



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Rapportage pilot **Varkensinfluenza** surveillance

Rapportage pilot Varkensinfluenza surveillance

RIVM-briefrapport 2023-0443

Colofon

© RIVM 2023

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave.

Het RIVM hecht veel waarde aan toegankelijkheid van zijn producten. Op dit moment is het echter nog niet mogelijk om dit document volledig toegankelijk aan te bieden. Als een onderdeel niet toegankelijk is, wordt dit vermeld. Zie ook www.rivm.nl/toegankelijkheid.

DOI 10.21945/RIVM-2023-0443

A. Meijer (auteur), RIVM
D. Eggink (auteur), RIVM
A. Kroneman (auteur), RIVM
R. Fouchier (auteur), Erasmus-MC
M. Houben (auteur), GD
E. van der Vries (auteur), GD
E. Germeraad (auteur), WBVR
J. van der Giessen (auteur), RIVM

Contact:

J.W.B. van der Giessen
Centrum voor Zoonosen en Omgevingsmicrobiologie
joke.van.der.giessen@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van VWS in het kader van Nationaal Actieplan Versterken Zoonosenbeleid project V/150200/01/SV

Dit is een uitgave van:
**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**
Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland
www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Rapportage pilot Varkensinfluenza surveillance

Varkensgriep bij varkens komt veel voor in West-Europese landen. Sommige varkensgriepvirussen kunnen overgaan van varken naar mens. Dat gebeurt niet vaak en meestal alleen bij mensen die veel in contact komen met varkens. De klachten zijn over het algemeen mild, maar griepvirussen van varkens en mensen kunnen ook vermengen en dan tot ernstigere klachten leiden. Het is niet bekend welke griepvirussen voorkomen bij varkens in Nederland.

De ministeries van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) en Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV) willen daarom meer inzicht krijgen welke varianten van varkensgriep op Nederlandse varkensbedrijven voorkomen.

Deze varianten kunnen dan zo nodig worden vergeleken met de varianten van griepvirussen die bij mensen zijn gevonden. Hiervoor is in 2022 in nauwe samenwerking met varkensdierenartsen een pilot opgezet.

In de pilot zijn bij 90 varkenshouderijen monsters getest op griepvirussen die kunnen voorkomen bij zoogdieren, mensen en vogels. Er zijn verschillende varianten van varkensgriepvirussen van het subtype H1 en één van het subtype H3 gevonden. De zeer besmettelijke variant van vogelgriep (H5) is niet aangetoond bij varkens. De medicijnen, die bij mensen werken tegen griepvirussen, bleken ook te werken tegen de gevonden varkensgriepvirussen.

In de pilot is onder andere veel kennis verzameld over de erfelijke eigenschappen van varkensgriepvirussen. Met deze informatie kan beter worden achterhaald waar het virus vandaan komt als mensen met een varkensgriepvirus zijn besmet. Ook kan zo worden achterhaald of varkens-, vogel- en menselijke griepvirussen vermengen.

Het onderzoek is anoniem gedaan op verschillende soorten varkensbedrijven: bij reguliere varkenshouderijen, enkele varkensbedrijven waar varkens buiten lopen en bij bedrijven waarbij naast varkens ook pluimvee, koeien of paarden aanwezig zijn.

De monsters zijn op de bedrijven genomen door in een hok met varkens met griepachtige verschijnselen een touw op te hangen om aan te kauwen. Ook zijn uitstrijken genomen uit de neus bij een ziek dier. Daarnaast zijn monsters onderzocht van dode varkens waarbij het vermoeden was dat ze griep hadden. Dit is ook gedaan bij een groep controlevarkens zonder griepverschijnselen.

De pilot is uitgevoerd door een samenwerkingsverband van het RIVM, de Gezondheidsdienst voor dieren (Royal GD), het Erasmus Medisch Centrum (EMC) en de Wageningen Bioveterinary Research (WBVR). Dit consortium beveelt aan om dit onderzoek meerdere jaren te blijven doen. Dat geeft meer inzicht hoe de varkensvirussen zich verspreiden op

de varkensbedrijven, of er nog meer varianten zijn, en of er besmettingen zijn met vogel- en menselijke griepvirussen.

Kernwoorden: varkensgriep, vogelgriep, One Health, Nederland, monitoring, varkensbedrijf

Synopsis

Report on the swine influenza surveillance pilot

Swine influenza is prevalent among pigs in Western European countries. Some swine influenza viruses can be transmitted to humans. However, this is a rare occurrence and typically restricted to individuals who have significant contact with pigs. Symptoms are generally mild, but when swine and human influenza viruses mix, they can lead to more severe symptoms. Currently, the specific swine influenza virus strains that are present in the Netherlands are unknown.

The Ministry of Health, Welfare and Sport and the Ministry of Agriculture, Nature and Food Quality would therefore like to gain a better understanding of the swine influenza strains on Dutch pig farms. These strains can then be compared with the influenza virus strains found in humans when necessary. To achieve this, a pilot was established in 2022 in close cooperation with pig veterinarians.

In the pilot, samples from 90 pig farms were tested for influenza viruses that can infect mammals, humans and birds. Various strains of swine influenza viruses of subtype H1 and one of subtype H3 were identified. The highly contagious avian influenza strain (H5) was not detected in pigs. Medicines effective against human influenza viruses were also found to work against the identified swine influenza viruses.

In addition, the pilot yielded extensive knowledge about the genetic characteristics of swine influenza viruses. This information can help trace the origins of a swine influenza virus when humans are infected and can also help determine whether swine, avian and human influenza viruses have mixed.

The surveillance was conducted anonymously on various types of pig farms, including regular pig farms, some with free-range pigs, and mixed farms where pigs poultry, cattle or horses are raised together.

Samples were collected on the farms by having pigs chew on a rope or taking individual nasal swabs from diseased pigs. In addition, samples were examined from dead pigs at autopsy suspected of having contracted swine influenza and a group of control pigs with no suspicion of influenza.

The pilot was carried out by a consortium of RIVM, Royal GD, Erasmus Medical Center (EMC) and Wageningen Bioveterinary Research (WBVR). This consortium recommends extending the surveillance on swine influenza in a One Health setting in order to gain more insight into how viruses spread on pig farms and to identify any additional strains.

Keywords: swine influenza, avian influenza, One Health, Netherlands, surveillance, pig farm

Leeswijzer

Varkensgriepvirussen kunnen besmettingen bij mensen veroorzaken. Doordat bepaalde kennis over deze virussen op Nederlandse varkensbedrijven ontbreekt, kan de oorsprong van een dergelijke zoönose nu niet worden gevonden. Om dit hiaat te ondervangen is in een One Health pilot een netwerk van dierenartsen (peilstations) opgezet voor het verzamelen van monsters van varkens met griepklachten. Dit rapport beschrijft de eerste resultaten van deze pilot. Er is onderzocht welke griepvirussen circuleren onder varkens, of deze virussen ook bij mensen gevonden worden, en of deze virussen gevoelig zijn voor de beschikbare antivirale medicijnen en vaccins. Alle informatie is overzichtelijk gemaakt voor de partners binnen dit consortium in een onlinedatabase. Op basis van deze resultaten worden in dit briefrapport aanbevelingen gedaan voor een meerjarig surveillancesysteem. Deze pilot is een samenwerking tussen RIVM, Royal GD (GD), Erasmus MC (EMC) en Wageningen Bioveterinary Research (WBVR).

Inhoudsopgave

1	Samenvatting — 11
2	Inleiding — 15
3	Methoden — 17
3.1	Opzetten van een surveillancesysteem — 17
3.2	Isolatie van influenzavirussen d.m.v. celkweek. — 18
3.3	Typering middels WGS op origineel en gekweekt materiaal — 19
3.4	Rondzending ter vergelijking WGS-resultaten — 19
3.5	Humane-dierlijke database voor opslag meta-data en sequenties verkregen met whole genome sequencing (WGS) van varkens- en humane stammen representatief voor elk griepseizoen — 19
3.6	Analyse van de varkensinfluenzavirus sequenties in de context van relevante influenzavirussen uit de humane surveillance. — 20
3.7	Antivirale gevoeligheid. — 20
3.8	Antigene karakterisering selectie van varkensstammen. — 21
3.9	Delen van Data in Europese en wereldwijde netwerken. — 21
3.10	Opstellen samenwerkingsovereenkomst. — 21
4	Resultaten — 23
4.1	Verzameling circa 200 varkensinfluenzastammen. — 23
4.2	Kweek van PCR positieve monsters en Typering door Whole Genome Sequencing — 26
4.3	Rondzendingen ter vergelijking van de WGS-resultaten — 26
4.4	Humane-dierlijke influenza platform voor opslag meta-data en sequenties — 26
4.5	Analyse van de varkensinfluenzavirus sequenties in de context van relevante influenzavirussen uit de humane surveillance — 27
4.6	Antivirale gevoeligheid varkensinfluenzavirussen — 29
4.7	Antigene karakterisering varkensinfluenzavirussen — 35
4.8	Rapportage en delen van sequenties internationaal. — 39
4.9	Samenwerkingsovereenkomst — 39
5	Discussie en aanbevelingen — 41
5.1	Verzameling van monsters en influenza stammen, bedrijfstypen en beantwoording vraagstelling. — 41
5.2	H3N2 — 41
5.3	Whole Genome Sequencing (WGS) — 42
5.4	Moleculair Platform — 42
5.5	Antivirale gevoeligheid — 43
5.6	Antigene diversiteit — 43
5.7	Humane casussen — 44
5.8	Aanbevelingen — 44
6	Dankwoord — 47
7	Referenties — 49

1 Samenvatting

Aanleiding en doel

Varkensgriep bij varkens is endemisch in veel landen in West-Europa. Mensen kunnen ook varkensgriep krijgen. Sinds 1986 zijn er in Nederland negen besmettingen met varkensinfluenzavirussen bij mensen gerapporteerd.

De oorsprong van het virus kon niet worden vastgesteld. Een belangrijke oorzaak hiervan is het gebrek aan inzicht over de aanwezigheid van varkensinfluenzavirusstammen en virusvarianten op Nederlandse varkensbedrijven. In 2022 is daarom de pilot One Health surveillance varkensinfluenza gestart om een geanonimiseerd en low level achtergrond surveillance programma op te zetten voor varkensinfluenzavirussen. Het doel van dit programma was het monitoren en karakteriseren van circulerende varkensinfluenzavirus stammen op Nederlandse varkensbedrijven en deze te vergelijken met humane influenzavirusstammen. Met deze informatie kan beter duiding worden gegeven aan de infectierisico's van varkensinfluenzavirussen voor publieke gezondheid.

Aanpak

Voor de surveillance is een nieuw netwerk van dierenartsenpeilstations opgezet en is een online-database (moleculair platform: MPF) gebouwd voor het beheer en analyse van virusgenoomsequenties. Gedurende het project (2022-2023) zijn er vanuit 90 varkensbedrijven 913 monsters verzameld van varkens, waarvan de meeste dieren (91%) met klinische klachten. Deze bedrijven waren verspreid over Nederland, inclusief het noorden met een relatief lage varkensdichtheid, het midden, en het zuiden met de hoogste varkensdichtheid van Nederland. Verschillende soorten bedrijven zijn geanalyseerd: conventionele varkensbedrijven, varkensbedrijven met buitenuitloop en gemengde bedrijven. Naast de monsters via de peilstations (n=908), zijn 73 influenzavirus PCR-positieve monsters verzameld uit verschillende routine monsterstromen van GD.

In het online-database (MPF) zijn uiteindelijk de volledige sequenties van 129 influenzavirusstammen afkomstig van varkens (anoniem) geüpload. Deze onlinedatabase werd daarnaast aangevuld met sequenties van 4 varkensinfluenzastammen waarvan in Nederland geregistreerde vaccins voor varkens beschikbaar zijn en met een referentieset van 545 publiek beschikbare humane en zoönotische influenzavirusstammen.

Verwantschap en verschillen influenzastammen.

De eerste fylogenetische analyse van de 129 influenzavirussen liet zien dat er een grote diversiteit aan circulerende varkensinfluenzastammen is. Er waren 128 virussen van het subtype H1 en 1 virus van het subtype H3. De H1 virussen behoorden tot drie verschillende lineages (Classical Swine (CS) lineage (clade 1A.3.3.2, dat wil zeggen pdm09-achtig), Eurasian Avian (EA) lineage (clade 1C.2.1 en clade 1C.2.2) en

de Human Seasonal (HS) lineage (clade 1B.1.2.1)). De laatste twee lineages zijn in het verleden overgegaan van respectievelijk vogels en mensen op varkens. Het gedetecteerde H3N2 virus heeft een HA gen van clade 2000.3 en is voor alle gensegmenten nauw verwant aan varkensvirussen die in 2015-2016 circuleerden in Duitsland. Er is geen H5 specifieke aviaire influenza gevonden bij varkens in deze pilot. Op elk van 21 varkensbedrijven zijn meerdere influenzavirus stammen aangetoond en gesequenced. Op 4 daarvan zijn dit genetisch verschillende virusstammen. Bij 3 van deze bedrijven verschillen deze stammen op alle genoomsegmenten van elkaar, wat duidt op gelijktijdige circulatie van verschillende H1N1 varkensgriep varianten. Op één bedrijf zijn twee identieke H1 varkensinfluenzavirussen gevonden, die clusteren met alle segmenten bij de humane stammen. Het betreft geen reassortant, maar duidt op een recente mens op varken overdracht (anthropozoönose). Fylogenetische analyses laten zien dat er bij diverse andere gedetecteerde virussen wel uitwisselingen van genoomsegmenten (reassortments) plaats hebben gevonden, maar om dit goed te duiden zijn uitgebreidere analyses nodig.

