

Projektleder KU/SSI	Anette Boklund (KU)
Projektgruppe	Anne Sofie Hammer (KU), Anette Bøtner (KU/SSI), Thomas Bruun Rasmussen (SSI), Graham John Belsham (KU), Tariq Halasa (KU), Søren Saxmose Nielsen (KU), Jens Frederik Agger (KU), Anders Fomsgaard (SSI), Morten Rasmussen (SSI), Tyra Grove Krause (SSI), Thomas Richter (SSI), Helle Daugaard Larsen (SSI), Tinna Ravnholt Urt (SSI), Brian Kristensen (SSI), Jannik Fonager (SSI), Frederikke Kristensen Lomholt (SSI)
Fagfællebedømmer	
Kontaktperson i FVST	Sten Mortensen, Karsten Aagaard, Stine Kjær-Andersen, Tenna Jensen, Francisco Fernando Calvo Artavia

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
19-06-2020	02-10-2020	02-10-2020	1

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2020-14-81-01705	061-0115/20-3680	20/06443

Besvarelse vedr.

▸ Epidemiologisk udredning i SARS-COV-2 smittede minkfarme

▸ Conclusion and perspectives

▸ SARS-CoV-2 has not been detected in Danish mink farms until late in the within-farm epidemic. This complicates and reduces the possibility for implementing biosecurity measures with the purpose of reducing the risk of virus transmission from mink to humans. Phylogenetic analyses of viruses from infected mink and from persons connected to mink farms who have been infected with SARS-CoV-2, together with a comparison of the times of infection and the development of the infection in the mink farms show that it is extremely likely (95-99%) that both human-to-mink and mink-to-human transmission occurs. Survival analysis shows that short distance to the nearest SARS-CoV-2 positive farm and large farm size has been associated to the risk of infection. It has not been possible to identify other risk factors. In mink, changes have been detected in several regions of the virus genome, including within the sequence encoding the spike protein. This protein is important for stimulating immunity during either infection or after potential vaccination. Such changes could reduce the efficiency with which the virus is recognized in previously infected or vaccinated people, which potentially can result in reduced herd immunity and reduced vaccine efficacy. In addition, it has been shown that the mink-related virus variant subsequently forms chains of infection in humans.

▸ Konklusion og perspektivering

▸ SARS-CoV-2 påvises i danske minkfarme sent i smitteforløbet, hvilket vanskeliggør en rettidig indsats med henblik på at reducere risikoen for, at der sker smitte fra mink til mennesker. Fylogenetiske analyser af virus fra smittede mink og fra personer, der har relation til minkfarme og har været smittet med SARS-CoV-2, sammenholdt med tidspunkter for smitte og udviklingen af infektionen i minkfarmene viser, at det er ekstremt sandsynligt (95-99%), at såvel smitte fra menneske til mink, såvel som fra mink til menneske, forekommer. En overlevelsesanalyse viser, at kort afstand til smittede minkfarme og stor besætningsstørrelse er signifikant sammenhængende med øget risiko for, at en minkfarm bliver smittet med SARS-CoV-2. Det har ikke været muligt at påvise andre risikofaktorer.

I mink er der påvist ændringer i flere områder af virusgenomet, blandt andet det område, der koder for spike-proteinet, som er essentielt for immunitet efter overstået infektion og/eller vaccination. Sådanne

ændringer kan potentielt resultere i reduceret genkendelse af virus i tidligere inficerede individer, hvilket potentielt kan medføre, at flokimmunitet ikke kan opstå, og at vacciner ikke vil virke. Derudover er det påvist, at den mink-relaterede virus-variant efterfølgende danner humane smittekæder i samfundet.

Baggrund, relevans og perspektiv

›Fødevarestyrelsen har bedt DK-VET konsortiet om at foretage en epidemiologisk udredning i minkfarme, der konstateres smittede med SARS-CoV-2. Følgende spørgsmål ønskes belyst:

- Afklare **hvor hurtigt infektionen spredes blandt mink** og eventuelle andre modtagelige dyrearter på farmen
- Om SARS-COV2 virus **ophører** med at spredes blandt minkene igen
- Om SARS-COV2 spredes til mennesker **på** farmen (i samarbejde m. Styrelsen for Patientsikkerhed)
- Om SARS-COV2 spredes til mennesker **nær** farmen (i samarbejde m. Styrelsen for Patientsikkerhed)
- Samt kortlægge **smitteveje** gennem analyser af positive virusprøver hos mink og udbrudsudredninger fra personer.

Desuden ønskes det beskrevet, hvor længe SARS-CoV-2 har cirkuleret på farmen, hvor stor dødeligheden på farmen har været, hvilke kontakter der har været ind og ud af farmen, om der findes virus i støv i og omkring farmen, og hvad infektionsstatus der er på hund og katte på farmen. Desuden ønskes fuldgenomsekvensanalyser af isolater fra mink og personer tilknyttet farmen.

Metode, data m.m.

›Data er indsamlet ved brug af spørgeskemaer fra farmene rekvireret fra FVST, ved analyser af prøver fra farmene, hhv. for mink og mennesker tilknyttet farmen, om muligt fra døde mink fra fryseren på farmen, fra evt. hunde og katte på farmen, og fra air-samlere der bruges på og omkring farmen. Der køres fuldgenomsekvensanalyser fra et passende antal prøver, baseret på antallet af positive på den enkelte farm og mængden af virus i de enkelte prøver. Resultaterne opgøres og afrapporteres første gang 26-06-2020 og derefter hver anden uge.

SSI opgør antallet af smittede personer i Hjørring/Frederikshavn baseret på databaseudtræk, inddelt på personer med/uden relation til mink og med/uden den virus-type, der er sekventeret fra mink-besætningerne.

