

Eindrapportage SARS-CoV-2 bij besmette nertsenbedrijven

Arjan Stegeman, projectleider

Namens de consortium partners

Wageningen Bioveterinary Research: Wim van der Poel, Sandra Vreman, Renate Hakze, Frank Harders, Mirriam Tacken, Marc Engelsma, Marcel Hulst

Erasmus Universiteit Rotterdam: Marion Koopmans, Bas Oude Munnink, Reina Sikkema

Gezondheidsdienst voor Dieren Deventer: Robert Jan Molenaar, Ruth Bouwstra

Universiteit Utrecht: Lidwien Smit, Myrna de Rooij, Arjan Stegeman

Met hulp van NVWA en GGD

31-07-2020

Achtergrond

Op donderdag 24 april en op zaterdag 25 april zijn er bij twee nertsenbedrijven in Noord-Brabant SARS-CoV-2 besmettingen vastgesteld (NB1 en NB2, NB1 bestaat uit twee dicht bij elkaar gelegen locaties NB1a en NB1b). Op het eerste bedrijf had een persoon Covid-19 achtige verschijnselen en op het tweede bedrijf is medio maart bij één van de medewerkers Covid-19 bevestigd. Op 7 mei werd SARS-CoV-2 gediagnosticeerd op een derde bedrijf in Noord-Brabant dat op 6 mei een klinische verdenking meldde (NB3). Op een bedrijf gelieerd aan bedrijf NB1, maar met gescheiden bedrijfsvoering en op ruime afstand van de andere twee locaties (NB4) werd ook een besmetting vastgesteld. Hoewel het meest waarschijnlijk is dat de infectie bij nertsen is geïnitieerd vanuit SARS-CoV-2 geïnfecteerde personen is meer inzicht in de epidemiologie, en de verspreiding tussen dieren, tussen bedrijven en naar de omgeving noodzakelijk om eventuele interventie maatregelen afgewogen te kunnen nemen. In dit verslag leest u de bevindingen op deze vier bedrijven. Conform het onderzoeksplan is uitgebreid onderzoek gedaan op NB1 en NB2 en is het onderzoek op de twee andere bedrijven beperkter van omvang geweest. Daarnaast worden in dit rapport de opzet en resultaten van de serologische screening op alle nertsenbedrijven en konijnenbedrijven in het Covid-19 risicogebied beschreven. Na de eerste vier besmettingen zijn er tot 29 juli nog op 22 andere nertsenbedrijven SARS-CoV-2 besmettingen vastgesteld. Deze bedrijven zijn zo snel mogelijk geruimd en daar is geen uitgebreid onderzoek gedaan zoals op de eerste bedrijven. Momenteel vindt nader onderzoek naar de besmettingsroutes op deze bedrijven plaats, de resultaten daarvan zullen later worden gerapporteerd.

Doel van het onderzoek

Doel van dit onderzoek is om inzicht te krijgen in de verspreiding van het virus van mens op dier, tussen dieren, tussen bedrijven, van dier op mens, de pathologie bij nertsen en de verspreiding in het milieu. Met behulp van deze gegevens kan het risico worden ingeschat van de infecties voor de volksgezondheid en de diergezondheid.

Onderzoek bij nertsen

Ziekteverloop

De eigenaar van NB1 (Gemert-Bakel) meldde op 19 april verhoogde sterfte bij drachtige teven. De dieren zijn op 21 april ter sectie aangeboden bij GD Deventer waar pneumonie (longontsteking) werd vastgesteld. Op 22 april was de sterfte afgenomen op de eerste locatie van het bedrijf (NB1a), maar nam de praktiserend dierenarts luchtwegproblemen waar op de andere locatie (NB1b). Op dat moment bleken de testen op bacteriële pneumonie negatief en is onder andere SARS-CoV-2 diagnostiek ingezet, die op 23 april positief bleek. De diagnose werd bevestigd bij