Antivirale gevoeligheid

Het is belangrijk om de gevoeligheid van varkensinfluenza virussen voor medicijnen gericht tegen influenzavirussen te weten voor als mensen besmet raken met deze virussen en behandeling nodig hebben. Daar is nu weinig informatie over bekend. Alle 39 gekweekte virussen ontvangen bij RIVM zijn fenotypisch getest op antivirale gevoeligheid tegen oseltamivir en zanamivir en vergeleken met een set van humane influenzavirussen. Naast deze set zijn alle varkensinfluenzavirussen in het MPF genetisch gecontroleerd op markers voor resistentie. Enkele virussen bleken minder gevoelig voor baloxivir maar niet voor oseltamivir en zanamivir. Wel bleken alle varkensinfluenzavirussen resistent tegen amantidine en rimantidine zoals alle humane influenza A virussen dat ook zijn. De analyse laat zien dat, ondanks significante verschillen, de antivirale gevoeligheid voor varkensinfluenzavirussen over het algemeen niet gekenmerkt kan worden als verlaagd gevoelig ten opzichte van humane seizoensinfluenzavirussen. Het is wel goed om de antivirale gevoeligheid in de komende jaren te blijven vervolgen.

Antigene karakterisering

Antigene karakterisering van varkensinfluenzavirussen is nodig om te onderzoeken in hoeverre deze virussen veranderen ten opzichte van de immuniteit, die in mensen en dieren is opgebouwd en dus in hoeverre de nieuwe varianten kunnen gaan spreiden. Ook is het nodig om te weten of de humane pre-pandemische vaccinstammen van de WHO nog bescherming kunnen bieden tegen de in Nederland circulerende varkensinfluenzavirussen, mochten die naar mensen overstappen. Voor de varkenssector zelf is de informatie van belang voor het updaten voor vaccins voor varkens. Alle 26 gekweekte virussen ontvangen bij Erasmus MC zijn in de haemagglutinatieremming (HAR) getest tegen beschikbare frettersera. De meeste virussen die behoorden tot clade 1A.3.3.2 vertoonden nauwelijks reactiviteit met de beschikbare frettersera, wat aangeeft dat ze inmiddels fors antigeen afwijkend zijn van de "voorouder" A/California/7/2009. Verdere antigene karakterisering met nieuw te genereren frettersera is nodig. Ook de

geteste clade 1B.1.2.1 virussen vertoonden geen substantiële reactie met de beschikbare frettersera. Verdere antigene karakterisering met nieuw te genereren frettersera is ook hiervoor nodig. De 11 EA lineage virussen behorend tot clades 1C.2.1 en 1C.2.2 vertoonden wel substantiële reactie in de HAR met de frettersera die beschikbaar waren. Deze virussen werden goed herkend door frettersera opgewekt tegen de oudere virussen van clade 1C en recente virussen van clades 1C.2.1 en 1C.2.2. De EA virussen van clade 1C.2.1 en 1C.2.2 zijn met de beschikbare frettersera niet te onderscheiden.

Herkomst varkensinfluenzavirus duiden met MPF

Binnen de looptijd van deze pilot zijn in de regulier humane influenzavirus surveillance twee casussen van A(H1N2v) (2022) en A(H1N1) v (2023) varkensinfluenzavirus infectie bij mensen gevonden als toevalsbevinding, dus niet als gevolg van monitoring onder aan varkens blootgestelde mensen met luchtwegklachten. Bij de casus van 2022 kon directe blootstelling aan varkens in de ziektegeschiedenis worden vastgesteld en bleek dat het virus van de patiënt identiek was aan het virus op het bedrijf. Voor de casus van 2023 kon geen directe blootstelling aan varkens worden vastgesteld. Het virus van de patiënt bleek echter nauw verwant met varkensvirussen die in Nederland in 2023 in de pilot varkensinfluenzavirus surveillance zijn gevonden. De pilot surveillance varkensinfluenzavirussen heeft een belangrijke bijdrage geleverd om deze beide casussen te kunnen duiden.

Conclusies en aanbevelingen

Het aantal geanalyseerde varkensinfluenzastammen bleek voldoende om de diversiteit aan stammen in Nederland kaart te brengen. Verschillende soorten bedrijven zijn in de pilot geanalyseerd: conventionele varkensbedrijven, varkensbedrijven met buitenuitloop, gemengde bedrijven en bedrijven met meerdere verschillende varkensinfluenzavirussen op hetzelfde bedrijf. Ook bleek dat bij de humane casussen met een varkensinfluenzavirus de herkomst (antigene verwantschap) en antivirale gevoeligheid snel kon worden geduid met behulp van de MPF database.

Het advies is om het project meerjarig te vervolgen met een vergelijkbaar aantal te analyseren influenzavirussen. In dit project is een eerste fylogenetische analyse gemaakt. In een vervolgproject zullen uitgebreide fylogenetische analyses uitgevoerd moeten worden om zo meer inzicht te geven in de frequentie, de mogelijke rol in pathogenese, het zoönotisch potentieel van respectievelijk de reassortments en de rol van meerdere stammen op een varkensbedrijf. De in deze pilot geanalyseerde stammen worden internationaal gedeeld via de GISAID sequentiedatabase voor influenzavirussen.

Verder is het zinvol is om dit onlineplatform met de database niet alleen te continueren, maar ook te laten aansluiten bij het internationale EU4H project Strong1H, gecoördineerd door het RIVM met dezelfde partners. In dat project zullen ook varkensbedrijven met buitenuitloop en wilde zoogdieren onderzocht worden op influenza A virussen. Door aan te sluiten op EU4H Strong1H kunnen influenza virus sequenties van de zoogdieren systematisch worden verzameld, geanalyseerd en op

mutaties worden gecheckt met aviaire influenza uit wilde vogels en pluimvee. Dit kan mogelijk op dezelfde wijze met een referentieset zoals in de pilot voor humane influenzavirussen is gedaan. Binnen het One Health consortium kan vervolgens gezamenlijk duiding worden gegeven aan de gevonden influenzavirusstammen en risico's beter worden ingeschat mede in het kader van de pandemische paraatheid.

2 Inleiding

Varkensgriep is endemisch in veel landen in West-Europa. Voor influenzavirussen bij varkens bestaat geen monitoring in Nederland. Tijdens een risicobeoordeling in 2017 bleek dat influenzamonitoring bij varkens van toegevoegde waarde is voor het huidige influenza monitoringsprogramma gezien het mogelijke zoönotische potentieel van influenzavirussen van dierlijke oorsprong.

Directe aanleiding voor het opstarten van deze pilot was een casus in 2020, waarbij een man uit Limburg besmet bleek met een varkensinfluenzavirus (Eurasian-Avian like H1N1). Deze casus is dat jaar besproken in het Signaleringsoverleg Zoönosen (SO-Z). Echter, vragen over de besmetting van de patiënt en de oorsprong van het virus konden niet worden beantwoord door gebrek aan kennis en inzicht over de aanwezigheid van varkensinfluenzavirus stammen en varianten bij Nederlandse varkensbedrijven. Zodoende kon niet worden vastgesteld of dit virus bijvoorbeeld representatief was voor aanwezige varkensinfluenzavirusstammen. Van dit geïsoleerde virus is overigens binnen het WHO Global Influenza Programme (GIP) een nieuw "Candidate Vaccine Virus" (CVV) gegenereerd in het kader van het Pandemic Influenza Preparedness framework (PIP) (A/Netherlands/10370-1b/2020), evenals van een eerder Nederlands zoönotisch H1N1 virus (A/Netherlands/3315/2016).

In 2022 is daarom in een gezamenlijke opdracht van het ministerie van Volksgezondheid, Welzijn en Sport (VWS) en het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit, een pilotproject gestart om een geanonimiseerd en low level achtergrond surveillance programma op te zetten voor varkensinfluenzavirussen. Het doel van dit programma was het monitoren en karakteriseren van circulerende varkensinfluenzavirus stammen op Nederlandse varkensbedrijven en deze te vergelijken met influenzavirus stammen uit de humane populatie. Met deze informatie kan beter duiding worden gegeven aan de infectierisico's van varkensinfluenzavirussen voor publieke gezondheid.

Het belang voor een dergelijk surveillanceprogramma werd nog verder gesterkt door recente berichtgeving over de uitbraak van een nieuw zorgwekkend varkensinfluenzavirus (Eurasian Avian-like H1N1 virus genotype G4) in China met een hoog zoönotisch potentieel en de verspreiding van hoogpathogene vogelgriep (H5N1) onder wilde vogels en overdracht naar pluimveebedrijven zoals deze zich ook in Nederland heeft voorgedaan met als risico ook de overdracht naar varkens.

Sinds 2023 is er de meldingsplicht voor hoogpathogeen aviaire influenza (HPAI) bij zoogdieren ingesteld bij een positieve HPAI H5 laboratorium uitslag met PCR, HAR of ELISA. Bij pluimvee en wilde vogels was dit al meldingsplichtig.

Bij de mens is influenza ten gevolge van dierlijke influenzavirussen een meldingsplichtige ziekte groep B1. Daarvoor is het belangrijk meer inzicht in circulerende varkensinfluenzavirussen in Nederland te hebben,

zodat nieuwe humane zoönotische influenzacasussen met als oorsprong varkens beter te duiden zijn. Voor deze monitoring van influenzavirussen in varkens is samenwerking tussen de veterinaire en humane medische gezondheidszorg essentieel. Deze pilot is zodoende een samenwerking tussen RIVM, Royal GD (GD), Erasmus MC (EMC) en Wageningen Bioveterinary Research (WBVR).

In deze rapportage wordt een overzicht gegeven van de opzet en resultaten van deze pilot en worden ook aanbevelingen gedaan voor een meerjarig surveillancesysteem gebaseerd op de ervaringen uit deze pilot.

De pilot surveillance varkensinfluenzavirussen bestaat uit de volgende onderdelen, die hieronder in meer detail worden beschreven:

1. Opzetten van een surveillancesysteem.
2. Isolatie van influenzavirussen d.m.v. celweek.
3. Typering middels WGS op origineel en gekweekt materiaal.
4. Kwaliteitsrondzending ter vergelijking van de WGS-resultaten.
5. Opzetten humane-dierlijke influenza referentiedatabase voor opslag meta-data en sequenties.
6. Analyse van de varkensinfluenzavirussequenties in de context van relevante influenzavirussen uit de humane surveillance.
7. Antivirale gevoeligheidsbepalingen.
8. Antigene karakterisering van relevante stammen.
9. De sequenties worden gedeeld in Europese en wereldwijde initiatieven zoals het Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)-netwerk van WHO en OFFLU over pre-pandemische preparedness van varkensinfluenzavirussen bij mens en varken, via GISAID.
10. Opstellen van een samenwerkingsovereenkomst met afspraken over het delen van de data.

3 Methoden

3.1 Opzetten van een surveillancesysteem

a. Opbouwen nieuw peilstation netwerk van varkensdierenartsen
GD heeft binnen haar netwerk dierenartsenpraktijken benaderd die zich toeleggen op de veterinaire zorg van varkensbedrijven. Hen is gevraagd als peilstation actief deelnemer te worden van het varkensinfluenzasurveillancesysteem. In totaal hebben 10 dierenartsenpraktijken en 30 individuele dierenartsen zich hiervoor aangemeld.

b. Verzamelen van monsters vanuit het peilstationnetwerk
Deelnemende dierenartsenpraktijken ontvingen GD monsternamepakketten om de monsters op de varkensbedrijven te kunnen nemen. In het pakket zat een instructie met de inclusiecriteria, een instructie voor monstername, en een inzendformulier met een vragenlijst voor registratie van klinische verschijnselen. Per inzending werden 5 neusswabs van individuele dieren verzameld met een steriele FLOQswab in Universal Transport Medium (UTM) (Copan) en 4 groep-speekselmonsters met katoenen kauwtouwen (GD Happy bite monsterpakket [1]). Deze kauwtouwen werden 20-30 minuten aan de hokinrichting van een hok met varkens bevestigd, waarbij het uiteinde van het touw in het hok bereikbaar was voor de varkens. De dieren in het hok beten vervolgens in het touw waarbij speeksel in het touw achterbleef. Daarna werd het touw van de hokinrichting afgehaald en het speeksel uitgeknepen in een bijgeleverde buis. Aan dit speekselmonster werd vervolgens 1 ml virustransportmedium toegevoegd. De monsters werden vervolgens gekoeld naar GD gestuurd voor laboratoriumanalyse en opslag.

c. Verzamelen van aanvullende monsters vanuit de diagnostiek en historische opslag
Pathologisch onderzoek: GD ontvangt op jaarbasis ongeveer 2000 varkens voor postmortaal (sectie) onderzoek. Dit onderzoek wordt binnen GD uitgevoerd door gespecialiseerde veterinaire pathologen. Bij verdenking van een influenzavirusinfectie (longafwijkingen/ longontstekingen) wordt op longmateriaal van deze dieren de influenza A virus matrix PCR uitgevoerd. Ongeveer 2.5% (50) van deze dieren testen influenzavirus-positief. Tijdens deze studie zijn deze influenza A PCR positieve longmateriaalmonsters verzameld voor verdere opwerking en typering, evenals monsters, die voor routinediagnostiek werden ingestuurd. Ter aanvulling zijn nog 13 historische longmonsters (longenmateriaal) geselecteerd. Om uit te sluiten dat een sampling bias door de patholoog tot gevolg heeft dat monsters gemist worden is een batch van 30 longen zonder klinische verdenking van de patholoog met de influenza A virus matrix PCR onderzocht op de aanwezigheid van het influenzavirus.

d. Verzamelen van epidemiologische en klinische gegevens
In de vragenlijst voor de deelnemende dierenartspraktijken werd gevraagd naar bedrijfsgegevens, zoals de aan/afwezigheid van andere

diersoorten op het bedrijf (e.g., pluimvee, rundvee, kleine herkauwers, paarden), de toegang tot een buitenuitloop en de klinische verschijnselen. Deze klinische verschijnselen werden per diercategorie (b.v., biggen, gelten, zeugen) uitgevraagd. Uitgevraagde klachten besloegen: sloomheid, koorts, neusuitvloeiing, niezen, anorexie, hijgen, geforceerd ademen, bek open, buikslag, blijven liggen en sterfte. Specifiek voor de vermeerderingsdieren werd ook het terugkomen en abortus uitgevraagd. Tevens werd om een algemene indruk van de morbiditeit gevraagd. Van de (long)monsters uit de diagnostiek zijn behalve de bedrijfslocatie (regio), geen aanvullende bedrijfs- en klinische gegevens bekend voor deze surveillancepilot.

