

| | |
|----------------------|---|
| Projektleder KU/SSI | Anette Boklund (KU) |
| Projektgruppe | Graham Belsham (KU), Søren Saxmose Nielsen (KU), Anne Sofie Vedsted Hammer (KU), Charlotte Sværke Jørgensen (SSI) |
| Fagfællebedømmer | - |
| Kontaktperson i FVST | Sten Mortensen |

| | | | |
|----------------------|--------------------|---------------------|----------------|
| Dato for henvendelse | Dato for svarfrist | Dato for afsendelse | Versionsnummer |
| 06-07-2020 | 08-07-2020 | | 1 |

| | | | |
|--------------------------|------------------|------------------|----------|
| Journalnummer/sagsnummer | FVST | KU | SSI |
| | 2020-14-81-01951 | 061-0126/20-3680 | 20/07132 |

Besvarelse vedr.

▸ Fritestning af COVID-19 minkbesætninger

Resumé

▸ Fødevarestyrelsen har ønsket en vurdering og beskrivelse af, hvorledes en minkbesætning, der har været testet PCR positiv for COVID-19, igen kan testes fri for smitte. Forskellige testmetoder ved hhv. analyse for antistoffer og viruspåvisning for PCR i forskellige materialer vurderes med henblik på at teste besætningen fri, ligesom stikprøvestørrelser vurderes i forhold til prævalenser og størrelsen af den epidemiologiske enhed.

Analyse for antistoffer vurderes ikke at være egnet til at friteste besætninger, hvori der har været påvist SARS-CoV-2. PCR-analyser af svælg-svaber vurderes at have høj sensitivitet, hvis prøven udtages af trænet personale, og prøverne kan relativt let udtages ved standardfiksering af levende mink.

Fritestning af smittede farme kan med fordel påbegyndes efter en periode på ca. 2 uger, hvor der ikke har været påvist kliniske symptomer eller PCR-positive prøver fra døde mink eller luftprøver.

På baggrund af de forventede størrelser af de epidemiologiske enheder på farmene foreslås det at udtage hhv. 300, 62 eller 31 svælgsvaber-prøver pr epidemiologisk enhed til analyse med PCR for med 95% sikkerhed at kunne påvise prævalenser på hhv. 1, 5 og 10% i en epidemiologisk enhed. Som supplement til undersøgelse af svaberprøver kan der indsamles luftprøver fra udåndingsluft eller fra omgivelser til PCR-analyse med henblik på at vurdere, hvor meget virus, der er tilstede omkring burene og i omgivelserne.

Da alle smittede minkfarme indtil nu er blevet slået ned, er der begrænset viden omkring SARS-CoV-2 i mink. Dette gælder særligt transmissionsrater og varighed af immunitet. Som følge heraf er der nogen usikkerhed omkring nogle af antagelserne i denne vurdering. Det er derfor vigtigt, at revurdere spørgsmålet om fritestning, såfremt der tilvejebringes ny information, særligt vedrørende transmissionsrater og varighed og betydning af antistoffer.

Baggrund, relevans og perspektiv

▸ Fødevarestyrelsen ønsker en vurdering og beskrivelse af, hvorledes en minkbesætning, der har været testet PCR positiv for COVID-19, igen kan testes fri for smitte. Dvs. hvordan konstateres, at der ikke længere cirkulerer virus i besætningen, således at der ikke er risiko for smitte i forbindelse med pelsningen af minkene, og det offentlige tilsyn på besætningen kan hæves.

Herunder bedes vurderet, hvorvidt der er forskel på, om hele besætningen pelses, eller om der forbliver avlssdyr i besætningen efter pelsningen.

I besvarelsen bedes man forholde sig til anvendeligheden af de forskellige testmetoder blodprøver, svælgsvaberprøver og støv-/luftprøver i og omkring minkbesætningen til formålet, herunder sandsynligheden for at der er levende virus tilstede, når man finder PCR-positive prøver.