På human-siden indsamles desuden data ved hjælp af et spørgeskema og testresultater fra husstande og medarbejdere på COVID-19-positive minkfarme. I et samarbejde mellem SSI, DK-VET, Styrelsen for Patientsikkerhed og Fødevarestyrelsen benyttes de indsamlede oplysninger til at afdække sandsynlige smittekæder. Ved hjælp af sekvensanalyse afgøres det, om der er tale om sammenhæng mellem konstaterede tilfælde af COVID-19 og minkfarme.

Epidemien gøres op i to faser, hhv. periode 1 frem til 18-07-2020 og periode 2 fra 19-07-2020 og frem. For at estimere risikoen for at minkfarme smittes over tid og effekten af mulige risikofaktorer er der blevet kørt overlevelsesanalyse med smitten som "Event" og tid til smitten som "Time". Følgende potentielle risikofaktorer blev undersøgt: besætningsstørrelse (antal mink), afstand til nærmeste farm, afstand til nærmest smittede farm, dyrlægepraksis, og fodercentral. Data til analysen er indhentet fra det centrale husdyrbrugsregister (CHR) og, for foderleverandør, fra Kopenhagen FUR. Startdato for beregning af risikoperioden blev sat til den 1. juni 2020, og sidste dato var den 30. september 2020. Vi har brugt mistankedato som infektionsdato for de smittede farme, fordi virus påvises efterfølgende og

farmen derfor må formodes at have været smittet på mistanketidspunktet. Alle farme fra de tre kommuner med smittede farme (Frederikshavn, Læsø, Hjørring) blev inkluderet i analysen. De første 33 smittede farme blev inkluderet som smittede, mens alle andre farme blev antaget at være modtagelige. Analysen blev først kørt med de potentielle risikofaktorer enkeltvis og derefter i forskellige kombinationer. Interaktioner blev testet kun for de variabler, der var signifikante på en p-værdi < 0.05 . Analysen blev kørt i R (R Core Team, 2020) i pakken "coxme" (Therneau, 2020). Estimering af den forklarende varians var baseret på pakken "survMisc" Dardis (2018).

På basis af data fra farm 2, som blev opdaget tidligt i infektionsforløbet, er der blevet udviklet en SEIR-model med det formål at simulere smitteforløbet i øvrige minkfarme smittet med SARS-CoV-2. Fra farm 2 er der 3 gange indsamlet svælgprøver fra mink; i første prøverunde var 12.5% positive i PCR, i den anden prøverunde (4 dage senere) var 92% positive i PCR og i tredje prøverunde var 95% positive i PCR og 97% serologisk positive. Disse oplysninger blev brugt til at producere en standard infektionskurve, som siden blev brugt til bestemmelse af introduktionstiden. Først blev der udviklet en simpel SIR individ-baseret model, som simulerer spredning af SARS-CoV-2 mellem dyr i en mink farm. I modellen har vi antaget, at antal dyr var 4200 svarende til farm 2 og at der er homogen blanding mellem dyr. Den infektiøse periode blev simuleret med en mest sandsynlig værdi på 5 dage (Kissler et al., 2020), men varierende mellem 4 og 6 dage. Transmissionsraten (beta), som beskriver den rate modtagelige dyr bliver smittet med SARS-CoV-2 på en tidsenhed (her én dag), blev brugt som en kalibreringsfaktor til at teste, hvor højt beta skal være for at reproducere en stigning i kumulativ incidens fra 12.5% til 92% i løbet af 4 dage, svarende til forløbet i voksne mink på Farm 2. Simuleringerne blev kørt med 12.5% af dyrene smittet initialt og med forskellige transmissionsrater. En transmissionsrate på 1.45 viste sig at repræsentere en passende stigning i den kumulativ incidens (Bilag, Figur A).

På baggrund af denne transmissionsrate blev der udviklet en individ-baseret SEIR model, som simulerer spredning af SARS-CoV-2 imellem dyr i en mink farm. SEIR modellen har den samme struktur, som SIR-modellen beskrevet ovenfor, men der er tilføjet en latent periode på 1-3 dage, hvor individerne ikke udskiller virus, inden de bliver infektiøse. Modellen blev initieret med 1, 5 eller 10 smittede dyr for at afspejle forskellige typer af introduktioner af virus til farmen. Modellen blev bagefter kørt i 100 iterationer (gentagelser) for at inkludere stokastisk variation.

Resultater

Smittede minkfarme

I den første fase af epidemien (frem til 18-07-2020) blev SARS-CoV-2 påvist i 3 danske minkbesætninger, heraf 2 beliggende i Hjørring kommune og 1 i Frederikshavn kommune. I perioden 04-07-2020 til 11-08-2020 blev der ikke konstateret SARS-CoV-2 i danske mink. Og i perioden fra 12-08-2020 til 30-09-2020 blev SARS-CoV-2 påvist i 34 danske minkfarme, heraf 24 i Hjørring kommune, 9 i Frederikshavn kommune og 1 i Læsø kommune (figur 1).

Humane påvisninger

I perioden 08-06-2020 til 04-07-2020 blev SARS-CoV-2 påvist hos 90 personer i kommunerne Hjørring og Frederikshavn. I perioden fra 05-07-2020 til 18-07-2020 blev der ikke påvist SARS-CoV-2 hos nogen personer bosiddende i de to kommuner, mens der i perioden 19-07-2020 til 30-09-2020 blev påvist SARS-CoV-2 hos 330 personer (tabel 1, figur 2). Af de 44 sekventerede prøver fra den seneste periode indeholdt 16 minkvarianten. Til sammenligning blev SARS-CoV-2 i perioden 19-07-2020 til 30-09-2020 påvist hos 1226 personer i hele region Nordjylland (tabel 2). Af de 114 sekventerede prøver fra denne periode indeholdt 16 minkvarianten.

I perioden fra 09-07-2020 til 22-07-2020 påvises minkvarianten hos syv personer bosiddende i region Nordjylland, heraf to personer bosiddende i kommunerne Hjørring eller Frederikshavn.