Van alle influenzavirus-positieve monsters die opgeslagen zijn, is vastgelegd uit welke regio de monsters afkomstig was. In verband met het voorkomen van herleidbaarheid, zijn 3 regio's gedefinieerd voor verdere analyse van rapportages: noord, midden en zuid. De regio noord omvat de provincies Groningen, Friesland, Drenthe en Overijssel, de regio midden omvat de provincies Gelderland, Utrecht, Noord- en Zuid-Holland, de regio zuid betreft de provincies Zeeland, Noord-Brabant en Limburg.

e. Verwerken van de samples

Monsters werden direct na aankomst gesplitst voor nadere verwerking en opslag. Een deel van het monster is direct opgeslagen bij $<-60^{\circ}\text{C}$. Het andere deel werd bewaard in de koelkast en binnen 2 werkdagen onderzocht op de aanwezigheid van het influenza A virus met behulp van een generieke influenza A (matrix) PCR. Alle influenzavirus-positieve monsters en de nucleïnezuur eluaten hiervan werden vervolgens ook opgeslagen bij $<-60^{\circ}\text{C}$. De influenzavirus-negatieve monsters werden niet opgeslagen en vernietigd.

f. Anonimiseren en naamgeving van de sequenties

Om te voorkomen dat monsters herleid konden worden naar individuele bedrijven zijn de monsters waarvoor sequentieanalyse is uitgevoerd geanonimiseerd. Een virusstam die het resultaat was van een viruskweek kreeg als monsternaam GDV-XXXXX. Een sequentieanalyse die uitgevoerd is direct op monstermateriaal en niet op een gekweekte virusstam kreeg als monsternaam GDE-XXXXX. De volgorde van het volgnummer XXXXX is willekeurig gekozen.

3.2 Isolatie van influenzavirussen d.m.v. celkweek.

Influenzavirusisolatie (het kweken of opgroeien van het virus) is batch-gewijs uitgevoerd door GD (in januari, februari en juni 2023) door het kweken van de virussen op een adherente monocellaag bestaande uit een mengsel van Madin-Darby Canine Kidney (MDCK-I) en MDCK-SIAT1 cellen. Deze cellen werden bij 37°C in een CO_2 -stoof (5%) gekweekt. Alleen monsters werden geselecteerd met een cycle threshold (Ct) waarde van de influenza A matrix PCR kleiner dan Ct 30, waarbij een lagere Ct waarde correspondeert met een hogere virale load. Wanneer meerdere monsters van hetzelfde bedrijf positief waren werd het monster met de laagste Ct-waarde geselecteerd. Celkweken werden dagelijks microscopisch beoordeeld op het ontstaan van een cytopathologisch beeld (CPE) en een influenza A matrix PCR en hemagglutinatietest werd uitgevoerd ter bevestiging van een positieve kweek.

3.3 Typering middels WGS op origineel en gekweekt materiaal

WGS-analyse is tijdens deze pilot uitgevoerd bij GD en WBVR. Hiervoor is oorspronkelijk materiaal en gekweekt virus gebruikt als uitgangsmateriaal. WBVR heeft de WGS uitgevoerd, zoals eerder beschreven [2]. In het kort, RNA van het influenzavirus is geïsoleerd met de High Pure Viral RNA kit (Roche). Het RNA is vermenigvuldigd door een universele 8 segment primer PCR en toen direct gesequenced. De gezuiverde amplicons zijn vervolgens met een hoge dekking gesequenced (gemiddeld >1000 nucleotide posities), met behulp van de Nextera XT DNA Library Preparation Kit en MiSeq paired-end 150-bp sequencing (Illumina). We hebben de consensus sequenties bepaald in de CLC Genomics Workbench (QIAGEN, Duitsland), waarbij gebruik is gemaakt van de referentie set van aviaire influenzavirussen die is aangevuld met referentie sequenties van varkensinflenzavirussen. GD heeft de WGS uitgevoerd, in essentie, zoals eerder beschreven door King en haar collega's (King, et al. 2020). In het kort, RNA van het virus werd geïsoleerd met de DNA/RNA pathogen kit (ThermoFisher). Het RNA is vervolgens met behulp van een universele primerset voor alle 8 segmenten geamplificeerd in een PCR. De PCR amplicons zijn gezuiverd met behulp van AMPure XP magnetic beads (Beckman). De Nanopore ligation-sequencing kit was gebruikt voor het opwerken van de amplicons en sequencing was uitgevoerd met behulp van Nanopore sequencing (Oxford Nanopore). De IRMA pipeline is gebruikt voor de assembly, variant calling en het maken van een consensus sequentie [3]. Sequenties zullen worden gedeeld via een internationale publieke database GISAID (zie onderdeel 9).

3.4 Rondzending ter vergelijking WGS-resultaten

Om te bevestigen dat locatie van WGS geen invloed heeft op de sequentie en typering is een rondzending georganiseerd. Twee varkensinfluenza A virussen van het A(H1N1) en A(H1N2) subtype werden geselecteerd en opgekweekt. Van beide virussen werd monstermateriaal, nucleïnezuur eluaat en het supernatant van de kweek, gealiquoteerd, ingevroren (<-60C) en opgestuurd naar de partners binnen het consortium voor WGS-analyse (zie **Tabel 1**). Resultaten van deze monsters (consensus sequenties en fastQ files) en feedback werden vervolgens teruggestuurd naar GD en geanalyseerd.

Tabel 1 Monsters voor de rondzending

Virus	Monster (Ct waarde)	Kweek (Ct-waarde)	Eluaat (Ct-waarde)	Subtype
gdv-12808	28.0	23.6	28.0	H1N2
gdv-15583	28.7	14.2	28.7	H1N1

3.5 Humane-dierlijke database voor opslag meta-data en sequenties verkregen met whole genome sequencing (WGS) van varkens- en humane stammen representatief voor elk griepseizoen

De WGS-resultaten van varkens worden gedeeld door de partners in de gezamenlijke animale-humane One Health database, die door RIVM is opgezet in het moleculair platform (MPF). Elke partner levert via een webportaal eigen sequenties en metadata aan in het MPF. Beheer van het MPF ligt bij het RIVM. Door systematische opslag van de metadata

en sequenties van varkensinfluenzavirussen kunnen deze onderling worden vergeleken en met relevante, representatieve humane influenzavirussen. Hiervoor zijn door RIVM sequenties geselecteerd als representanten van de in Nederland circulerende A(H1N1) pdm09 en A(H3N2) virussen (van de diverse clades met unieke hemagglutinine aminozuur compositie) van de griepseizoenen sinds 2014, van humane vaccinvirussen sinds 2011 en van alle gerapporteerde Nederlandse zoönotische varkensinfluenzavirussen sinds 1986. Typering van de segmenten gebeurt buiten het MPF door degene, die de sequenties aanlevert (submitter) en wordt in daarvoor aangemaakte velden per stam in de database opgeslagen. Dit gaat om het HA en NA type en de HA clade. Het MPF fungeert als een extra tool om in een beveiligde omgeving met de beschikbare gegevens extra data te kunnen delen en snelle analyses en visualisaties te kunnen uitvoeren. Het MPF is via internet bereikbaar voor WBVR, GD en het Nationaal Influenza Centrum (NIC) (RIVM & Erasmus MC referentie centra) met een login account en wachtwoord.

Eerder zijn al MPF-systemen opgezet voor humaan-dierlijke uitwisseling van onder andere hepatitis E virus (HEV). De hierin opgedane ervaringen zijn ingezet voor de opzet van deze varkensinfluenzavirus database.

3.6 Analyse van de varkensinfluenzavirus sequenties in de context van relevante influenzavirussen uit de humane surveillance.

Door het analyseren van de sequenties die verkregen worden middels WGS, zal inzicht worden verkregen welke stammen en subtypen circuleren, en of er aanwijzingen zijn voor uitwisseling (reassortment) van genetisch materiaal tussen verschillende stammen of subtypen van varken naar varken, maar juist ook varken naar mens en mens naar varken. Ook worden de varkensinfluenzavirussen geanalyseerd voor markers voor virulentie, adaptatie richting mens en resistentie tegen antivirale middelen als Oseltamivir en Baloxavir.

De sequenties worden zoals hierboven genoemd gedeeld via GISAID en daarnaast gedeeld in Europese en wereldwijde initiatieven zoals het Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)-netwerk van WHO en OFFLU over pre-pandemische preparedness van varkensinfluenzavirussen bij mens en varken.

3.7 Antivirale gevoeligheid.

Van de gedetecteerde varkensinfluenzavirussen waarvan een isolaat is verkregen wordt de fenotypische antivirale gevoeligheid voor neuraminidaseremmers bepaald en vergeleken met de gevoeligheid van humane influenzavirussen. Voor bepaling van de 50% remmende concentratie (IC₅₀) voor de neuraminidase remmers oseltamivir en zanamivir wordt de door WHO aanbevolen MUNANA assay gebruikt die in-house geoptimaliseerd is [4,5]. IC₅₀ data van alle humane influenzavirussen A(H1N1) pdm09 en A(H3N2) uit de humane griepsurveillance uit de periode 2019-2023 worden gebruikt voor vergelijking van varkens virus N1 met humaan virus N1pdm09 en varkens virus N2 met humaan virus N2 en beide subtypen met elkaar. De statistische test die gebruikt wordt om verschillen tussen dataset te

testen is de Mann-Whitney test voor ranks; $p < 0.05$ wordt als statistisch significant beschouwd.

Van de gedetecteerde varkensinfluenzavirussen waarvan sequenties zijn verkregen wordt het neuraminidase eiwit (NA), het polymerase acid eiwit (PA) en het matrix 2 eiwit (M2) geanalyseerd op het voorkomen van markers die (potentieel) kunnen leiden tot verlaagde gevoeligheid voor respectievelijk de antivirale middelen: neuraminidase remmers oseltamivir en zanamivir, polymerase remmer baloxavir marboxil en M2 blokkers amantadine en rimantadine.

3.8 Antigene karakterisering selectie van varkensstammen.

Op basis van de genetische karakterisering van de hemagglutinine (HA) eiwitten van de verkregen varkensvirussen wordt voor ieder van de circulerende virus subtypes en lineages een selectie gemaakt van representatieve virussen voor antigene karakterisering. Deze representatieve virussen worden in een hemagglutinatieremmingsreactie (HAR) vergeleken met nauw verwante virussen uit varkens en mensen uit historische of internationale collecties, waartegen frettersera zijn opgewekt. Wanneer er geen frettersera beschikbaar zijn die goed met de varkensvirussen reageren worden er nieuwe frettersera opgewekt, zodat een panel frettersera beschikbaar komt om alle in Nederland circulerende varkensvirussen (inclusief zoönosen) snel te kunnen karakteriseren. De HAR en de interpretatie en visualisatie daarvan met antigene kartografie wordt uitgevoerd zoals eerder beschreven [6].

3.9 Delen van Data in Europese en wereldwijde netwerken.

De sequenties worden gedeeld in Europese en wereldwijde initiatieven zoals het Global Influenza Surveillance and Response System (GISRS)-netwerk van WHO en OFFLU over pre-pandemische preparedness van varkensinfluenzavirussen bij mens en varken, via GISAID. In principe rapporteert ieder zijn/haar eigen sequenties. Wel is besloten om voor rapportage naar GISAID eerst met elkaar de sequenties te analyseren en te duiden. RIVM en EMC zullen de contacten onderhouden met de WHO en OFFLU.

3.10 Opstellen samenwerkingsovereenkomst.

Juridische zaken van het RIVM stelt bij de start van de pilot een samenwerkingsovereenkomst met afspraken over het delen van de data op. Uitgangspunten zijn dat het om een anonieme deling van data zal gaan, waarbij dan AVG wordt gerespecteerd. De conceptversie zal met de partners en hun juridische afdelingen worden afgestemd.

4 Resultaten

4.1 Verzameling circa 200 varkensinfluenzastammen.

Opzetten peilstations

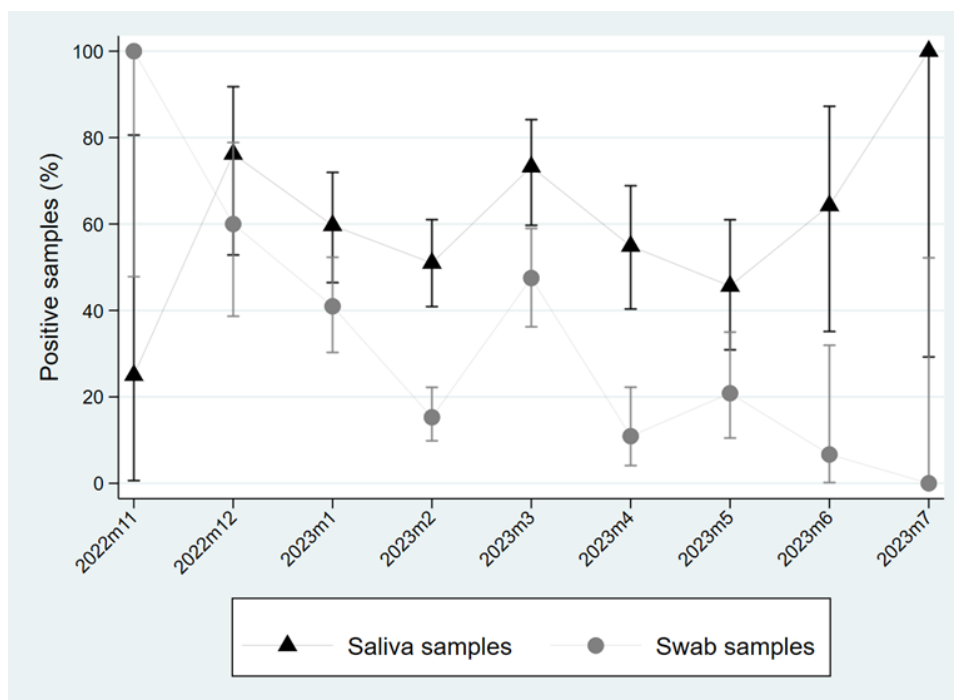
Het opzetten en betrekken houden van de peilstations bleek tijdrovend. Aan de ene kant toonden dierenartsen interesse om mee te werken, aan de andere kant was er twijfel over de mogelijke gevolgen van de resultaten van deze studie voor de varkenshouders. Dit toont aan dat bij samenwerkingen waarbij vanuit de One Health-gedachte de varkenssector betrokken wordt, er naast aandacht voor de klinische en inhoudelijke kant, ook aandacht moet zijn voor het bouwen aan vertrouwen binnen de sector. Hoe werk je samen, hoe interpreteer je samen de gevonden resultaten, met waardering voor ieders specifieke kennis? Uiteindelijk hebben 10 dierenartsenpraktijken en 30 individuele dierenartsen monsters verzameld bij de bij hen aangesloten varkensbedrijven. Een belangrijke motivatie van veel dierenartsen om mee te doen met het project was hun interesse in de uitslag. Deze uitslag bestond uit de resultaten van de influenza A matrix PCR en een subtypering op basis van een fylogenetische vergelijking met de in Nederland veel gebruikte varkensinfluenza vaccinstammen. Deze uitslag werd vervolgens gebruikt in de begeleiding van de gezondheid van de varkens op deze bedrijven. Om dierenartsen betrokken te houden en monsters in te blijven sturen is het belangrijk om de tijd tussen monsternamen en rapportage van de typering te verkorten tot maximaal 2 weken.