Der kan overvejes prøvetagning på både levende og døde mink. Kan man monitorere besætningen ved svabre fra de døde mink, og først påbegynde fritestning, når de døde mink testes negative? Hvilke prøver kan anvendes til fritestning, og hvor mange skal tages?

Metode, data m.m.

▸ Først vurderes forskellige testmetoder, hhv. analyse for antistoffer i serologiske prøver, viruspåvisning med PCR fra forskelligt dyremateriale og luftprøver i forhold til muligheden for at teste en farm fri for SARS-CoV-2. Dernæst vurderes nødvendige stikprøvestørrelser i forhold til prævalenser og størrelse af den epidemiologiske enhed.

Data vedr. fordeling og udbredelse af SARS-CoV-2 i minkfarme er baseret dels på observationer fra de tre smittede danske minkfarme, dels på hvad der er publiceret fra minkfarme i Nederlandene.

Data fra interviews af 79 af de 125 screenede danske farme danner grundlag for vurderingen af antal mink pr. hus eller hal.

Stikprøvestørrelser er beregnet i FreeCalc, Epitools (<https://epitools.ausvet.com.au/freecalctwo>) pr. epidemiologisk enhed for forskellige populationsstørrelser relateret til hhv. det forventede antal mink pr. hal eller for en gruppe af huse. Der kan være stor variation i, hvordan farme er bygget op, og hvad kan anses for at være en epidemiologisk enhed. Derfor er en række populationsstørrelser angivet således, at spændet fra få mink i en lille gruppe huse til mange mink i én hal er dækket, og der er lavet en vurdering af, hvad en epidemiologisk enhed dækker.

Stikprøveberegninger er foretaget ved forventede prævalenser på 1%, 5% og 10% (designprævalens). Det er antaget, at smittede mink fordeler sig ligeligt inden for hver epidemiologisk enhed, samt at specificiteten af testen er 1, mens sensitiviteten er 0,95. Usikkerheden forbundet med udbredelsen af SARS-CoV-2 mellem huse, med forskellige testmetoder og ved forskellige procedurer for udvælgelse af huse/haller, der testes, er beskrevet og diskuteret.

Det antages, at farmen er under offentligt tilsyn indtil den er testet fri, dvs. at der i perioden fra påvisning af SARS-CoV-2 til fortolkning af testresultaterne ikke flyttes mink til eller fra farmen.

Resultater

▸ Serologisk undersøgelse af farme med henblik på at vurdere sandsynligheden for, at farmen er fri efter infektion, vil ikke være akkurat og egnet til formålet, da man primært måler tidligere eksponering. I de to farme, hvor vi har haft mulighed for at følge en del af udbruddets forløb, har der været en meget hurtig stigning i prævalensen af seropositive mink, i den ene farm med en stigning fra 6% til 97% over en periode på 8 dage. Det er dog uvist, hvor længe mink forbliver seropositive.

PCR-analyser kan med høj sensitivitet påvise tilstedeværelse af virus RNA i et givent materiale. Metoden siger ikke noget om, hvorvidt virus er levende eller smitsomt. Det vurderes dog, at påvisning af PCR-positive næse-, svælg- eller rektalprøver kan være et udtryk for, at dyrene stadig udskiller virus. Dette svarer til den metode, der benyttes til fritestning af mennesker.

Baseret på PCR-analyser af svabere fra næse og svælg fra de samme dyr fra de første to positive danske minkfarme vurderes de to metoder at give overensstemmende resultater. Svælgsvabere kan relativt let udtages, mens minken er fikseret i en standard fikseringsfælde, mens næsesvabere kun kan udtages i

anæstesi, eller hvis minken er død. Resultaterne fra de første to farme viste, at rektalsvabere sjældent var positive på mink, der var positive i næse- og svælgsvabere. Rektalsvabere vurderes derfor ikke at være anvendelige til at dokumentere frihed for SARS-CoV-2, mens svælgsvabere er lettere at udtage end næsesvabere, uden reduktion i sensitivitet.