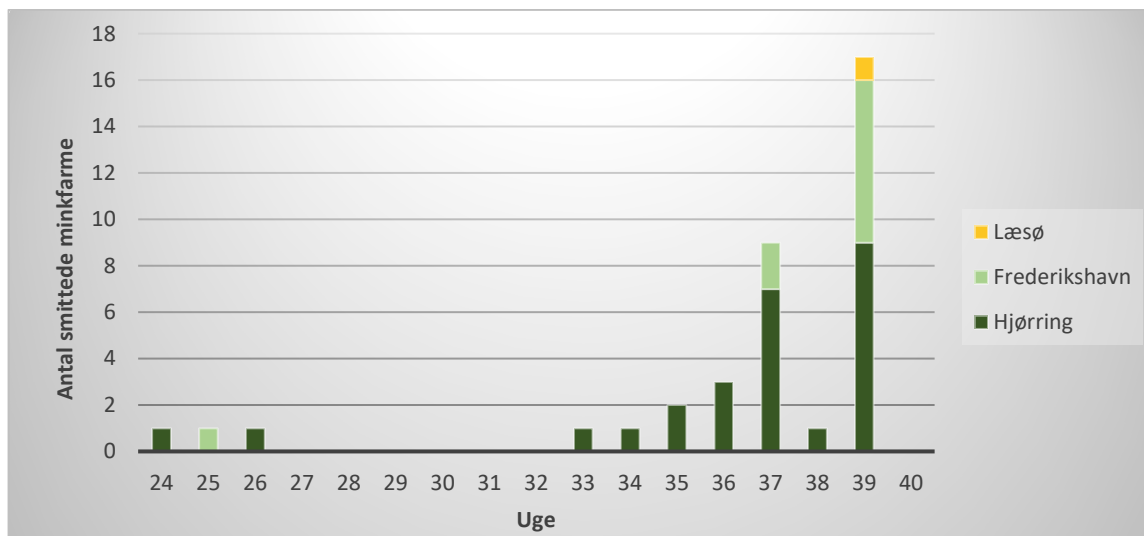
I fase to af epidemien i mink, blev der i sekvenser fra fem personer, der ikke umiddelbart kunne relateres til minkfarme, også påvist minkvarianter af SARS-CoV-2. Nærmere undersøgelser viste, at tre af disse havde været på kursus med en person relateret til en minkfarm, som blev syg på dagen for kurset. Derudover deltog endnu én person, som efterfølgende var positiv, men hvis sekvens ikke er kendt. Da to af de i alt fire kursister var ansat på samme afdeling af et hospital blev efterfølgende over 150 personer testet for SARS-CoV-2, ingen af dem var positive i PCR.

Tabel 1: Antal af personer, der har fået påvist SARS-CoV-2 i kommunerne Hjørring og Frederikshavn.

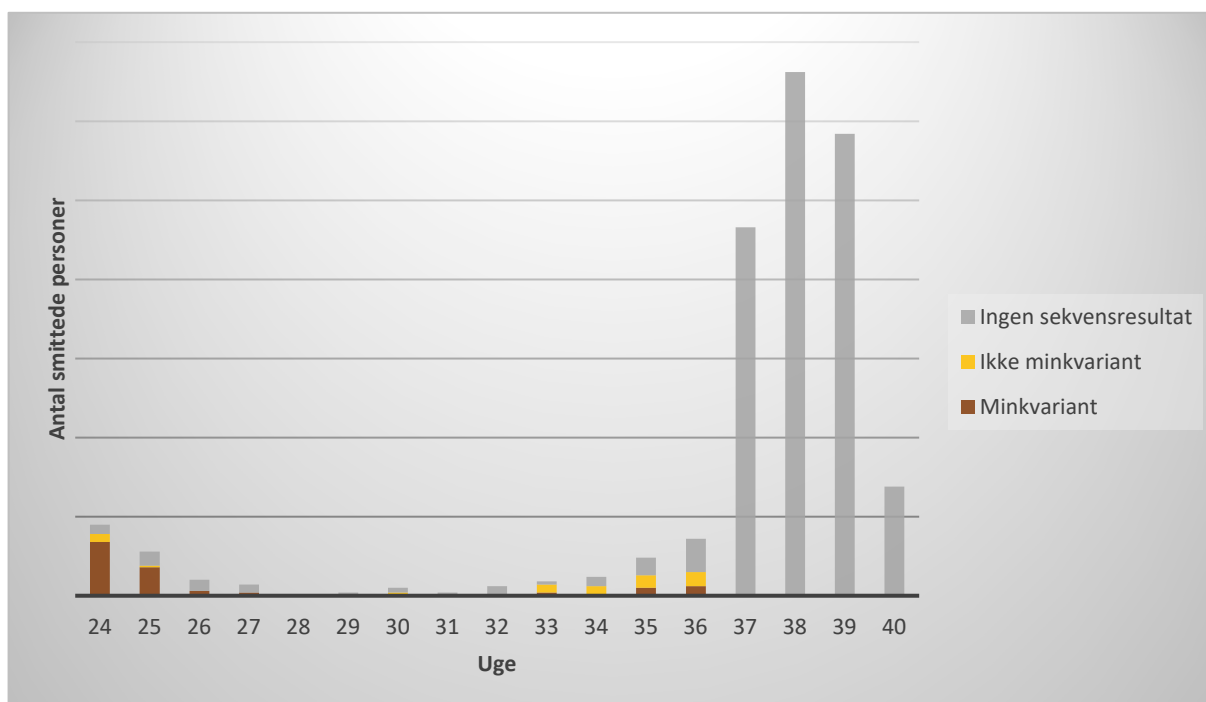
Tidsperiode	Minkvariant	Ikke minkvariant	Ingen sekvensresultat	Total
08.06.20 – 04.07.20	57	6	27	90
05.07.20 – 18.07.20	0	0	0	0
19.07.20 – 30.09.20	16	28	286	330
Hele perioden	73	34	313	420

Tabel 2: Antal af personer, der har fået påvist SARS-CoV-2 i hele Region Nordjylland

Tidsperiode	Minkvariant	Ikke minkvariant	Ingen sekvensresultat	Total
08.06.20 – 04.07.20	73	6	57	136
05.07.20 – 18.07.20	6	0	18	24
19.07.20 – 30.09.20	19	95	1112	1226
Hele perioden	98	101	1187	1386



Figur 1: Udvikling i antallet af danske minkfarme hvori der er påvist SARS-CoV-2 i ugerne 24 til 40 (30-09-2020) gjort op på mistankedato.