Verzameling van circa 200 varkensinfluenzastammen.

Gedurende het project (2022-2023) zijn er in totaal 913 monsters verzameld. Hiervan waren 825 monsters (364 speeksel-, 460 neusswabs en 1 longweefselmonster) afkomstig van de betrokken dierenartsenpraktijken uit het opgezette surveillance systeem. Daarnaast werden er 45 influenza PCR-positieve longweefsels verzameld in de sectiezaal van GD en 30 influenza PCR-positieve monsters uit de routinematige diagnostische monsterstroom. De longmonsters geselecteerd uit de sectiezaal afkomstig van varkens zonder verdenking van een influenza A virusinfectie waren allemaal negatief. De monsters uit het surveillance peilstationsysteem (n=825) waren afkomstig van 90 verschillende unieke varkensbedrijven. De meeste bedrijven (92%) namen met slechts één inzending deel aan het project. Twee bedrijven (6.7%) namen deel met 2 inzendingen en één met 3 inzendingen. Deelname per regio: 54% van de bedrijven bevond zich in regio zuid, 27% in noord en 8.9% in de regio midden (10% onbekend). Deze verdeling komt ruwweg overeen met de spreiding van varkensbedrijven over Nederland.

Gemiddeld bestond iedere inzending uit 5 monsters. Met in het achterhoofd dat de monsters genomen waren bij dieren met klinische verschijnselen, bleek dat het percentage positieve PCR-resultaten significant verschilde per monstertype. 57.9% van de speekselmonsters bleek positief, terwijl slechts 28.5% van de neusswabs positief bleek (Pearson's Chi-squared test; $P < 0.05$). Tijdens de gehele looptijd van de

studie kon influenzavirus worden aangetoond, al varieerde het percentage positieve monsters per monstertype gedurende de verzamelperiode (**Figuur 1**).



Figuur 1 Percentage PCR-positieve speeksel- (driehoek) en neusswab – monsters (cirkel) per maand tijdens de verzamelperiode (november 2022 - juli 2023).

Het percentage positieve bedrijven per regio verschilde. Het hoogste percentage positieve bedrijven werd gevonden in de regio noord (**Tabel 2**). Het verschil in percentage positieve bedrijven tussen de regio's laat zich moeilijk verklaren. De aanwezigheid van een hoog prevalentie stam die op veel bedrijven tegelijk circuleert in Nederland is niet aangetroffen. Dat zou kunnen betekenen dat er mogelijk bedrijfs- of dierenartskenmerken een rol kunnen spelen bij de verspreiding van influenzavirussen in Nederland. Bijvoorbeeld de afwezigheid van andere verwekkers van respiratoire klachten op dergelijke bedrijven. Het blijft derhalve belangrijk om in de verschillende regio's te monitoren.

Tabel 2 Percentage PCR positieve bedrijven per regio.

	Noord	Midden	Zuid	Onbekend
Regio	100% (24/24)	50% (4/8)	77.5% (38/49)	44.4% (4/9)

Achtergrond van de varkensbedrijven

Van de bemonsterde bedrijven (n=90) had 77,8% (70/90) tenminste 1 positieve PCR-uitslag. En op 3 (3.3%) van de bedrijven hadden varkens toegang tot een buitenuitloop. Bij al deze bedrijven werd tenminste 1 influenzavirus-positief monster gevonden.

Op tenminste 13 (23%) van de varkensbedrijven werden naast varkens ook andere diersoorten gehouden, waaronder pluimvee (n=4; 4.0%), waarvan 3 bedrijven tenminste 1 positieve PCR-uitslag had; herkauwers

(n=7; 7.8%), waarvan 6 bedrijven een positieve PCR-uitslag hadden; en paarden (n=2; 2.2%). Van 20 bedrijven was de uitloopstatus en andere aanwezige diersoorten niet bekend (22%) (**Tabel 3**).

Tabel 3 Bedrijven waar andere diersoorten aanwezig zijn

	Pluimvee	Alleen herkauwers	Alleen paarden	Geen ander vee	Onbekend
Aantallen	4 (4.0%)	7 (7.8%)	2 (2.2%)	55 (61%)	22 (24%)
(%)	3/4	6/7	2/2	40/55	19/22
PCR-positief (%)	75%	86%	100%	73%	86%

Wat de klinische verschijnselen betreft, helaas werd van 20 varkensbedrijven in geen van de leeftijdsgroepen informatie geregistreerd over klinische symptomen. In andere varkensbedrijven ontbrak informatie over klinische symptomen voor sommige leeftijdsgroepen. Dit kan komen doordat een bepaalde groep niet aanwezig is op het bedrijf, omdat er geen informatie is geregistreerd of omdat er geen klinische symptomen zijn waargenomen (en er geen "geen klinische symptomen" zijn geregistreerd). Wat betreft de varkensbedrijven waarvan er klinische gegevens voor tenminste één leeftijdsgroep beschikbaar waren, waren de gespeende biggen¹ het vaakst de groep dieren waarvan gemeld werd dat ze klinische symptomen vertoonden, gevolgd door zogende biggen. Beren werden zelden klinisch aangetast. Klinische symptomen bij biggen waren vaak koorts, sloom en ademhalingsymptomen, waaronder neusuitvloeiing, niezen en/of hoesten. Klinische symptomen bij gelten en zeugen omvatten vaak vruchtbaarheidsproblemen, koorts en sloom.

Tabel 4 geeft een samenvatting van het aantal varkensbedrijven dat klinische verschijnselen rapporteert in bepaalde leeftijdsgroepen, evenals het percentage van deze positieve bedrijven dat PCR-positief was in tenminste één monster.

Tabel 4 Samenvatting van de klinische verschijnselen op bedrijven

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Totaal	27	57	61	17	68	19	15	66	3
PCR-positief	23	48	50	11	55	14	11	52	2
%	85.2	84.2	82.0	64.7	80.9	73.7	73.3	78.8	66.7

A: Zogende biggen. B: Gespeende biggen. C: Biggen*. D: Gelten. E: Biggen* of gelten. F: Drachtige zeugen. G: Lacterende zeugen. H: Biggen* of zeugen**

I: Beren; *Biggen, zowel zogende als gespeende biggen; **Zeugen, drachtige of lacterende zeugen.

¹ Ongespeende biggen zijn biggen van 0-4 weken leeftijd. Gespeende biggen zijn varkens die geen moedermelk meer krijgen en deze dieren zijn 4-10 weken oud. Zodra een varken 10 weken oud is wordt ze vleesvarken genoemd. Deze varkens worden op ongeveer 6 maanden leeftijd geslacht. We spreken van zeugen en beren na ongeveer 8 maanden leeftijd. Zeugen zijn de varkens die biggetjes krijgen, beren zijn de mannelijke dieren op een varkensbedrijf en gelten zijn jonge vrouwelijke dieren die later zeug zullen worden.

4.2 Kweek van PCR positieve monsters en Typering door Whole Genome Sequencing

Binnen dit project werden in totaal 129 varkensstammen sequenced. Van deze sequenties waren er 100 compleet en van de incomplete sequenties misten met name sequenties van de drie langste genoom segmenten (coderend voor het polymerase complex PB2, PB1 en PA). Neusswabs en materialen afkomstig uit long (sectie) leverde betere sequentiekwaliteit op in vergelijking met speekselmonsters.

Tabel 5 Aantallen influenza WGS-sequenties

Influenza subtype	Subtype
H1N1	74
H1N2	51
H3N2	1
Onbekend (geen HA sequentie verkregen)	3
Totaal	129

4.3 Rondzendingen ter vergelijking van de WGS-resultaten

Binnen het project zijn verschillende monsters (origineel monster, kweek supernatant en eluaat) van een H1N1 en H1N2 stam verstuurd naar de samenwerkende laboratoria. De sequentieresultaten van deze labs zijn vervolgens teruggestuurd voor analyse naar het centrale lab (GD). Algemeen werden door alle labs (EMC, RIVM, GD, WBVR) de virussen correct gesequenced vanuit de verschillende monstermaterialen. Bij GD was het verschil in de coverage per segment het grootst, waarbij met name de coverage van de polymerase gensequenties (PB2, PB2, PA) achterbleef. Deze bevinding kwam ook tijdens de pilot zelf naar voren (zie hiervoor **sectie 4.3**).

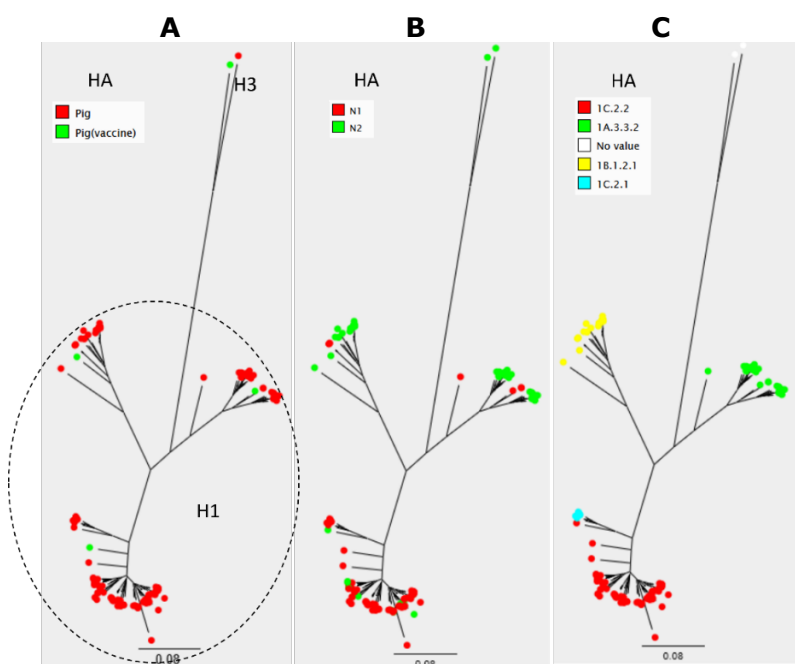
4.4 Humane-dierlijke influenza platform voor opslag meta-data en sequenties

De WGS-sequenties afkomstig van varkens werden samen met het anonieme GD biobanknummer (GDV), datum van monsternamen en bedrijfslocatie regio (Noord, Midden, Zuid) op het moleculair platform (MPF) geüpload (**Tabel 5**). Het MPF werd daarnaast aangevuld met sequenties van 4 varkens vaccinstammen en door RIVM met een referentieset van publiek beschikbare humane en zoönotische influenza stammen. Deze set bestond uit 193 influenza A(H1N1) pmd09 stammen gedetecteerd in Nederland tussen 2014 en 2023 en 319 Nederlandse A(H3N2) stammen uit diezelfde periode, elk met unieke HA aminozuur compositie. Daarnaast is de referentie set aangevuld met 24 internationale A(H1N1) pdm09 en A(H3N2) prototype vaccinstammen sinds 2011 en een set van de 9 stammen van bekende zoönose casussen tussen varken en mens in Nederland sinds 1986. Van deze varkensstammen is het HA en NA subtype aangegeven als H1v, H3v, N1v en N2v. Deze referentie set bevatte ook de H1vN1v stammen uit de recente humane varkensgriep casussen in Nederland.

4.5 Analyse van de varkensinfluenzavirus sequenties in de context van relevante influenzavirussen uit de humane surveillance

Fylogenetische analyses hebben als doel de verwantschap en verschillen tussen influenzastammen inzichtelijk te maken. Hierbij kan zowel de diversiteit in circulerende stammen geanalyseerd worden, alsmede de verwantschap met humane influenzavirussen. Een eerste globale fylogenetische analyse is uitgevoerd binnen het pilotproject. Algemeen beeld is de aanwezigheid van een grote diversiteit aan circulerende varkensstammen (**Figuur 2**). De H1 virussen behoren tot de Classical Swine (CS) lineage (allen clade 1A.3.3.2, dat wil zeggen pdm09-like), Eurasian Avian (EA) lineage (clade 1C.2.1 en clade 1C.2.2) en de Human Seasonal (HS) lineage (clade 1B.1.2.1).