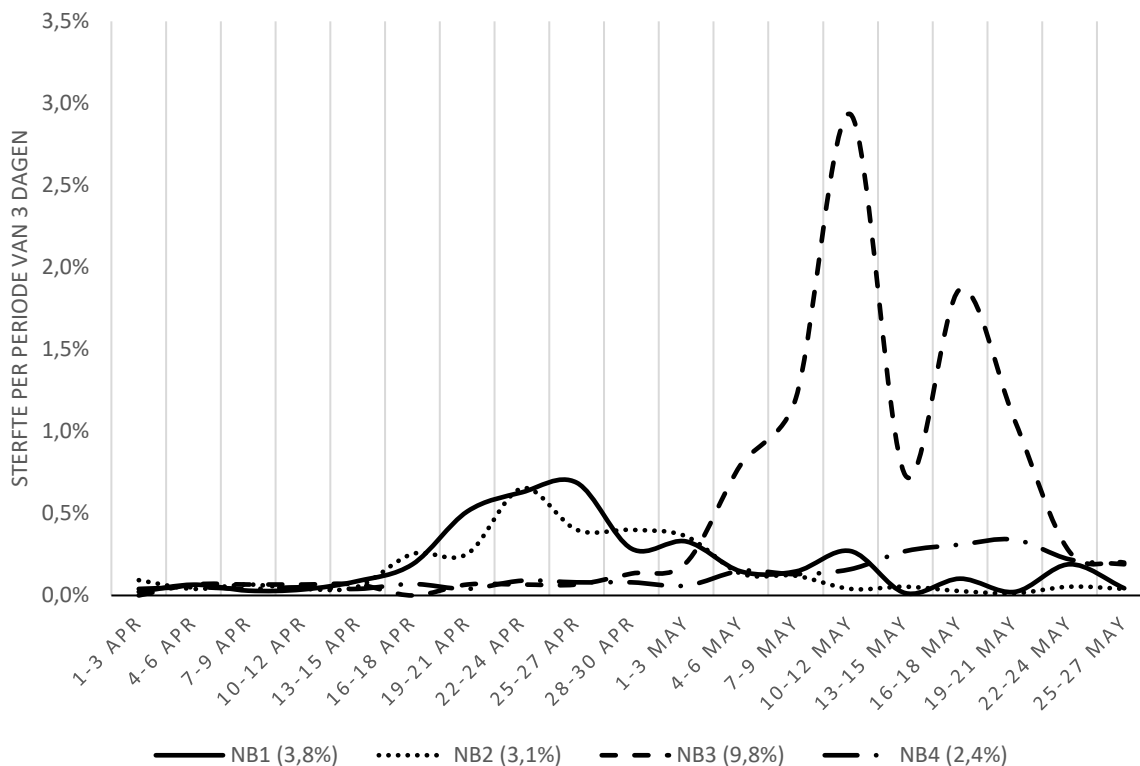
WBVR in longweefsel (PCR¹, Ct-waarde 23,40, indicatief voor tamelijk hoge concentratie virus)). Op 30 april waren sinds het begin van de klachten 285 dieren gestorven op 12000 totaal aanwezige dieren op beide locaties (2,4%). Niet al deze dieren zullen gestorven zijn aan de gevolgen van SARS-CoV-2 infectie. De sterfte is in de weken daarna langzaam afgenomen naar het oude niveau alhoewel er incidentele verhogingen in de uitval bleven (Figuur 1). De veehouder geeft aan dat de uitval eind mei vergelijkbaar was met de verwachtingen voor deze periode. Er was wel wat diarree bij pups van de jonge teven en de pups waren volgens de veehouder 'minder mooi' dan andere jaren, maar dit is niet te kwantificeren en de relatie met SARS-CoV-2 is onduidelijk.

NB2 (Beek en Donk) meldde op 20 april klachten van de luchtwegen bij dieren en verhoogde sterfte. De dieren zijn geïnspecteerd op 22 en op 24 april. Gedacht werd aan een bacteriële pneumonie en daar is de therapie op ingezet. Toen dat niet bleek te werken zijn op 25 april longen van gestorven dieren verzameld door de praktiserend dierenarts en aangeboden bij GD Deventer voor uitwerken van virale differentiaal diagnoses. Diagnostiek op SARS-CoV-2 bleek op 25 april positief en ook deze uitslag werd bevestigd bij WBVR. Op 30 april waren sinds het begin van de klachten 90 dieren gestorven van de 7500 aanwezige dieren (1,2%). Niet al deze dieren zullen gestorven zijn aan de gevolgen van SARS-CoV-2 infectie. De sterfte is in de daaropvolgende twee weken teruggedaan naar het oude niveau en was daarna vergelijkbaar met de verwachtingen van de veehouder voor deze periode. Er was wel wat diarree bij pups van de jonge teven en bij een evaluatie op het moment van de ruiming viel het de veehouder op dat zowel het aantal pups als de grootte van de pups achterliep op zijn verwachtingen.

NB3 (Deurne) meldde op de ochtend van 6 mei verhoogde sterfte en verschijnselen van longontsteking bij de drachtige teven. De dieren zijn dezelfde dag geïnspecteerd en de PCR voor SARS-CoV-2 bleek op 7 mei positief. Op 11 mei gaf de veehouder aan dat er nu ook pups doodgingen, en dat teven met pups voer weigerden. Hierop zijn pups opgehaald en op 12 mei onderzocht bij WBVR waar SARS-CoV-2 aangetoond werd. Ziekte en uitval bij de teven met nesten hielden aan, met sterfte van pups door het gebrek aan maternale zorg, hetzij door infectie met het virus. Teven die voer weigeren verliezen sowieso al snel het nest en deze dieren worden uit welzijnsoogpunt in een vroeg stadium geëuthanaseerd. De mortaliteit ligt op dit bedrijf daarom ook dicht bij de morbiditeit, en is moeilijk te vergelijken met de andere bedrijven. Over de periode april-mei ging 9,8% van de volwassen teven dood (Figuur 1). Niet al deze dieren zullen gestorven zijn aan de gevolgen van SARS-CoV-2 infectie, maar bij incidentele secties was longontsteking met een vermoeden van COVID wel de voornaamste bevinding. In de dagen voor de ruiming was de sterfte al aanzienlijk lager.