Figur 2. Antal humane tilfælde af SARS-CoV-2 fordelt på uge for prøvetagningsdato opdelt i minkvariant, ikke minkvariant og ingen sekvensresultat

Kliniske symptomer

Blandt 25 af de smittede farme i anden periode af epidemien havde 7 minkavlere ikke observeret kliniske symptomer eller øget dødelighed blandt minkene på det tidspunkt FVST's dyrlæger foretog mistankebesøg i besætningen, mens 15 minkavlere havde observeret mindst 1 symptom. De symptomer, der oftest var observeret på det tidspunkt mistankebesøget blev foretaget var næseflåd, luftvejssymptomer, manglende ædelyst og øget dødelighed (tabel 3). Da minkavlerne blev kontaktet igen telefonisk af KU havde 6 ud af 20 minkavlere (ikke nødvendigvis de samme farme, men med et stort overlap og stadig i anden periode af epidemien) ikke observeret kliniske symptomer. Ved såvel FVST's besøg som ved de telefoniske interviews var næseflåd, luftvejssymptomer og manglende ædelyst de symptomer, som oftest blev angivet.

Tabel 3: Antal farme smittet med SARS-CoV-2, hvor følgende kliniske symptomer er observeret i forbindelse med mistankebesøg vedr. SARS-CoV-2. Det er ikke nødvendigvis de samme farme der indgår i alle kolonner.

Symptom	Mistanke besøg (25 farme)	Observationer angivet ved telefoninterview (20 farme)
Næseflåd	9	11
Nysen	6	-
Luftvejssymptomer (inkl. pusten)	9	11
Nedstemthed	3	-
Manglende ædelyst	13	11
Diarré	3	9
Øget dødelighed	12	-
Ingen symptomer	7	6

De tre minkfarme, hvori der blev påvist SARS-CoV-2 i den første periode af epidemien, blev alle tre fundet på baggrund af at personer med relation til mink blev fundet positive for SARS-CoV-2. I farm 1 blev SARS-CoV-2 påvist sent i infektionsforløbet, baseret på prævalensen af PCR-positive på prøvedato 1 og 2, samt seroprævalensen på prøvedato 2. I farm 2 blev SARS-CoV-2 påvist tidligt i infektionsforløbet, baseret på tilsvarende data (tabel 4).

I anden fase af epidemien er det ikke lykkedes at påvise SARS-CoV-2 i nogen farm tidligt i infektionsforløbet. På tidspunktet for første prøveudtagning er prævalensen af PCR-positive dyr >75% i alle smittede farme, undtaget farm 5. I farm 5 er prævalensen lav ved første prøveudtagning, men endnu lavere ved næste prøveudtagning 2 dage senere, hvilket indikerer at epidemien inden for denne farm har toppet nogen tid inden første prøveudtagning (tabel 4). Over tid, i anden periode af epidemien, stiger prævalensen af PCR-positive ved første prøveudtagning og fra farm 20 og frem er prævalensen af PCR-positive 100% i 15 ud af 18 smittede farme. Desuden er 10 af disse 18 smittede farme sat under mistanke på baggrund af en klinisk mistanke, hvilket kun var tilfældet for 3 ud af 19 minkfarme i perioden før midt september.

Baseret på en prævalenskurve fremstillet ved simuleringer af spredning af SARS-CoV-2 i farm 2, samt prævalenserne af PCR-positive i levende mink på de to prøvedatoer, vurderes det at være sandsynligt (66-90%) at introduktionen af virus i minkfarmene er sket 14-18 dage før første prøveudtagning. Dog vurderes introduktionen i farm 5 at være sket tidligere, baseret på den lave prævalens af PCR-positive ved første prøvedato og en faldende prævalens mellem dato 1 og dato 2. Figur B i bilaget viser de simulerede kumulative prævalenser af PCR-positive mink, som danner grundlag for de estimerede tidspunkter for introduktion.

Ud af 27 af de smittede farme (hele epidemien) havde 24 et rent og fungerende forrum, mens 3 ikke havde forrum. Desuden havde 20 el-hegn omkring farmen og på kun en enkelt farm blev det vurderet at der kunne passere dyr over hegnet (via bevoksning el. lign.).

Tabel 4: PCR- og antistof prævalenser beregnet på grundlag af svælgsvabre og blodprøver fra levende mink ved hhv. prøvetagning i forbindelse med mistanke og prøvetagning i forbindelse med opfølgende besøg.