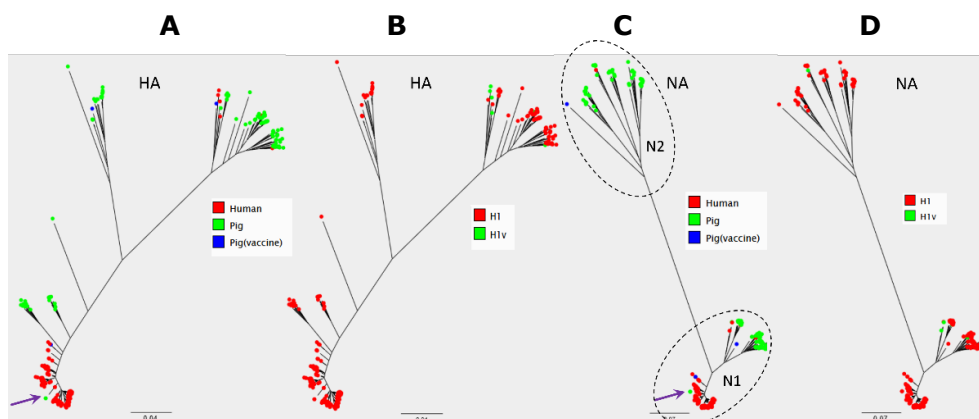
In figuur 2 zijn diverse weergaves gegeven van de verwantschap van het HA gen. In panel A is de verwantschap tussen de gedetecteerde stammen en bestaande vaccin stammen weergegeven, in panel B zijn de HA sequenties gekleurd op het corresponderende NA gen en in panel C zijn binnen het H1 cluster de *classical swine*, *human seasonal* en *Eurasian Avian lineages* weergegeven, in respectievelijk, de kleuren geel, groen, en rood. Buiten dit weergegeven cluster bevindt zich het enige gedetecteerde A(H3N2) virus. Deze HA behoort tot clade 2000.3 en dit virus is voor alle gensegmenten nauw verwant aan varkensvirussen, die in 2015-2016 circuleerden in Duitsland.



Figuur 2 Fylogenetische analyse van de varkensinfluenza HA segmenten. HA segment gekleurd op A) herkomst (pig = varkensinfluenza stam gedetecteerd binnen dit project, pig(vaccine) = de stammen gebruikt voor de ontwikkeling van beschikbare varkensgriep vaccins), B) NA type en C) HA clade.

Op basis van deze eerste analyses kan reeds geconcludeerd worden dat de waargenomen genetische virusdiversiteit groot is in vergelijking met de diversiteit tussen stammen in de humane populatie. Dit wil zeggen dat de verschillen tussen H1 stammen in varkens groter is dan binnen H1 virussen die momenteel voorkomen bij mensen. In de HA en NA

bomen is deze diversiteit het meest zichtbaar, waarin de humane H1 en N1 sequenties (in rood) sterk geclusterd zijn, terwijl deze voor de varkensstammen (in groen) verdeeld is over meerdere clusters (**Figuur 3A en C**).



Figuur 3 HA (A, B) en NA (C, D) segmenten van alle humane en varkensgriep stammen uit de MPF database, gekleurd op respectievelijk A) en C) herkomst (groen = varkensgroep stammen uit dit project, rood = humane influenza virussen en blauw = de stammen gebruikt voor de ontwikkeling van vaccins) en B) en D) varkens en humane H1 aangegeven in rood en zoönotische H1v en N1v in groen

De paarse pijl in Figuur 3 geeft twee identieke varkensvirussen van één bedrijf weer die clusteren met de virussen uit mensen. Deze bevinding suggereert dat er een besmetting van een varken heeft plaatsgevonden met een humane influenza A(H1N1) pdm09 virus afkomstig van mensen (antropozoönose) met vervolgens overdracht tussen varkens. Dit laatste blijkt uit het feit dat deze stam wel clusterd met alle segmenten bij de humane stammen, maar op elk segment wel enige genetische afstand heeft tot de humane stammen. Dit betreft dus geen reassortant, maar duidt op een mens op varken transmissie in de recente geschiedenis, al duidt de afstand tot de humane virussen op enige tijd van circulatie onder varkens.

Nadere fylogenetische analyses laten zien dat er diverse uitwisselingen van genoomsegmenten (reassortments) plaatsvinden. Nader onderzoek naar de aard hiervan zal meer inzicht geven in de frequentie hiervan en de mogelijk rol in pathogenese en zoönotisch potentieel.

De ene H3N2 varkensstam die gevonden is clusterd op alle segmenten met H3N2 virussen die in 2015-2016 in varkens en Duitsland werden gerapporteerd.

Van 21 bedrijven zijn bij elk meerdere stammen verzameld en gesequenced. Op 4 daarvan zijn dit genetisch verschillende stammen. Bij 3 van deze bedrijven verschillen deze stammen op alle segmenten van elkaar, wat duidt op gelijktijdige circulatie van verschillende H1N1 varkensgriep varianten.

Bij 1 bedrijf (code BX) verschillen de stammen op 4 van de 8 genoom segmenten (HA, NA, PB1, NA) en zijn ze vrijwel identiek op de andere 4 segmenten (PB2, NP, NS, MP). Het gaat hierbij om een H1N1 en een H1N2 stam. Dit duidt op uitwisseling (reassortment) van genoom segmenten tijdens gelijktijdige voorkomen van meerdere varianten op 1 bedrijf, waarbij 1 varken dan gelijktijdig is geïnfecteerd met beiden,

waardoor in dat varken reassortment kon optreden. Deze nieuwe variant is vervolgens vermoedelijk overgedragen op andere varkens op het bedrijf. Deze sequenties worden momenteel nader geanalyseerd en moeten meer opvolging krijgen om beter te duiden wat dit betekent.

Humane casussen met varkensinfluenzavirussen

Binnen de looptijd van deze pilot zijn in de regulier humane influenzavirus surveillance twee casussen van A(H1N2) v (2022) en A(H1N1) v (2023) varkensinfluenzavirus infectie bij mensen gevonden als toevallsbevinding en niet als gevolg van monitoring onder aan varkens blootgestelde mensen met luchtwegklachten. De pilot surveillance varkensinfluenzavirussen heeft hierbij een belangrijke bijdrage geleverd om deze beide casussen te kunnen duiden. Voor de casus van 2022, bij welke er directe blootstelling aan varkens in de ziektegeschiedenis kon worden vastgesteld, bleek met opvolging van bemonstering op het varkensbedrijf waar de casus was blootgesteld dat het virus van de patiënt identiek was aan het virus op het bedrijf. Voor de casus van 2023 kon geen directe blootstelling aan varkens worden vastgesteld. Het virus van de patiënt bleek echter zeer vergelijkbaar met varkensvirussen die in Nederland in 2023 in de pilot varkensinfluenza surveillance zijn gevonden.

4.6 Antivirale gevoeligheid varkensinfluenzavirussen

Bepaling van de antivirale gevoeligheid van varkensinfluenzavirussen is nodig om steeds vooraf te weten welke antivirale middelen bruikbaar zijn wanneer er sprake is van overdracht van varkensinfluenzavirus van varken naar mens. RIVM ontving daartoe van GD 39 isolaten voor fenotypisch testen op antivirale gevoeligheid. Het betrof 11 virussen van de Classical Swine (CS) lineage (allen clade 1A.3.3.2, d.w.z. pdm09-like), 20 virussen van de Eurasian Avian (EA) lineage (2 van clade 1C.2.1 en 18 van clade 1C.2.2) en 5 virussen van de Human Seasonal (HS) lineage (allen clade 1B.1.2.1). Drie hadden geen H- en/of N-subtype en clade aanduiding. Van 7, inclusief de 3 hiervoor genoemde, was de neuraminidase activiteit te laag voor een fenotypische neuraminidase gevoeligheid bepaling. Een poging om deze 7 op te groeien en alsnog te karakteriseren, loopt op het moment van schrijven van deze rapportage. Van 32 virussen (Tabel 6) werd de fenotypische gevoeligheid voor neuraminidase remmers oseltamivir en zanamivir bepaald. De buiten deze pilot uitgevoerde antivirale gevoeligheid analyse van de beide recente humane casussen van A(H1N2) v (2022) en A(H1N1) v (2023) varkensinfluenzavirus infectie is bij de huidige analyse meegenomen.

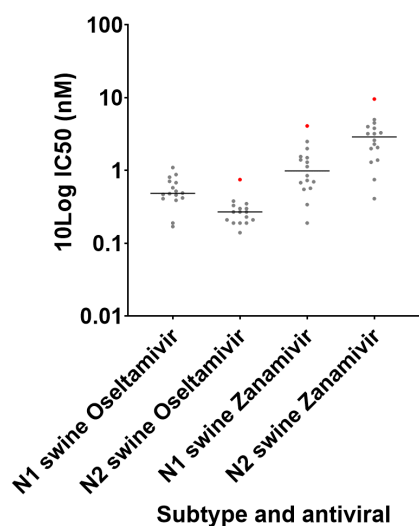
De verdeling van IC₅₀ waarden van de N1- en N2-subtype varkensinfluenzavirussen staat weergegeven in Figuur 4. Bij N1 zanamivir en N2 oseltamivir en zanamivir (van hetzelfde virus) was er één milde uitbijter waarde, die nog steeds als normaal geremd vallen te beschouwen (voud-verschil t.o.v. de mediaan <10). Wat echter wel opvalt is dat de spreiding in IC₅₀ waarden voor zanamivir (N1 range 3.91; N2 range 9.19) behoorlijk groter is dan voor oseltamivir (N1 range 0.93; N2 range 0.61) en waarbij het verschil tussen de hoogste en laagste IC₅₀waarde meer dan 10-voudig is. De oorzaak hiervan wordt onderzocht. Wat verder opvalt is dat N2 oseltamivir waarden significant lager zijn dan die voor N1 (p=0.0005), maar dat de N2 zanamivir waarden significant

hoger zijn dan die voor N1 ($p=0.0019$). Dat is vergelijkbaar met bevindingen voor humaan seizoensinfluenzavirus N1 en N2 (Figuur 5).

Tabel 6 Overzicht van virussen waarvoor de fenotypische gevoeligheid voor oseltamivir en zanamivir is bepaald.

Virus	Subtype	Lineage	Clade
A/Swine/Netherlands/719/2019	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/3247/2019	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/8711/2019	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/4322/2020	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/8376/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/9529/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/12899/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/16954/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/10495/2023	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/12189/2023	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/18903/2023	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/5652/2023	H1N1	EA	1C.2.1
A/Swine/Netherlands/11135/2023	H1N1	EA	1C.2.1
A/Swine/Netherlands/15583/2019	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/7975/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/12257/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/12875/2022	H1N2	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/15163/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/19458/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/3825/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/6151/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/9498/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/11053/2023	H1N2	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/11184/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/11595/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/15159/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/15331/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/16792/2023	H1N2	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/17298/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/20121/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/5591/2023	H1N2	HS	1B.1.2.1
A/Swine/Netherlands/13417/2023	H1N2	HS	1B.1.2.1

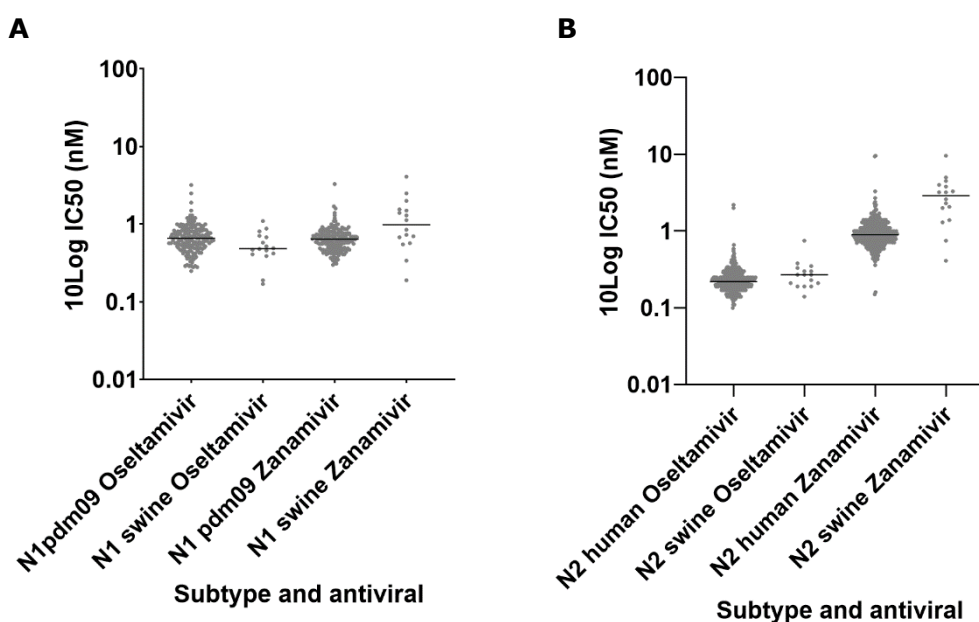
De verdeling van IC_{50} waarden van de N1- en N2-subtype varkensinfluenzavirussen staat weergegeven in Figuur 4. Bij N1 zanamivir en N2 oseltamivir en zanamivir (van hetzelfde virus) was er één milde uitbijter waarde, die nog steeds als normaal geremd vallen te beschouwen (voud-verschil t.o.v. de mediaan <10). Wat echter wel opvalt is dat de spreiding in IC_{50} waarden voor zanamivir (N1 range 3.91; N2 range 9.19) behoorlijk groter is dan voor oseltamivir (N1 range 0.93; N2 range 0.61) en waarbij het verschil tussen de hoogste en laagste IC_{50} waarde meer dan 10-voudig is. De oorzaak hiervan wordt onderzocht. Wat verder opvalt is dat N2 oseltamivir waarden significant lager zijn dan die voor N1 ($p=0.0005$), maar dat de N2 zanamivir waarden significant hoger zijn dan die voor N1 ($p=0.0019$). Dat is vergelijkbaar met bevindingen voor humaan seizoensinfluenzavirus N1 en N2 (Figuur 5).



Figuur 4 IC_{50} waarden voor oseltamivir en zanamivir per N-subtype varkensinfluenzavirussen en antiviraal middel. Rode stippen: uitschieters na Tukey Box and Whisker plot analyse.