Som supplement til undersøgelse af svaberprøver kan der indsamles luftprøver fra udåndingsluft eller fra omgivelser til PCR-analyse. Fordelen med luftprøver er, at smittestatus for mange dyr som gruppe kan ske på en ikke-invasiv måde uden håndtering af dyrene. Resultater fra den ene positive danske minkfarm viste, at luftprøverne var negative, selvom der blev fundet enkelte positive dyr ved udtagning af svaberprøver. På en anden af de smittede danske farme var luftprøver fra dyrenes direkte udåndingsluft og midtergangen positive i haller med positive dyr. Floksensitiviteten ved luftprøver vurderes dog at være lavere end med andre metoder, hvor resultaterne aggregeres på baggrund af enkeltdyrsresultater. Metoden er derfor ikke egnet til at teste farmen fri for SARS-CoV-2, men resultaterne kan bidrage til at vurdere, hvor meget virus der er tilstede i omgivelserne omkring burene.

Baseret på undersøgelser fra de første farme og nederlandske undersøgelser ser prøver fra døde dyr ud til at være et anvendeligt redskab til monitorering af udbrud. Dette kan eventuelt suppleres med luftprøver fra udåndingsluft eller dyrenes omgivelser. Når der i en periode på to uger ikke længere påvises kliniske symptomer, PCR-positive prøver fra døde mink eller luftprøver, kan prøveindsamling på levende dyr påbegyndes med henblik på at teste farmen fri.

Stikprøvestørrelsen bør fastlægges for hver epidemiologisk enhed på farmen. Hver lukket hal bør anses for en epidemiologisk enhed, ligesom hver gruppe af åbne huse kan anses for at være en epidemiologisk enhed. Ud fra disse definitioner kan antallet af epidemiologiske enheder bestemmes for en given farm.

Blandt de 79 interviewede minkfarmere havde halvdelen mindst én lukket hal, mens 71 havde mindst ét åbent hus. Antallet af dyr pr hal eller hus blev opgjort for dem, der kun havde huse (34 farme) eller kun havde haller (8 farme). Median antallet af avlshunner pr hus var 100 (5-95%: 54-230), mens medianen af total antal dyr pr hus var 644 (5-95%: 258-1476). Tilsvarende var medianen af antallet af avlshunner pr hal 957 (5-95%: 492-2306), mens medianen af total antal dyr pr hal var 6108 (5-95%: 3353-15705). Farmene havde en median på 1 hal, med maksimum 7, og en median på 12 huse, med et maksimum på 59.

Det vurderes, at hvis prøverne pooles i pools af 5, vil sensitiviteten på de antagne 0,95 stadig kunne opretholdes. Man skal dog være opmærksom på, at der ved pooling af prøverne ikke indhentes viden om, hvor mange af dyrene i hver pool, der er positive. Derfor kan det være brugbart at undlade at poole prøver, indtil der er opnået større viden om, hvordan SARS-CoV-2 udbredes i minkfarme ved at følge infektionen i flere smittede farme.

På baggrund af de forventede størrelser af de epidemiologiske enheder på farmene foreslås det generelt at udtage hhv. 300, 62 eller 31 svælgsvaber-prøver pr epidemiologisk enhed til analyse med PCR for med 95% sikkerhed at kunne påvise prævalenser på hhv. 1, 5 og 10% i en epidemiologisk enhed (tabel 1).