Farm	Mistanke opstået på baggrund af	Prøvedato1, mistanke	Prøvedato2, opfølgning	PCR-prævalens, prøvedato1 (%)	PCR-prævalens, prøvedato2 (%)	Antistof-prævalens, prøvedato2 (%)
1	COVID-19 positiv person	14-06-2020	17-06-2020	100	14	100
2	COVID-19 positiv person	18-06-2020	22-06-2020	12,5	86	4
3	COVID-19 positiv person	29-06-2020	02-07-2020	100	100	78
4	Early warning – runde 2	13-08-2020	19-08-2020	76,7	21,7	
5	Early warning - runde 2	24-08-2020	26-08-2020	36,7	21,7	
6	COVID-19 positiv person	31-08-2020	03-09-2020	86,7	55,9	
7	COVID-19 positiv person	01-09-2020	08-09-2020	90	16,7	
8	Klinisk mistanke	01-09-2020	10-09-2020			
9	COVID-19 positiv person	02-09-2020	08-09-2020	100	48,3	100
10	COVID-19 positiv person	08-09-2020	15-09-2020	96,7	36,7	
11	Klinisk mistanke	09-09-2020	16-09-2020	100	10,0	100
12	COVID-19 positiv person	09-09-2020	17-09-2020	100	26,7	100
13	Klinisk mistanke	10-09-2020	18-09-2020	96,9	23,3	100
14	COVID-19 positiv person	14-09-2020	24-09-2020	100		
15	Early warning - runde 3	14-09-2020	23-09-2020	86,7	53,3	100
16	Early warning - runde 3	14-09-2020	22-09-2020	100	50,0	100
17	Early warning - runde 3	11-09-2020	25-09-2020	60,0	16,7	
18	COVID-19 positiv person	15-09-2020		70,0		
19	Early warning - runde 3	15-09-2020		80,0		
20	COVID-19 positiv person	17-09-2020		100		
21	Klinisk mistanke	22-09-2020		100		
22	Klinisk mistanke	22-09-2020		100		
23	Klinisk mistanke	22-09-2020		100		
24	Klinisk mistanke	22-09-2020		100		
25	COVID-19 positiv person	23-09-2020		93,3		
26	Klinisk mistanke	24-09-2020		96,7		
27	Klinisk mistanke	24-09-2020		100		
28	Klinisk mistanke	25-09-2020		100		
29	Klinisk mistanke	25-09-2020		100		
30	Early warning - runde 3	25-09-2020		96,8		
31	COVID-19 positiv person	25-09-2020		100		
32	COVID-19 positiv person	25-09-2020		100		
33	COVID-19 positiv person	25-09-2020		100		
34	COVID-19 positiv person	28-09-2020		100		
35	Early warning - runde 3	28-09-2020		100		
36	Klinisk mistanke	28-09-2020		100		100*
37	Klinisk mistanke	28-09-2020		100		100*

*I disse to farme er der taget blodprøver til serologisk undersøgelse på prøvedato1

Test af luftprøver

På 12 prøver var der inden 30-09-2020 udtaget luftprøver forskellige steder på farmen. På tre farme blev der fundet positive luftprøver, på to af disse udelukkende i udåndingsluft (airsampler få cm fra minkens snude), men der på den sidste farm også blev fundet positive luftprøver i midtergangen mellem rækkerne af minkbure, og ved siloen 2 meter fra hallerne med mink. Ingen luftprøver indsamlet langs den indvendige side af hegnet eller uden for farmene var positive i PCR. Målingerne blev foretaget varierende tidsintervaller mellem 5 og 10 minutter.

Test af foderprøver

Fra første fase af epidemien blev der indsendt 89 foderprøver fra den fodercentral, som havde leveret foder til 2 af de 3 første smittede besætninger. Foderprøverne var udtaget 13-07-2020 og repræsenterer individuelle foderbatch produceret i perioden fra 01-03-2020 til 12-07-2020. Der kunne ved undersøgelse af de 89 indsendte foderprøver ikke påvises SARS-CoV-2 ved PCR.

Der er yderligere blevet indsendt 54 foderprøver fra samme fodercentral fra individuelle foderbatch produceret i perioden 01-07-2020 til 10-09-2020. Der kunne ved undersøgelse af de 54 indsendte foderprøver ikke påvises SARS-CoV-2 ved PCR.

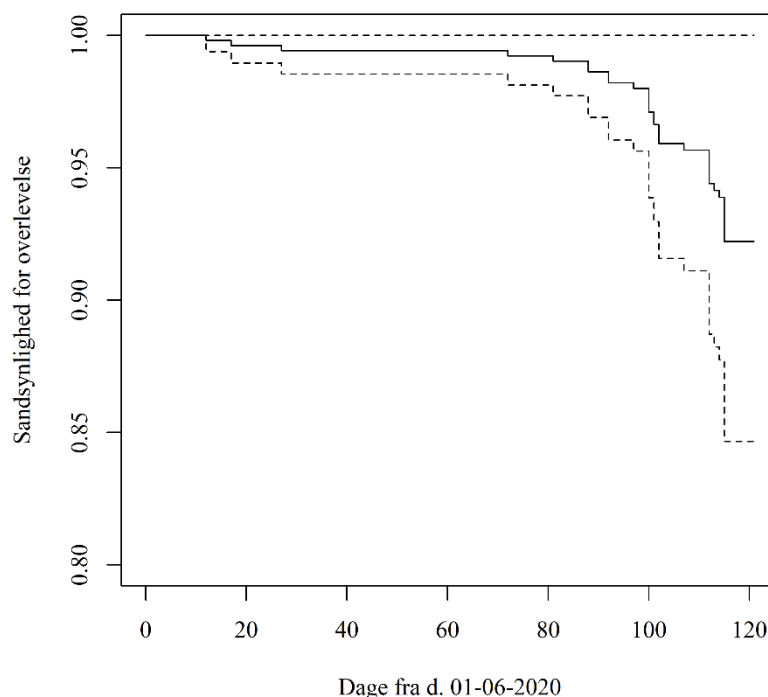
For farm 10-17 er der udtaget 3 foderprøver pr. farm. I ingen af disse prøver kunne påvises SARS-CoV-2 ved PCR.