De verkregen IC_{50} waarden zijn ook vergeleken met de IC_{50} waarden van humane seizoensinfluenzavirussen A(H1N1) pdm09 voor de varkensinfluenzavirussen met N1 neuraminidase (Figuur 5A) en met die van seizoensinfluenzavirussen A(H3N2) voor de varkensinfluenzavirussen met N2 neuraminidase (Figuur 5B). De data van de seizoensinfluenzavirussen zijn afkomstig van virussen verzameld in de respiratoire seizoenen 2019/2020 t/m 2022/2023 in de huisartsenpeilstation en Infectieradar algemene bevolking surveillance voor acute respiratoire infecties en virussen ingestuurd door laboratoria naar het RIVM voor karakterisering. Al deze seizoensvirussen zijn normaal geremd door oseltamivir en zanamivir, zodat dit goed kan functioneren om te bepalen of de varkensinfluenzavirussen een vergelijkbaar patroon laten zien wat past voor wildtype normaal geremd profiel voor oseltamivir en zanamivir. Een meer dan 10-voudig verschil in IC_{50} waarde van varkensinfluenzavirus t.o.v. de mediaan van het bijpassende N-subtype seizoensinfluenzavirus is een indicatie voor verlaagde remming en bij meer dan 100-voudig verschil indicatie voor sterk verlaagde remming. De voud-verschillen tussen de mediane IC_{50}

waarden voor varkensinfluenzavirussen en seizoensinfluenzavirussen per subtype en antiviraal zijn <10 (Tabel 7). Alleen het outlier varkens N2 in Figuur 4 heeft voor zanamivir net eenvoud-verschil waarde boven 10 (10.67) met mediaan seizoensinfluenzavirus N2. Dit is ook gevolg van het feit dat seizoensinfluenzavirus N2 een significant lagere mediane IC_{50} heeft vergeleken met die voor varkensinfluenzavirus N2 ($p < 0.0001$). Voor oseltamivir is de mediane IC_{50} voor varkensinfluenzavirus N2 ook hoger dan die voor seizoensinfluenzavirus N2, echter niet significant ($p = 0.0891$).



Figuur 5 IC_{50} waarden voor oseltamivir en zanamivir per N-subtype varkensinfluenzavirussen, humane seizoensinfluenzavirussen en antiviraal middel. (A) voor het N1-subtype en (B) voor het N2 subtype.

Het varkensinfluenzavirus N1 heeft een significant lagere mediane IC_{50} dan de seizoensinfluenzavirus N1 voor oseltamivir ($p = 0.0221$). Vergelijkbaar met N2 heeft varkensinfluenzavirus N1 een significant hogere mediane IC_{50} voor zanamivir dan die voor seizoensinfluenzavirus N1 ($p = 0.0055$). Deze analyse laat zien dat mediane IC_{50} referentiewaarden voor humane seizoensinfluenzavirus N1 en N2 niet toegepast mogen worden voor analyse van gevoeligheidsniveau van varkensinfluenzavirussen N1 en N2 en het vinden van varkensvirussen met verlaagde gevoeligheid voor neuraminidaseremmers oseltamivir en zanamivir. Toch laat de analyse ook zien dat, ondanks significante verschillen, het gevoeligheidsniveau voor varkensinfluenzavirussen op één uitbijter na niet gekenmerkt kan worden als verlaagd gevoelig ten opzichte van humane seizoensinfluenzavirussen (< 10 -voudig verschil medianen).

Tabel 7 Vergelijking van IC_{50} waarden van varkensinfluenzavirussen en humane seizoensinfluenzavirussen per N-subtype en antiviraal middel

N-subtype	Gastheer	Oseltamivir				Zanamivir			
		mediane IC_{50} (nM) (95% CI)	IC_{50} voud-verschil mediaan varken vs mediaan humaan	IC_{50} (nM) max varken	IC_{50} voud-verschil max varken vs mediaan humaan	mediane IC_{50} (nM) (95% CI)	IC_{50} voud-verschil mediaan varken vs mediaan humaan	IC_{50} (nM) max varken	IC_{50} voud-verschil max varken vs mediaan humaan
N1	Varken (n=16)	0.49 (0.41-0.71)	0.73	1.10	1.67	0.99 (0.57-1.55)	1.53	4.10	6.36
	Mens (n=185)	0.66 (0.61-0.70)				0.65 (0.61-0.68)			
N2	Varken (n=16)	0.27 (0.19-0.33)	1.23	0.75	3.41	2.90 (1.39-4.00)	3.22	9.60	10.67
	Mens (n=428)	0.22 (0.21-0.23)				0.90 (0.88-0.94)			

De mediane IC_{50} waarden voor varkensinfluenzavirus N1 en N2 in Tabel 7 kunnen als referentie genomen worden voor toekomstige analyse van het gevoeligheidsniveau van varkensinfluenzavirus N1 en N2 afkomstig van H1N1 en H1N2 van beschreven clades in Tabel 6. Een hoger aantal virussen zal vooral voor zanamivir de betrouwbaarheid van deze referentiewaarde verbeteren. De totaal aantallen per N1 en N2 waren te laag om een analyse uit te kunnen voeren op basis van verschillen in aminozuur compositie van het NA binnen N1 en N2 subtype. Dit zal onderdeel zijn van toekomstige studies.

Het NA-segment (n=126), PA-segment (n=126) en het M-segment (n=126) zijn geanalyseerd voor genetische markers voor verlaagde antivirale gevoeligheid voor respectievelijk neuraminidase remmers (oseltamivir en zanamivir), polymerase-remmer (baloxavir marboxil) en M2-blokkers (amantadine en rimantadine). Van de 126 virussen hebben er zeven (allen subtype A(H1N1)) een NA-Y155H aminozuurverandering die in voormalig humaan seizoensinfluenzavirus A(H1N1) hoog gereduceerde remming door oseltamivir en zanamivir veroorzaakte. Twee van de virussen met deze aminozuurverandering zijn fenotypische getest en bleken normaal geremd door oseltamivir en zanamivir. Waarschijnlijk is de volledige gensequentie van het varkensvirus NA meer overeenkomstig met het voormalig seizoensinfluenzavirus NA hiervan de oorzaak. Zoals dat ook het geval is voor A(H1N1) pdm09 humaan influenzavirus waar deze aminozuurverandering ook geen effect heeft op gevoeligheid voor neuraminidase remmers. De humane casus A(H1N1) v van 2023 bevatte ook NA-Y155H en bleek ook fenotypisch normaal geremd door oseltamivir en zanamivir. In twee virussen, een H1N1 en een H1N2 virus, is de aminozuurverandering PA-I38V gevonden. Deze aminozuurverandering geeft volgens de WHO-lijst voor humaan H1N1pdm09 virus een 2- to 4-voudig hogere IC_{50} waarde dan referentievirus. Een >3-voudig hogere IC_{50} waarde wordt als voorlopige grenswaarde gehanteerd voor verlaagde gevoeligheid voor baloxavir marmboxil. Fenotypische test bij een gespecialiseerd laboratorium (WHO CC Atlanta, VS en WHO CC Tokyo, Japan) kan bevestigen of deze aminozuursubstitutie in de achtergrond van varkens PA hetzelfde effect heeft. Tevens wordt gewerkt om deze gevoeligheidstest voor baloxavir ook binnen het consortium uit te kunnen voeren (RIVM). De beide humane casussen van A(H1N2) v (2022) en A(H1N1) v (2023) varkensinfluenzavirus infectie dragen geen markers voor verminderde gevoeligheid voor baloxavir marboxil. Alle 126 virussen dragen de M2-S31N aminozuurverandering die resistentie tegen M2-blokkers geeft. Van deze virussen dragen er 58 de M2-V27A aminozuurverandering, waarvan 52 ook M2-L26I, beiden veroorzaken ook M2-blokker resistentie. Daarnaast zijn er 7 die de combinatie M2-S31N met M2-L26F dragen en 1 die de combinatie M2-S31N met M2-V27I draagt. Beiden aminozuurveranderingen op positie 26 en 27 hebben ook M2-blokker resistentie tot gevolg. Kortom, alle virussen zijn ten gevolge van 1-3 aminozuurveranderingen in het M2 resistent tegen de M2-blokkers. De beide humane casussen van A(H1N2) v (2022) en A(H1N1) v (2023) varkensinfluenzavirus infectie hadden eenzelfde patroon van resistentie tegen M2 blokkers met respectievelijk M2-L26I, -V27A en -S31N en M2-S31N .

4.7 Antigene karakterisering varkensinfluenzavirussen

Antigene karakterisering van varkensinfluenzavirussen is nodig om te onderzoeken en te begrijpen in hoeverre bescherming door vaccinatie of eerdere infectie beschermt tegen de onderzochte virussen. EMC ontving 28 virusisolaten als een eerste batch van genetisch gekarakteriseerde virussen voor antigene karakterisatie. Het betrof 10 virussen van de Classical Swine (CS) lineage (allen Clade 1A.3.3.2, d.w.z. pdm09-like), 11 virussen van de Eurasian Avian (EA) lineage (2 van clade 1C.2.1 en 9 van clade 1C.2.2) en 5 virussen van de Human Seasonal (HS) lineage (allen clade 1B.1.2.1). EMC kon 2 virussen vooralsnog niet verder opgroeien en deze zijn dus nog niet verder gekarakteriseerd.

Tabel 8 Overzicht van virussen die antigeen gekarakteriseerd zijn.

Virus	Subtype	Lineage	Clade
A/swine/Netherlands/719/2019	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/swine/Netherlands/4322/2020	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/9529/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/10495/2023	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/12899/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/16954/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/18903/2023	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/3247/2019	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/8376/2022	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/Swine/Netherlands/8711/2019	H1N2	CS	1A.3.3.2
A/swine/Netherlands/11135/2023	H1N1	EA	1C.2.1
A/Swine/Netherlands/5652/2023	H1N1	EA	1C.2.1
A/swine/Netherlands/6151/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/19135/2019	H1N2	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/12257/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/12875/2022	H1N2	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/15163/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/15583/2019	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/19458/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/3825/2023	H1N1	EA	1C.2.2
A/Swine/Netherlands/7975/2022	H1N1	EA	1C.2.2
A/swine/Netherlands/5591/2023	H1N2	HS	1B.1.2.1
A/swine/Netherlands/8836/2022	H1N1	HS	1B.1.2.1
A/Swine/Netherlands/12808/2022	H1N2	HS	1B.1.2.1
A/Swine/Netherlands/13417/2023	H1N2	HS	1B.1.2.1
A/Swine/Netherlands/20413/2022	H1N2	HS	1B.1.2.1

De 26 virussen (Tabel 8) werden in de HAR getest tegen de in Rotterdam beschikbare frettersera (Tabel 9). Het betrof 1 fretterserum tegen een clade 1A.3.3.2 virus en 7 frettersera tegen diverse clade 1C virussen van varkens en mensen (zoönosen). De HAR werd uitgevoerd met rode bloedcellen van kalkoenen en met frettersera die tevoren werden behandeld met cholerafiltraat en een pre-adsorptie stap met rode bloedcellen van kalkoenen

Tabel 9 HAR tabel voor Nederlandse varkensvirussen. In iedere rij staat een virus, met informatie over subtype en clade. Clades zijn ook met kleur gemarkeerd. De Nederlandse virussen die door GD zijn ingestuurd zijn cursief vetgedrukt weergegeven. Iedere kolom aan de rechterkant geeft een frettenserum weer waartegen de virussen zijn getitreerd. De getallen zijn titers (eindpuntverdunding van de antisera) tegen de virussen, waarbij homologe titers vetgedrukt en onderlijnd zijn. Negatieve data zijn weergegeven als titers <10, in ongekleurde cellen.

