NP	NS	PA	PB1	PB2
H1N1pdm09										
2012-10-162-1p1										
2013-10-28-4p1										
2013-10-409-1p1										
2013-10-685-1p1										
2014-10-231-1p1										
2014-10-365-3p1										
2014-9477-1p1										
2015-03655-3p1										
2015-05736-1p1										
2015-05775-2p1										
2015-19295-1p1										
2015-23655-1p1										
2016-321-1p1										
2016-3920-3p1										
2016-3929-1p1										
2016-10130-1p1										
2016-12781-1p1										
2016-16988-3p1										
2016-17747-3p2										
2016-17837-1p1										
2016-18590-4p1										
H1pdm09N2sw										
2012-10-176-1p1										
2012-10-845-1p1										
2013-10-1325-5p1										
2014-6252-2p1										
2014-10781-1p1										
2015-03627-2p1										
2015-04804-3p1										
2015-20566-1p1										
2016-17110-2p1										
H1pdm09N2hu										
2014-10-203-1p1										
2014-10-329-2p1										
2015-00798-2p1										
2015-10377-1p1										
H3hu05N2sw										
2014-15164-1p1										
2015-05255-1p1										
2016-3944-2p1										
Farvekode										
	Svineinfluenza (H1N1, H1N2, H3N2) oprindelse					H1N1pdm09 oprindelse				
	Nylige humane H3N2					Ikke sekventeret				

Bilag 4. Geografisk fordeling af positive og negative indsendelser

anonymiseret

Bilag 5. Geografisk fordeling af H1N1pdm09 virus

anonymiseret

Bilag 6. Geografisk fordeling af subtyper

anonymiseret