Overlevelsesanalyse

Resultater fra overlevelsesanalysen viste, at for minkfarme i Hjørring, Frederikshavn og Læsø kommuner er der signifikant større risiko for at blive smittet med SARS-CoV-2, hvis besætningen ligger tæt ved en smittet minkfarm (tabel 5). Desuden var minkfarmens størrelse signifikant i analysen, dvs. jo flere mink des højere risiko for at blive smittet. Der var ingen signifikant effekt af dyrlæge og foderleverandør, ligesom der ikke kunne påvises interaktion mellem afstand til nærmeste smittede og størrelse af farmen, dvs. at betydningen af tæthed ikke ændres med stigende farmstørrelse. Modellen forklarede 60% af variationen i datasættet. Medianen (25-75-percentiler) for afstand fra ikke-smittede minkfarme til nærmeste smittede minkfarm var 1,7 km (0,88-2,27), mens medianen for afstanden fra smittede farme til nærmeste smittede var 3,85 km (1,99-10,5). Smittede minkfarme havde i medianen 10.500 mink (4200-16.500), mens ikke-smittede minkfarme i området i medianen havde 7000 mink (2456-12.125).

Tabel 5: Resultater af overlevelsesmodel med besætningsstørrelse og afstand til nærmeste smittede farm som sign. Risikofaktorer.

Risikofaktor	Koefficient	Hazard ratio	p-værdi
Afstand til nærmeste smittede minkfarm	-0.354	0.702	0.0016
Besætningsstørrelse	0.00041	1.00041	0.011



Figur 3: Sandsynlighed for at der IKKE påvises SARS-CoV-2 i minkfarme i kommunerne Hjørring, Frederikshavn og Læsø over tid, startende fra 01-06-2020.

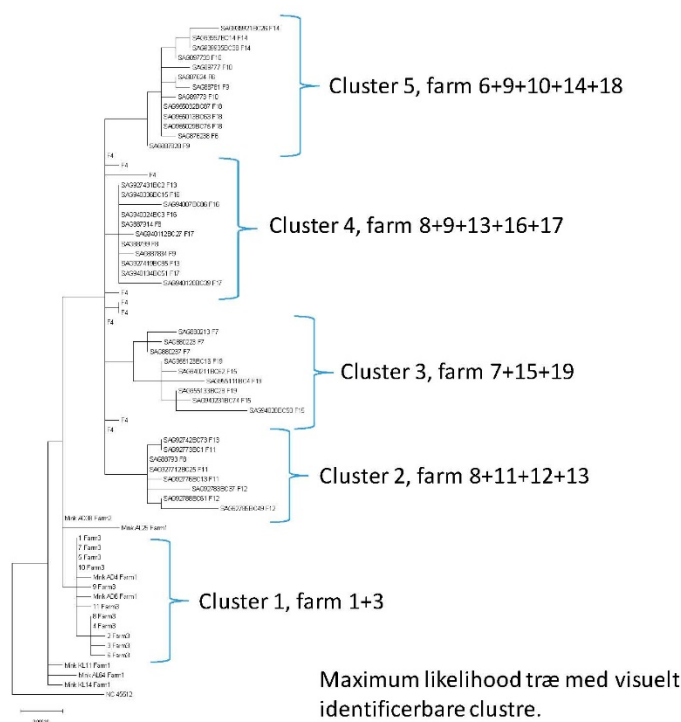
Fylogenetiske analyser på mink:

Som er resultat af den fylogenetiske analyse var det muligt visuelt at identificere 5 clustre (grupperinger) (figur 4). Nogle af sekvenserne ligger i mere end et cluster, hvilket kan indikere, at der har været flere separate smitteveje imellem de forskellige clustre. De 3 sekvenser fra farm 1, der ligger i bunden af træet fra farm 1 repræsenterer de 3 sekvenser der først sås på farm 1 uden den afgørende mutation i spike genet (A22920T). Øvrige sekvenser fra farm 1 samt sekvenser fra farm 2 og 4, der ses ikke-clustrede i træet, kan muligvis indikere overgangsformer mellem varianterne på de øvrige farme.

Fuldgenomsekvenserne viser en række mutationer, som genfindes i både mink og personer relateret til minkfarmene og i lokalområdet testet positive efter 10. juni 2020. De mest markante ændringer er mutationen i det receptorbindende domæne i Spike-proteinet (A22920T; Y453F) samt deletionen i Spike protein på position 21766-21771. I personen relateret til farm 1, som var testet positiv i midten af maj, og som formodes at være indeks case, ses mutationen i Spike-proteinet ikke, hvilket underbygger, at ændringen er sket i mink på farm 1. Deletionen i spike proteinet observeres første gang på farm 4 og er set blandt alle mink på farm 4-19 samt hos personer med tilknytning til farmene. Denne ændring er derfor af nyere dato og er sket ud fra den først observerede variant med mutation i spike proteinet. Mutationen i Spike-proteinet er ikke tidligere set på verdensplan udover i SARS-CoV-2 i mink fra én af de inficerede

minkfarme i Nederlandene¹. Det kan ud fra fylogenien udelukkes, at der er en epidemiologisk sammenhæng mellem udbruddene i NL og DK, da virus fra DK tilhører en anden clade end virus fra NL.

En sandsynlig smittevej er derfor at minkene via mennesker er blevet smittet og at virus har udviklet sig gradvist i denne proces. Alternative smitteveje kan dog heller ikke udelukkes. De fylogenetiske analyser kan ikke alene bruges til udredning af smitteveje, men skal ses i sammenhæng med epidemiologiske undersøgelser



Figur 4: Fylogenetisk sammenhæng mellem sekvenserne fra farm 1 til farm 19.