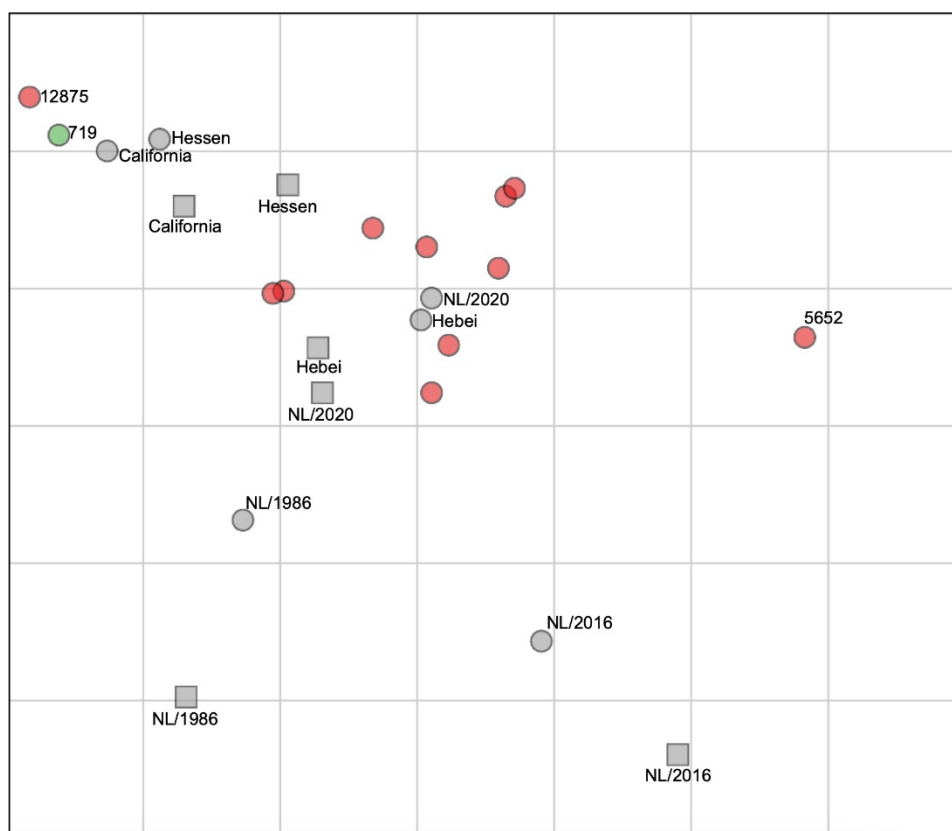
			A/Cal/7/2009	A/NL/386/1986	A/sw/Best/5M/1996	A/Bretagne	A/Hebei-haigang	A/Hessen/47/2020	A/NL/3315/2016	A/NL/10370-1b/2020
			F07/16	F562/3	F571	F41/21	F30/20	F02/21	F21/17	F18/21
A/California/7/2009	H1N1pdm	1A.3.3.2	640	80	<10	<10	640	480	<10	160
A/swine/Netherlands/719/2019	H1N2	1A.3.3.2	320	80	<10	<10	480	480	<10	120
A/swine/Netherlands/3247/2019	H1N2	1A.3.3.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/8711/2019	H1N2	1A.3.3.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/4322/2020	H1N2	1A.3.3.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/8376/2022	H1N2	1A.3.3.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/9529/2022	H1N2	1A.3.3.2	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/12899/2022	H1N2	1A.3.3.2	10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/16954/2022	H1N2	1A.3.3.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/10495/2023	H1N2	1A.3.3.2	40	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/18903/2023	H1N2	1A.3.3.2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/8836/2022	H1N1	1B.1.2.1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/12808/2022	H1N2	1B.1.2.1	<10	80	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/20413/2022	H1N2	1B.1.2.1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/5591/2023	H1N2	1B.1.2.1	<10	120	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/swine/Netherlands/13417/2023	H1N2	1B.1.2.1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
A/Netherlands/386/1986	H1N1	1C	480	480	240	<10	640	480	40	320
A/swine/Best/5M/1996	H1N1	1C	<10	1280	1920	<10	320	10	240	40
A/Bretagne/24241/2021 (E222G)	H1N2	1C.2.4	<10	<10	<10	2560	<10	10	<10	<10
A/Hebei-haigang/1572/2019	H1N1	1C.2.3	240	240	<10	<10	640	640	120	320
A/Hessen/47/2020	H1N1	1C.2.2	640	80	<10	<10	640	960	<10	160
A/Netherlands/3315/2016	H1N1	1C.2.1	40	240	40	<10	480	40	960	320
A/Netherlands/10370-1b/2020	H1N1	1C.2.1	480	80	<10	<10	480	320	120	640
A/swine/Netherlands/5652/2023	H1N1	1C.2.1	<10	40	<10	<10	320	80	80	160
A/swine/Netherlands/11135/2023	H1N1	1C.2.1	160	160	<10	<10	640	480	160	480
A/swine/Netherlands/19135/2019	H1N2	1C.2.2	960	240	<10	<10	1280	1280	80	480
A/swine/Netherlands/15583/2019	H1N1	1C.2.2	640	80	<10	<10	960	640	80	160
A/swine/Netherlands/7975/2022	H1N1	1C.2.2	240	160	<10	<10	480	480	40	320
A/swine/Netherlands/12257/2022	H1N1	1C.2.2	640	320	<10	<10	1280	1280	40	480
A/swine/Netherlands/12875/2022	H1N2	1C.2.2	240	40	<10	<10	320	320	<10	160
A/swine/Netherlands/15163/2022	H1N1	1C.2.2	240	120	<10	<10	640	640	160	80
A/swine/Netherlands/19458/2022	H1N1	1C.2.2	240	80	<10	<10	320	320	40	120
A/swine/Netherlands/3825/2023	H1N1	1C.2.2	480	160	20	<10	640	640	240	240
A/swine/Netherlands/6151/2023	H1N1	1C.2.2	240	80	<10	<10	320	320	40	160

De 10 CS lineage virussen (clade 1A.3.3.2, groen in Tabel 9) vertoonden nauwelijks reactiviteit met de beschikbare frettersera. Alleen virus A/Swine/NL/719/2019 gaf vergelijkbare HAR patronen met A/California/7/2009 (de clade 1A.3.3.2 "ancestor"). Verder was er slechts minimale kruisreactie meetbaar met het 1A.3.3.2 antiserum tegen 3 varkensvirussen van clade 1A.3.3.2. Dit geeft aan dat de meeste clade 1A.3.3.2 varkensvirussen in Nederland inmiddels fors antigeen afwijkend zijn van de "ancestor" A/California/7/2009. Verdere analyse met additionele frettersera die wel kruisreageren is nodig om de antigene karakterisering te voltooien.

De 5 HS lineage virussen (clade 1B.1.2.1, blauw in Tabel 9) vertoonden geen substantiële reactie met de beschikbare frettersera opgewekt tegen CS en EA lineage varkensvirussen. Frettersera tegen (homologe) HS lineage virussen waren niet beschikbaar. Slechts twee clade 1B.1.2.1 virussen gaven lichte kruisreactie met het fretterserum tegen het EA lineage virus A/NL/386/1986 (clade 1C). Verdere antigene karakterisering met additionele frettersera is ook hiervoor nodig.

De 11 EA lineage virussen (clades 1C.2.1 en 1C.2.2, oranje in Tabel 9) vertoonden wel substantiële reactie in de HAR met de frettersera die beschikbaar waren. Deze virussen werden goed herkend door frettersera opgewekt tegen de oudere virussen van clade 1C en recente virussen van clades 1C.2.1 en 1C.2.2. De EA-virussen van clade 1C.2.1 en 1C.2.2 zijn met de beschikbare frettersera niet te onderscheiden.

Een initiële antigene kaart werd gemaakt voor de beschikbare HAR data (Figuur 6). Zo'n kaart visualiseert in hoeverre virusstammen gelijk of verschillend zijn in hun antigene eigenschappen. Virussen die clusteren hebben vergelijkbare antigene kenmerken, waar virussen die verder weg liggen antigeen verschillend zijn. Aangezien meerdere (>3) numerieke waarden nodig zijn om virussen en sera goed te positioneren in de kaart zijn de posities van de meeste CS en HS lineage virussen en antisera niet betrouwbaar en behoeven nader onderzoek zoals hierboven reeds benoemd. De meeste Nederlandse EA lineage virussen van clade 1C.2.1 en 1C.2.2 clusteren dicht bij elkaar, binnen 2 antigene units van elkaar. Twee clade 1C.2.2 EA lineage virussen waren uitbijters (links en rechts in de kaart) De oudere Nederlandse clade 1C.2.1 en 1C.2.2 virussen uit 1986 en 2016 waren ook uitbijters, onderaan de kaart.



Figuur 6 initiële antigene kaart voor de hierboven getoonde HAR tabel. In de antigene kaart worden virussen (weergegeven als cirkels) en antisera (weergegeven als vierkanten) zo gepositioneerd dat de afstand hiertussen bij benadering omgekeerd evenredig is met de HAR titers. Hierdoor is in een oogopslag te zien welke virussen antigeen verwant zijn (dicht bij elkaar in een kaart) en welke antigeen verschillend zijn (ver van elkaar). De referentievirussen en sera die daartegen zijn opgewekt zijn weergegeven in grijs, de Nederlandse EA lineage virussen van clade 1C.2.1 en 1C.2.2 in rood en het Nederlandse CS lineage virus van clade 1A.3.3.2 in groen. De grid geeft 1 antigene unit (AU; een 2-voudige verdunning van antiserum) weer.

4.8 Rapportage en delen van sequenties internationaal.

De sequenties worden gedeeld in Europese en wereldwijde initiatieven zoals het WHO/GISRS netwerk en OFFLU (WOAH/FAO) samenwerking over pre-pandemische preparedness van varkensinfluenzavirussen bij mens en varken. Hiervoor wordt de GISAID database gebruikt en twee keer per jaar samenvattende rapportage uiterlijk een week voor de humane vaccinsamenstelling aanbevelingsvergadering van de WHO in februari en september. Daar wordt ook de selectie van pre-pandemische zoönotische kandidaat vaccin stammen besproken. (https://oiebulletin.fr/?panorama=03-3-2020-2_offlu). In deze pilot periode zijn de gegenereerde sequenties nog niet gedeeld met WHO en zullen na de nationale rapportage naar GISAID worden gestuurd.

4.9 Samenwerkingsovereenkomst

Juridische zaken van het RIVM heeft bij de start van de pilot een samenwerkingsovereenkomst opgesteld en deze is in het consortium met de partners meerdere keren besproken en aangepast.

Uitgangspunten zijn dat het om een anonieme deling van data zal gaan, waarbij dan AVG wordt gerespecteerd. Er is veel tijd genomen om de uitwisseling van de data goed te beschrijven en ook het gebruik van het moleculair platform is door de gelijktijdige inrichting hiervan visueel toegelicht. Dit heeft wel bijgedragen dat de samenwerkingsovereenkomst voor de verzameling en uitwisseling van data voor alle partijen kon worden getekend. Ervaringen en inhoud van deze samenwerkingsovereenkomst zal ook gebruikt worden als basis voor toekomstige projecten zoals het vervolgproject surveillance varkensinfluenza en het Strong1H project.

5 Discussie en aanbevelingen

Dit rapport beschrijft het opzetten van een varkensinfluenza surveillance. Hiervoor is een nieuw netwerk van dierenartsen peilstations opgezet en zijn positieve varkensinfluenzavirus PCR samples met WGS gesequenced voor genetische en fenotypische karakterisering en isolaten getest op gevoeligheid voor antivirale middelen en antigeen gekarakteriseerd.

5.1 Verzameling van monsters en influenza stammen, bedrijfstypen en beantwoording vraagstelling.

Dierenartsen bleken goed in staat om de dieren te identificeren die verdacht waren van een influenzavirusinfectie. Ongeveer 41% van de verzamelde monsters was positief op influenzavirus type A. Om de verzameling van monsters op gang te krijgen en te houden bleek het (veelvuldige) contact met de peildierenartsenpraktijken essentieel. Ten eerste voor de uitleg van de doelstelling van de bemonstering en tevens voor de uitleg over de monsternamen zelf. In het vervolg bleef contact essentieel voor het versturen van de monsternamenpakketten en om de varkensdierenartsen te blijven motiveren om bij griepachtige verschijnselen monsters te nemen. Daarnaast is het ook belangrijk om de resultaten te blijven bespreken. De contacten blijven onderhouden is zeker ook belangrijk met de bedrijven waar opvolging in het vervolgproject noodzakelijk is.

Voor de dierenartsen en de varkenshouders bleek de rapportage van de resultaten essentieel. Het raakt aan "*what's in it for me?*". Ze willen graag meedoen, maar graag zelf ook meer kennis opdoen over de gezondheid van hun dieren.

Om dit project langdurig te laten functioneren is het verkorten van de tijd van monsterafname tot een uitslag voor de inzendende dierenarts en varkenshouder essentieel.

Het aantal stammen dat in dit project werd verzameld bleek voldoende om te voldoen aan de vraagstelling die voorafgaand aan het project geformuleerd was. Er zijn bedrijven bemonsterd waar de varkens toegang hebben tot een buitenuitloop. Er zijn varkens bemonsterd op bedrijven waar andere dieren, waaronder pluimvee, aanwezig waren (gemengde bedrijven). Er zijn bedrijven gevonden waar meerdere influenzavirus stammen tegelijk lijken te circuleren. Er is een recent introductie event van humaan naar varken aangetroffen. En de database van stammen bleek bij de humane casus van infectie met een varkensinfluenzavirus in augustus 2023 informatie te leveren over de aangetroffen stam.

5.2 H3N2

Er is in de verzameling van monsters/sequenties maar eenmaal een H3 influenzavirus aangetroffen. Het weinig voorkomen van H3 komt overeen met andere recente onderzoeken (7;8). Deze onderzoeken zijn net als deze pilot gebaseerd op passieve surveillance op basis van de aanwezigheid van klinisch verschijnselen. De vraag of H3 stammen bijna niet meer aanwezig zijn bij varkens in de Nederlandse varkenshouderij,

of dat deze stammen minder klinische verschijnselen veroorzaken, waardoor de inclusiecriteria van de monsternamen ervoor gezorgd heeft dat de prevalentie van H3 onderbelicht is kan alleen maar verklaard worden door een actief surveillance van influenza A in varkens (dus niet alleen maar op basis van klinisch verschijnselen). Tevens kan er een selectiebias zijn in de positieve monsters en zorgt een H1 infectie voor lagere Ct waardes (hogere virale load), waardoor binnen een inzending van een 1 locatie op 1 bepaald tijdstip de H1 stammen geselecteerd zijn voor verdere moleculaire typering. Om deze bias in samples te ondervangen zullen in het vervolg alle positieve monsters gescreend worden met een H3 specifieke typerings-PCR. Mocht blijken dat er binnen een inzending samples zijn met een hogere Ct, maar wel met een H3, dan kunnen deze monsters extra geselecteerd worden voor moleculaire typering. Mocht er met deze aanpassing van de werkwijze nog steeds bijna geen H3 stammen worden gevonden, kan ervoor gekozen worden om de inclusie/selectiecriteria op het varkensbedrijf aan te passen.

5.3 Whole Genome Sequencing (WGS)

Het consortium heeft succesvol WGS-resultaten onderling uitgewisseld en gezamenlijk geanalyseerd. Sequencing resultaten zijn goed vergelijkbaar. Dit geeft de mogelijkheid om bij specifieke vraagstellingen op te schalen en voorkomt afhankelijkheid van één laboratorium. Verdere ontwikkeling van *analyses pipelines* waarin sequentie data van de diverse subtypen varkensinfluenza goed en snel geanalyseerd worden blijft nodig.

5.4 Moleculair Platform

Er is een database opgezet (MPF) waarin sequentiedata en achtergrondgegevens door de partners gedeeld en geanalyseerd kunnen worden. Elke partner heeft hierin toegang tot de beschikbare data. De projectleden hebben sequenties gedeeld in deze besloten database vóór de laatste controleslagen en administratieve stappen die nodig zijn voor het delen naar het publieke domein. Dit levert tijdswinst op, zodat Nederlandse data gearchiveerd worden, gezamenlijk inzichtelijk gemaakt kunnen worden en bijzonderheden sneller opgepikt worden. Op deze wijze is de meerwaarde dat de analyses gezamenlijk in een One Health setting uitgevoerd kunnen worden, zodat voor het duiden van de gegevens alle aanwezige expertise (moleculair virologisch, veterinaire en humaan medisch) direct ingezet kan worden in het netwerk.