Tabel 1: Antallet af prøver, der skal tages pr. epidemiologisk enhed, hvis man skal kunne påvise med 95% sikkerhed, at hvis alle prøver er negative, kan prævalensen i bygningen højst være den angivne.

| Mink pr. epidemiologisk enhed | Forventet prævalens | | |
|----------------------------------|---------------------|----|-----|
| | 10% | 5% | 1% |
| 50 | 23 | 41 | * |
| 100 | 27 | 47 | * |
| 250 | 29 | 57 | 204 |
| 500 | 30 | 59 | 237 |
| 1000 | 30 | 60 | 272 |
| 1500 | 30 | 61 | 285 |
| 2500 | 30 | 61 | 296 |
| 5000 | 30 | 62 | 305 |
| 10000 | 30 | 62 | 310 |
| 15000 | 31 | 62 | 314 |

*Det er ikke muligt, selv med test af samtlige dyr, at kunne dokumentere frihed i for Covid19 i enheder af denne størrelse.

Diskussion

▸ Det foreslås at udtage hhv. 300, 62 eller 31 svælgsvaber-prøver pr epidemiologisk enhed til analyse med PCR for med 95% sikkerhed at kunne påvise prævalenser på hhv. 1, 5 og 10% i en epidemiologisk enhed. Det er vigtigt at være opmærksom på, at i en lukket hal med 15000 mink, vil hhv. 1, 5 og 10% af dyrene udgøre 150, 750 eller 1500 dyr, dvs. at der ved disse designprævalenser stadig kan være en del smittede dyr i den epidemiologiske enhed, uden at den bliver fundet positiv i stikprøven. Dog skal det bemærkes, at det foreslås at udtage stikprøven, når der ikke længere er kliniske tegn og ikke længere kan påvises PCR-positive blandt de døde mink.

Væsentlige antagelser for alle overvejelser og stikprøveberegninger i dette notat, er at farme, der skal testes fri, tidligere har været testet positive, at transmissionsraten for SARS-CoV-2 i mink er høj, hvorfor der kan forventes at have været en høj prævalens af SARS-CoV-2-positive mink på farmen, og at mink, der overlever infektion med SARS-CoV-2, ikke er modtagelige for ny infektion med SARS-CoV-2, som følge af udvikling af antistoffer. Da der er begrænset viden om såvel transmissionsrater som udvikling af antistoffer og hvor længe mink er beskyttet mod infektion, er der nogen usikkerhed forbundet med vurderingen. I den ene af de tre smittede danske minkfarme, så vi en hurtig udvikling i antallet af PCR-positive dyr, hvilket understøtter antagelsen om en høj transmissionsrate. Da alle danske minkfarme, såvel som minkfarme i Nederlandene, med SARS-CoV-2 er blevet slået ned, er der ingen viden om, hvor længe man kan forvente at finde antistoffer i mink. Hvis de mink, der smittes først i forløbet, når at miste immuniteten, mens der stadig er virus tilstede i de senest smittede mink, vil virus kunne vedblive at cirkulere i besætningen. Det er derfor vigtigt, at revurdere spørgsmålet om fritestning, såfremt der tilvejebringes ny information, særligt vedrørende transmissionsrater samt varighed og betydning af antistoffer.

Hvis der på tidspunktet for udtagning af prøver med henblik på dokumentation af frihed for SARS-CoV-2 er mange hvalpe på farmen, bør det overvejes, at betydningen af antistoffer ikke er velbeskrevet. Det betyder, at hvis en del af hvalpene stadig er beskyttet af maternelle antistoffer på det tidspunkt, der testes, og hvis virus stadig er tilstede på farmen med lav prævalens, kan et udbrud blusse op igen, når hvalpene mister de maternelle antistoffer. For at undgå en sådan situation kan det overvejes enten at fastlægge stikprøven på grundlag af en meget lav prævalens (højst 1%), eller at afvente tidspunktet for

fritestning til de maternelle antistoffer kan forventes at være forsvundet. Det væsentligste immunoglobulin i minkmælk er IgG. I minkhvalpe kan IgG overføres fra mælken i tarmen til blodbanen indtil hvalpene er mindst 47 dage gamle, hvilket er forskelligt fra forholdene i andre produktionsdyr som drøvtyggere og svin, hvor passagen lukker 24 timer efter fødslen. For andre virusinfektioner ved man, at passiv immunitet bortfalder i 6-7 ugers alderen, og minkhvalpene kan således forventes at opnå fuld modtagelighed i løbet af juni måned.