Diskussion

►Fase 1 af epidemien:

Baseret på fylogenetiske analyser og tilbagesporing af kontakter er tidspunktet for introduktion i Farm 1 med stor sikkerhed bestemt, ligesom det er sandsynliggjort, at en index-person har introduceret virus i farmen. De fylogenetiske analyser sammenholdt med tidspunktet for påvisning af SARS-CoV-2 i forskellige personer sandsynliggør, at én person relateret til Farm 1 er blevet smittet midt i maj, og virus er uforvarende introduceret til minkene fra denne eller en nært relateret person. Dernæst er virus muteret i minkene, hvilket evt. kan have øget transmissionsraten i mink. Én eller flere personer relateret til Farm 1 er dernæst blevet smittet fra mink med stammen med den nye mutation, og dernæst er der opstået smittekæder i store dele af Hjørring/Frederikshavns-området. I alt er de tre signaturmutationer,

¹ Vi følger den clade navngivning der anvendes hos Nextstrain (<https://nextstrain.org/blog/2020-06-02-SARSCoV2-clade-naming>). Der er identificeret en række clade definerende mutationer, og derfor findes der ikke et egentligt SNP cut-off –for clade tilhørsforhold, men derimod tilstedeværelsen eller fraværet af specifikke SNP. Den clade af danske minksekvenser befinder sig i (20B) defineres helt unikt ved tilstedeværelsen af 3 SNP på position 28881, 28882 og 28883. Derudover er der nogle semi-definerende SNPs. Alle sekvenser fra danske mink og mennesker afviger 4 SNPs fra sekvenserne fra de hollandske udbrud. Derudover er der andre SNPs, hvor der er mindre forskelle.

som karakteriserer virusvarianten, der findes i mink og som er undersøgt ved sekventering, fundet i 57 ud af 63 prøver fra kommunerne Hjørring og Frederikshavn, i perioden 08-06-2020 til 04-07-2020. I samme periode blev minvarianten fundet i 73 ud af 79 personer med sekventerede vira i hele Region Nordjylland. Der blev i alt fundet 136 personer smittet med SARS-CoV-2 i hele Region Nordjylland i perioden.

Fase 2 af epidemien:

Introduktionen af virus i den første farm i fase 2 estimeres at være sket i slutningen af juli. På dette tidspunkt påvises der igen enkelte tilfælde af SARS-CoV-2 i personer bosiddende i kommunerne Hjørring og Frederikshavn, og minkvarianten påvises i 2 personer bosiddende i kommunerne Hjørring og Frederikshavn. Det er sandsynligt, at en person relateret til en minkfarm har bragt smitten ind i den første farm i fase 2 idet en person med direkte relation til farmen har haft symptomer foreneligt med COVID-19, uden at blive testet ved PCR, i slutningen af juli og pågældende er efterfølgende fundet positiv ved antistofmåling.

I anden fase af epidemien påvises høje prævalenser af PCR positive mink i stort set alle farme på det tidspunkt, virus påvises første gang. Dette kan skyldes, at symptomerne generelt er svage og uspecifikke i minkene, at udviklingen af infektionen inden for minkfarmene er hurtig, og/eller at overvågningen ikke er tilstrækkelig. Over tid ser prævalensen af PCR-positive ved første prøveudtagning ud til at stige, ligesom der i to farme er fundet antistoffer allerede ved første prøveudtagning og flere og flere farme er fundet ved klinisk mistanke. Dette kunne tyde på, at infektionen løber hurtigere igennem farmene, og at nogle af de ændringer, der er set i virus, medfører en større tilpasning af virus til mink og dermed en højere transmissionsrate og flere symptomer i minkene. Om dette er tilfældet kan kun afgøres ved udførelse af kliniske transmissionsforsøg på mink.

Tidspunktet for introduktion til de enkelte minkfarme blev for størstedelen af farmene estimeret til 14-18 dage før første prøveudtagning. Der er dog en moderat usikkerhed forbundet med dette estimat, hvilket hovedsageligt skyldes, at estimatet er baseret på simuleringer, hvor input til simuleringsmodellen dels er baseret på en enkelt farm (farm 2), dels er suppleret med humane data vedr. den infektiøse periode, da parametre for mink ikke var til rådighed. Derudover vil en tilpasning af virus til mink have stor betydning for transmissionsraten, hvorfor perioden fra første prøveudtagning til introduktion må formodes at være kortere, hvis en tilpasning af virus til mink har fundet sted.

Kun risikofaktorerne besætningsstørrelse og afstand til nærmeste smittede minkfarm var statistisk signifikante i overlevelseseanalysen. I analysen indgik kun potentielle risikofaktorer, for hvilke der kunne udtrækkes registerdata. Modellen er kørt på baggrund af udbrudsdata fra 30-09-2020, dvs. at de minkfarme hvori der var påvist SARS-CoV-2 blev anset for positive fra første mistankedato, mens alle øvrige minkfarme i de tre kommuner blev anset for negative i hele perioden (01-06-2020-30-09-2020). Minkfarme, der var under mistanke den 30-09, blev altså anset for værende negative, også selv om SARS-CoV-2 evt. er blevet påvist senere. Påvisningen af tæthed til nærmeste smittede minkfarm, som en statistisk signifikant risikofaktor, siger ikke noget om, hvordan virus bringes ind i minkfarmen, men kan blot være et udtryk for, at smitten kan foregå over relative korte afstande. Det har dermed ikke været muligt at vise, om det er gentagne humane introduktioner, der smitter minkfarmene, eller om der er tale om andre smitteveje i lokalområdet.

I forbindelse med den epidemiologiske udredning af de smittede farme har adskillige potentielle risikofaktorer været foreslået og undersøgt. En vurdering af risikoen forbundet med ræv, mårhund, katte mv. er tidligere foretaget af DK-VET, hvori der konkluderes følgende: "Baseret på de nuværende oplysninger er det ikke muligt med sikkerhed at vurdere risikoen forbundet med spredning af SARS-CoV-2 mellem danske minkfarm via mårhunde, måger, katte og hunde. Baseret på den eksisterende hegning

af danske minkfarme, samt eksperimentelle studier, der viser forskellige arters evne til at smitte med SARS-CoV-2 og forekomsten af arterne i Hjørring og Frederikshavn, vurderes det at være *usandsynligt* (1-10%) at SARS-CoV-2 er spredt mellem danske minkfarme med ræv, mårhund kat, mink, ilder og mår, *ekstremt usandsynligt* (0,001-0,1%) at smitten er spredt mellem danske minkfarme med måger, og *meget usandsynligt* (0,1-1%), at hunde har overført SARS-CoV-2 mellem danske minkfarme." Der er på grundlag af den epidemiologiske udredning ikke baggrund for at ændre denne tidligere vurdering.