Diverse analyse tools zijn succesvol geïmplementeerd in het MPF, waaronder weergave van enkele virus eigenschappen en diverse fylogenetische analyses en weergaves. Met name reassortment analyses zijn complex en behoeven nog meer gestandaardiseerde analysemethodes.

Het moleculair platform moet nog worden uitgebreid met internationale referentievirussen van varkens. Een complete wereldwijde dataset is toegezegd door het referentielaboratorium voor varkensinfluenza in de Verenigde Staten.

5.5 Antivirale gevoeligheid

Uit de analyse van antivirale gevoeligheid blijkt dat alle geanalyseerde virussen resistent zijn tegen M2-blokkers amantadine en rimantadine door 1 tot 3 aminozuurveranderingen in het M2 eiwit. Dit is vergelijkbaar met humane seizoensinflenzavirussen waar praktisch alle influenza A virussen resistent zijn tegen M2-blokkers door de M2-S31N aminozuurverandering. Uit die analyse blijkt ook dat alle geanalyseerde virussen normaal gevoelig zijn voor de neuraminidase remmers oseltamivir en zanamivir op basis van NA eiwit analyse, bevestigd met fenotypische analyse voor een subset van de virussen met H1N1 en H1N2 subtype. Deze fenotypische analyse geeft een goede voorlopige schatting van het niveau van gevoeligheid voor neuraminidase remmers. Dit is het uitgangspunt voor volgen van gevoeligheid van varkensvirussen op langere termijn, en breidt de wereldwijde kennis over gevoeligheid van influenzavirussen voor neuraminidase remmers uit. Dit is ook relevant als uitgangspunt voor humane therapie en profylaxe mocht er (uitgebreide) transmissie van varken naar mens gaan optreden. Op enkele virussen na zijn alle virussen op basis van analyse van bekende markers gevoelig voor het nieuwe antivirale middel baloxavir marboxil. Twee virussen dragen een aminozuurverandering die bij humane virussen leidt tot milde resistentie tegen baloxavir marboxil. Voor deze virussen is nader onderzoek door referentielaboratoria van de WHO nodig om de fenotypische gevoeligheid te bepalen, zolang deze technieken in Nederland nog niet geïmplementeerd zijn. Deze bevinding voor varkensinflenzavirussen is ook nieuw en van belang voor internationale rapportage.

De beide humane casussen van A(H1N2) v (2022) en A(H1N1) v (2023) varkensinflenzavirus infectie hadden eenzelfde patroon van resistentie tegen M2 blokkers en normale gevoeligheid voor neuraminidaseremmers oseltamivir en zanamivir en polymerase remmer baloxavir marboxil. De huidige bevindingen van deze pilot laten het nut zien van analyse van varkensinflenzavirussen voor antivirale gevoeligheid in kader van opties voor humane therapie en profylaxe, mocht er doorgaande transmissie van varken naar mens en mens naar mens met ernstige ziekte tot gevolg gaan optreden. Een continue monitoring van antivirale gevoeligheid van varkensinflenzavirussen is daarom aan te bevelen.

5.6 Antigene diversiteit

Er is naast de grote genetische diversiteit ook grote antigene diversiteit tussen de in Nederland circulerende varkensvirussen. Voor de Classical Swine lineage virussen is nauwelijks nog kruisreactie te zien met het "oudervirus" A/California/7/2009. Voor de Eurasian Avian lineage virussen is diversiteit klein binnen de onderzochte recente virussen maar fors t.o.v. de oudere virussen die in Nederland als zoönosen werden gemeld in 1986 en 2016. We kunnen geen conclusies trekken voor de Human Seasonal lineage omdat (nog) geen sera met kruisreactiviteit beschikbaar zijn. Deze antigene karakterisering laat duidelijk de noodzaak zien om referentiepanels van virussen en antisera op peil te brengen.

Nieuwe sera zijn nodig voor antigene karakterisering van virussen van m.n. de Classical Swine en Human Seasonal lineages. Voor alle 3 lineages (CS, HS, EA) worden momenteel nieuwe frettersera gegenereerd tegen 2 genetische varianten. Er is met het Wereld

Influenza Centrum (WIC, Crick Institute, Londen) afgesproken om sera uit te wisselen en zo de investering te beperken. Dat neemt niet weg dat lokaal nog meer frettensera moeten worden gegenereerd om de genetische en antigene diversiteit van varkensvirussen in Nederland goed in kaart te brengen.

De tweede batch virussen die klaar staat bij GD bevat ook weer nieuwe genetische varianten waarvoor een antigene karakterisering nodig is. Meest praktisch is om nieuwe analyse van de CS en HS lineage virussen voorlopig uit te stellen totdat nieuwe sera beschikbaar zijn en te beginnen met de lineages waarvoor wel voldoende sera beschikbaar zijn.

5.7 Humane casussen

De H1N1v humane casus, die door RIVM in Nederland in augustus werd gemeld was genetisch nauw verwant aan de virussen in onze antigene kaart (zie Figuur 6). Op basis van de genoomsequentie kon dus direct een goed onderbouwde interpretatie van de antigene eigenschappen worden gemaakt, die – door de beschikbaarheid van referentievirussen en antisera – ook direct experimenteel kan worden bevestigd. Op basis van deze data heeft het WIC al aangegeven een nieuwe pre-pandemische CVV (candidate vaccine virus) te willen maken. Om met zoönosen in de toekomst even voortvarend te kunnen optreden is het zinvol de genetische en antigene karakterisering van varkensvirussen in Nederland door te zetten en referentiematerialen (database, virussen, antisera) up-to-date te brengen.

5.8 Aanbevelingen

Deze pilot was opgezet om een beter beeld te krijgen van de circulerende influenza A virus stammen in de Nederlandse varkenspopulatie. De pilot heeft al waardevolle inzichten geleverd betreffende de genetische en antigene diversiteit in varkensinfluenzavirus stammen en hun antivirale gevoeligheid, wat het belang (noodzaak) om deze surveillance voort te zetten illustreert. In deze pilot zijn ook influenzavirussen aangetroffen en geanalyseerd bij varkens op varkensbedrijven waar andere diersoorten aanwezig waren (gemengde bedrijven). Het advies is dan ook deze surveillance de komende jaren te continueren. Hierbij kan met het huidige aantal varkensinfluenzavirussen al veel inzicht verkregen worden in de eigenschappen van de verschillende subtypen influenzavirussen. Vanwege bovengenoemde mogelijke selectiebias zal in het vervolg bij de diagnostiek al specifiek getest worden op H3.

De introductie van humane influenzavirus type A subtypen in de varkenspopulatie zoals nu is gevonden, kan in een vervolgproject verder worden opgevolgd. Dit kan helpen in het voorspellen van het zoönotisch potentieel van deze virussen alsmede het inschatten van het risico op de vorming van nieuwe reassortments. Hiervoor zullen de sequenties van de stammen aanwezig in het MPF wel nog dieper moeten worden geanalyseerd, omdat na een eerste, meer algemene analyse hiervoor de tijd nu ontbrak.

Eventuele nieuwe humane infecties met varkensinfluenzavirus kunnen met een voortgaande surveillance ook beter in context geplaatst worden van circulerende varkensinfluenzavirussen in Nederland, zoals bij de recente casussen. Zeker als er geen duidelijk contact met varkens in de klinische geschiedenis van de patiënt aangetroffen wordt, zoals bij de laatste casus, in 2023. Ook de monitoring van de antivirale gevoeligheid is een belangrijk onderdeel van de toekomstige monitoring omdat hier nog heel weinig kennis over aanwezig is en voor vroegtijdige detectie van veranderingen in antivirale gevoeligheid die gevolgen hebben voor de keuze van antivirale middelen bij behandeling na transmissie van varkensinfluenzavirus van varken naar mens.

De antigene karakterisatie zal ook een belangrijk onderdeel zijn omdat naast de grote genetische diversiteit ook grote antigene diversiteit tussen de in Nederland circulerende varkensvirussen is gevonden, waarbij het nu niet goed mogelijk is om conclusies te trekken over de antigene verwantschap van humane seizoensinfluenzavirussen met varkensinfluenzavirussen door gebrek aan goed reagerende recente referentiesera tegen een deel van de gevonden varkensinfluenzavirussen. Dit is relevant om te bepalen of, en in welke mate, er mogelijk immuniteit in de humane populatie tegen varkensinfluenzavirussen is. Daarom is het nodig om referentiepanels van virussen en antisera op peil te brengen door van deze groep nieuwe sera te ontwikkelen. Dit zal ook een onderdeel van het vervolg moeten zijn.

De combinatie van de aanwezige online analysetools en de op de Nederlandse situatie toegespitste referentieset maakte het mogelijk om snel informatieve fylogenetische bomen te genereren en te analyseren. Bij een eventueel vervolgproject zou het zinvol zijn om dit online platform met de database niet alleen te continueren, maar ook te gebruiken en uit te breiden voor aviaire influenzavirussen. De virussequenties afkomstig van de zoogdieren kunnen op deze wijze systematisch worden verzameld, geanalyseerd en op mutaties worden gecheckt met aviaire influenza uit wilde vogels en pluimvee. Mogelijk op dezelfde wijze met een referentieset zoals nu ook voor de humane influenzavirussen wordt gedaan. Deze opzet zal de komende drie jaar verder worden onderzocht in het EU4H Strong1H project, waarbij het One Health consortium vervolgens gezamenlijk duiding zal geven aan de gevonden influenzavirusstammen om zo de zoönotische risico's beter in te kunnen schatten.

6 Dankwoord

We bedanken alle dierenartsen en varkenshouders voor inzenden van monsters van varkens aan GD. We bedanken van GD, Corneel Vermeulen en Rianne Buter voor sequentieanalyse, Christiaan Sanderman, Lucia Díeste en Bas Engel voor contact met het netwerk, Rick Elbert voor het kweken en sequencen van de virussen en Henk-Jan Brokers voor projectmanagement. We bedanken Frank Harders en Rene Heutink voor de WGS-analyse bij WBVR. Ook bedanken we de analisten Marima Bagheri, Gabriel Goderski en Sharon van den Brink (RIVM) voor bepaling van de antivirale gevoeligheid, doorkweken en sequencing van de varkensinfluenzavirus isolaten ontvangen van GD. We bedanken hen, en in hen andere analisten in het RIVM-team, ook voor hun bijdrage in het verkrijgen van de dataset van humane influenzavirussen in Nederland. Analisten Mark Pronk en Pascal Lexmond by Erasmus MC worden bedankt voor de antigene karakterisering van de virussen. We bedanken GISAID en collega's die sequenties via GISAID beschikbaar hebben gesteld van de in dit onderzoek gebruikte humane prototype vaccin influenzavirussen. Tot slot bedanken we Arieke Dokters van Leeuwen voor de ondersteuning bij het projectmanagement.

7 Referenties

[1] <https://edepot.wur.nl/203168>

[2] Emerg Infect Dis. 2017 Dec;23(12):1974-1981. doi: 10.3201/eid2312.171062. *Multiple Reassorted Viruses as Cause of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Epidemic, the Netherlands, 2016*. Nancy Beerens, Rene Heutink, Saskia A Bergervoet, Frank Harders, Alex Bossers, Guus Koch

[3] BMC Genomics. 2016 Sep 5;17(1):708. doi: 10.1186/s12864-016-3030-6. *Viral deep sequencing needs an adaptive approach: IRMA, the iterative refinement meta-assembler*. Samuel S Shepard, Sarah Meno, Justin Bahl, Malania M Wilson, John Barnes, Elizabeth Neuhaus

[4] Antiviral Res. 2009 Sep;83(3):290-7. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.07.003. Epub 2009 Jul 8. *Dynamics of antiviral-resistant influenza viruses in the Netherlands, 2005-2008*. M Jonges, I M van der Lubben, F Dijkstra, L Verhoef, M Koopmans, A Meijer

[5] Antiviral Res. 2014 Oct;110:31-41. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.07.001. *Global update on the susceptibility of human influenza viruses to neuraminidase inhibitors, 2012-2013*. Adam Meijer, Helena Rebelo-de-Andrade, Vanessa Correia, Terry Besselaar, Renu Drager-Dayal, Alicia Fry, Vicky Gregory, Larisa Gubareva, Tsutomu Kageyama, Angie Lackenby, Janice Lo, Takato Odagiri, Dmitriy Pereyaslov, Marilda M Siqueira, Emi Takashita, Masato Tashiro, Dayan Wang, Sun Wong, Wenqing Zhang, Rod S Daniels, Aeron C Hurt

[6] J Virol. 2007 Apr;81(8):4315-22. doi: 10.1128/JVI.02458-06. Epub 2007 Feb 7. *Antigenic and genetic evolution of swine influenza A (H3N2) viruses in Europe*. J C de Jong, D J Smith, A S Lapedes, I Donatelli, L Campitelli, G Barigazzi, K Van Reeth, T C Jones, G F Rimmelzwaan, A D M E Osterhaus, R A M Fouchier

(7) Cell Host Microbe. 2020 Oct 7;28(4):614-627.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.07.006. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32721380. *Surveillance of European Domestic Pig Populations Identifies an Emerging Reservoir of Potentially Zoonotic Swine Influenza A Viruses*. Henritzi D, Petric PP, Lewis NS, Graaf A, Pessia A, Starick E, Breithaupt A, Strebelow G, Luttermann C, Parker LMK, Schröder C, Hammerschmidt B, Herrler G, Beilage EG, Stadlbauer D, Simon V, Krammer F, Wacheck S, Pesch S, Schwemmler M, Beer M, Harder TC.

(8) Dynamic swine flu map van CEVA:
<https://swine.ceva.com/home/diseases/dynamic-swine-flu-map/>

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven

Nederland

www.rivm.nl

november 2023

De zorg voor morgen
begint vandaag