Tilsvarende bør det overvejes, at hvis en lav prævalens af PCR-positive mink er tilstede på farmen på test-tidspunktet, og det offentlige tilsyn ophæves efter fritestning, så kan tilførslen af modtagelige dyr føre til en opblussen af infektionen. Det kan dog forventes, at ved en lav prævalens af infektion i en farm, hvor SARS-CoV-2 tidligere er påvist, vil infektionen dø ud over tid, såfremt der ikke tilføres modtagelige dyr, i det en stor del af dyrene må forventes at have udviklet antistoffer og derfor ikke længere vil være modtagelige.

Det antages i stikprøveberegningerne, at sensitiviteten er 95%. Dette er under forudsætning af, at prøverne udtages korrekt. Trænet personale kan umiddelbart udtage svælgprøver, mens der ikke er data for, hvordan sensitiviteten påvirkes, når ikke-trænede personer udtager prøverne. Hvis sensitiviteten reduceres, kan det være nødvendigt at tage flere prøver, for at opretholde samme sikkerhed.

Det antages desuden, at specificiteten af PCR-metoden er 100%. Dette er baseret på den generelt høje specificitet af RT-qPCR (https://www.who.int/docs/default-source/coronaviruse/wuhan-virus-assay-v1991527e5122341d99287a1b17c111902.pdf?sfvrsn=d381fc88_2), samt at hvis der påvises positive prøver ved testen, vil farmen blive testet igen. Der har tidligere været et enkelt tilfælde, hvor en dansk minkfarm havde falskpositive reaktioner, dvs. at der i første testrunde blev fundet positive reagenter, mens der ved de efterfølgende omfattende prøveudtagninger, ikke blev fundet positive prøver. I tilfælde af få positive testresultater er det derfor vigtigt, at der foretages opfølgende analyser, hvor resultaterne bekræftes.

Der er væsentlig usikkerhed forbundet med definition af, hvad en epidemiologisk enhed er på en given farm. Dette skyldes primært, at der findes mange forskellige konstruktioner, og det vil være nødvendigt at foretage en vurdering heraf på hver farm.

Spørgsmålet omkring forskellen på, om hele besætningen pelses, eller om der forbliver avlsdyr i besætningen efter pelsningen er ikke behandlet. Det antages at fritestning hhv. før eller efter pelsning følger antallet af mink pr epidemiologisk enhed, som beskrevet ovenfor.

Konklusion og perspektivering

▸ På baggrund af de forventede størrelser af de epidemiologiske enheder på farmene foreslås det at udtage hhv. 300, 62 eller 31 svælgsvaber-prøver pr epidemiologisk enhed til analyse med PCR for med 95% sikkerhed at kunne påvise prævalenser på hhv. 1, 5 og 10% i en epidemiologisk enhed. Prøveudtagning med henblik på at dokumentere frihed foreslås først påbegyndt, når der i 2 uger ikke er observeret kliniske tegn eller påvist PCR-positive blandt de døde mink. Som supplement til undersøgelse af svaberprøver kan der indsamles luftprøver fra udåndingsluft eller fra omgivelser til PCR-analyse med henblik på at vurdere, hvor meget virus, der er tilstede omkring burene og i omgivelserne.

For at opnå større viden om SARS-CoV-2 i mink foreslås det, at man indledningsvist undlader at pool prøver. Men pooling af op til 5 prøver vurderes ikke at reducere sensitiviteten af prøverne til mindre end



de antagne 95%, hvilket betyder, at hvis man på længere sigt ønsker at poole prøver, vil det ikke have indflydelse på de estimerede stikprøvestørrelser.