Mutationen i det receptorbindende domæne i Spike-proteinet (A22920T), der observeres i 4 ud af 8 mink fra farm 1 samt i alle efterfølgende sekvenser fra farmene 2 til 19, er ikke tidligere set på verdensplan udover i SARS-CoV-2 i mink fra flere af de inficerede minkfarme i Nederlandene. Mutationen resulterer i aminosyreændringen Y453F på position 453 i Spike-proteinet. Denne aminosyreposition er højkonservet i SARS-relaterede coronavirus og er lokaliseret i det receptorbindende domæne, som er kritisk for interaktion mellem virus og værtsreceptor.

Derudover er de to observerede varianter (mutationen og deletionen), som er opstået i mink, også bekymrende, da de ligeledes forekommer i genet, der koder for Spike proteinet. Spike proteinet anvendes af virus til at inficere kroppens celler med og er også dette som man udvikler vacciner imod. Ligeledes menes proteinet også at være vigtigt for udviklingen af immunitet efter en overstået infektion. Der er derfor en mulighed for, at de virus, hvor der er sket sådanne ændringer, kan mindske eller eliminere effekten af samtlige spike-baserede anti-COVID19 vacciner, ligesom det kan øge sandsynligheden for, at folk der allerede har været smittet, kan blive smittet igen med disse virusvarianter, så flokimmunitet udebliver.

Som følge af, at der fortsat påvises farme med ny-introduktioner af SARS-CoV-2 i flere Nordjyske kommuner, vurderes det, at de forbyggende tiltag der er iværksat i minkfarme enten ikke virker, eller at der endnu ikke har været tid nok til at tiltagene er blevet tilstrækkeligt implementeret. Desuden vurderes det, at den hurtige transmission blandt mink sammenholdt med, at det ikke er lykkedes at smitteopspore SARS-CoV-2 positive personer inden minkene smittes, betyder, at yderligere beskyttende tiltag blandt personer, der færdes på smittede farme, ikke får den ønskede effekt. Påvisningen af minkvarianten i to personer, der havde været på kursus med en person, som siden blev testet positiv for Covid19 og var relateret til en minkfarm, viser at minkvarianter af virus fortsat kan danne smittekæder til resten af samfundet, ligesom det tidligere var vist i fase 1 af minkepidemien. Den fortsatte udvikling af virus i mink med flere og flere mutationer i spike-proteinet og spredning ved videresmitte til mennesker i Danmark udgør en potentiel fare for folkesundheden og for de forventede effekter af en vaccine.



References:

Chris Dardis (2018). survMisc: Miscellaneous Functions for Survival Data. R package version 0.5.5.

<https://CRAN.R-project.org/package=survMisc>

Kissler SM, Tedijanto C, Goldstein E, Grad YH, and Lipsitch M. 2020 Projecting the transmission dynamics of SARS-CoV-2 through the postpandemic period. Science 368:860-868

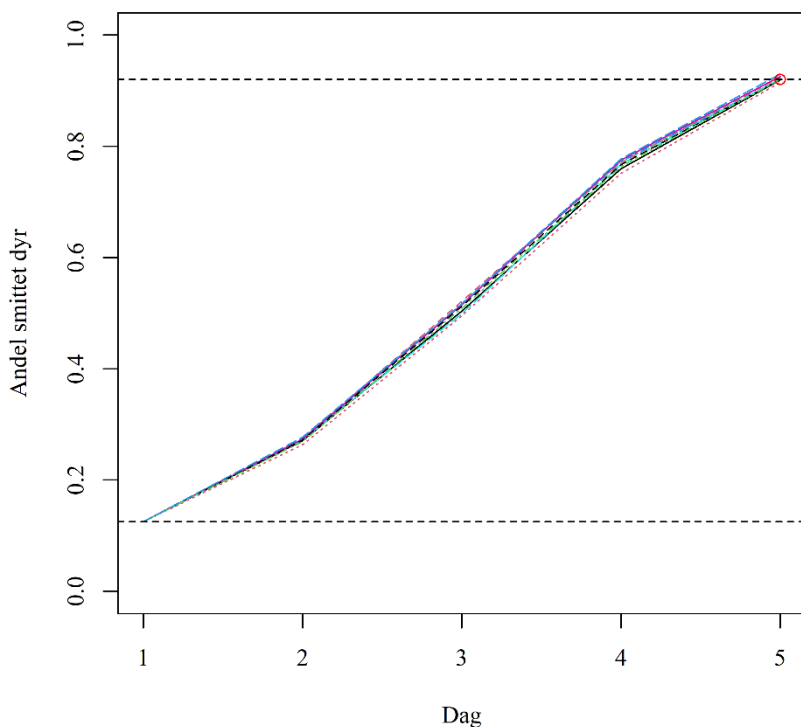
R Core Team (2020). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Terry M. Therneau (2020). coxme: Mixed Effects Cox Models. R package version 2.2-16.

<https://CRAN.R-project.org/package=coxme>

Bilag 1:

Figur A: Kumulativ incidens af positive individer simuleret for farm 2 på baggrund af prævalensen af PCR positive voksne mink på to prøvedatoer med 4 dages mellemrum. Nedenstående kurve er opnået ved en transmissionsrate (β) på 1,45.



Figur B: Simulerede kurver over kumulativ incidens af PCR-positive i en farm svarende til farm 2. Fra venstre mod højre er epidemien startet i hhv. 1, 5 eller 10 mink. De vandrette linjer angiver en prævalens på hhv. 12,5% og 92%.