NB4 (de Mortel) werd op 6 mei bezocht door GD en NVWA in het kader van het traceringsonderzoek; het betreft een locatie behorende bij de familie die ook NB1 bezit. Op een incidentele nerts met respiratieklachten na, werd er geen opvallende kliniek waargenomen, maar de enkele gestorven dieren bleken wel longontsteking te hebben. De sterfte was niet verhoogd, maar bij de gestorven dieren werd op 7 mei SARS-CoV-2 middels PCR aangetoond. Op 13 mei meldde NB4 dat de sterfte bij de teven wat opliep. Op dat moment waren er ook meerdere teven met respiratieklachten en sommige van deze dieren stopten met eten. De uitval bleef nog een week licht stijgen en ging daarna naar beneden (Figuur 1). Eind mei meldde de veehouder dat de sterfte bij de teven in zijn beleving gebruikelijk was voor deze tijd van het jaar.

¹ PCR toont viraal RNA aan, hoe lager de Ct-waarde, des te hoger de concentratie, voor het gemak spreken we hier van virus concentratie in plaats van viraal RNA.



Figuur 1. Sterfte bij de volwassen dieren op NB1-4 uitgedrukt als percentage van de fokpopulatie op de betreffende locaties.

Onderzoek op zieke en/of gestorven dieren

Op NB1 en NB2 werden van eind april tot eind mei één keer per week de recent gestorven dieren verzameld en onderzocht en op NB3 en NB4 gebeurde dit bij de detectie van de ziekte en op de afsluitende meting op 26 mei (Tabel 1). Op alle bedrijven was de proportie virus positieven onder de gestorven dieren hoog bij de eerste meting, en op NB1 en NB2 laag, maar niet afwezig, bij de laatste meting. Alle dieren die positief waren in de rectaalswab waren eveneens positief in de keelwab.

Sectieonderzoek en PCR. De relatie tussen macroscopisch zichtbare longontsteking en PCR uitslagen (keelwab en rectaalswab) geeft aan dat macroscopische beoordeling op sectie een goede eerste screening kan geven, maar dat PCR nodig is voor bevestiging en voor detectie in situaties met weinig kliniek, zoals aan het einde van de meetperiode op NB1 en NB2 werd gezien. De macroscopische pathologie bij pups was minder duidelijk dan bij volwassen dieren. De Ct waardes van de PCR op keelwab waren ook relatief hoog, waardoor niet bij elke pup duidelijk is of sprake is van infectie of contaminatie vanuit de melk van besmette teven. Er werden echter wel histologische en immunohistochemische aanwijzingen voor virale longschade gevonden bij enkele pups, als tekens dat pups wel degelijk geïnfecteerd kunnen worden.

Tabel 1. Macroscopische bevindingen van longontsteking en PCR resultaten van keelwabs en rectaalswabs bij gestorven dieren van NB1 - NB4 tijdens routinematige beoordeling van random gestorven dieren

Bedrijf	Datum	Longontsteking	SARS-CoV-2 PCR	
			keelwab	Rectaalswab
NB1	28 April	17/18	18/18	16/18
	4 Mei	5/8	6/8	3/8
	12 Mei	5/14	4/14	0/14
	19 Mei	1/10	2/10	-
	26 Mei	0/10 volw. 0/9 pups	2/10 volw. 0/9 pups	-
NB2	27 April	12/18	18/18	17/18
	4 Mei	2/5	5/5	0/5
	12 Mei	9/20	16/20	0/20
	19 Mei	3/7	3/7	-
	26 Mei	0/9 volw. 0/35 pups	0/9 volw. 4/35 pups	-
NB3	6 Mei	6/6	6/6	3/6
	26 Mei	2/2 volw. 2/10 pups	2/2 volw. 10/10 pups	-
NB4	6 Mei	3/3	2/3	0/3
	26 Mei	5/5 volw. 2/8 pups	4/5 volw. 8/8 pups	-

Onderzoek bij mensen

De ziektegeschiedenis bij eigenaren/staf is afgenomen conform de landelijke afspraken van de GGD. De GGD heeft ook monsters afgenomen van eigenaren en medewerkers op de bedrijven. Op NB1 werd bij vier personen met klachten op 28 april materiaal afgenomen voor onderzoek met PCR. Alle vier testten positief op SARS-CoV-2, maar met relatieve lage virale loads, waardoor slechts bij één persoon voldoende RNA aanwezig was voor sequentieanalyse. Op 11 mei werden nog twee andere personen bemonsterd vanwege klachten. Een van hen testte positief met een lage virale load.

Bij bedrijf NB2 was op 31 maart een persoon met klachten opgenomen in het ziekenhuis en positief getest op SARS-CoV-2. Het materiaal bevatte helaas te weinig viraal RNA voor sequentieanalyse. Een tweede persoon werd getest vanwege klachten op 30 april maar bleek negatief. Op bedrijf NB3 testten alle betrokken personen op het moment van detectie van het bedrijf negatief op viraal RNA

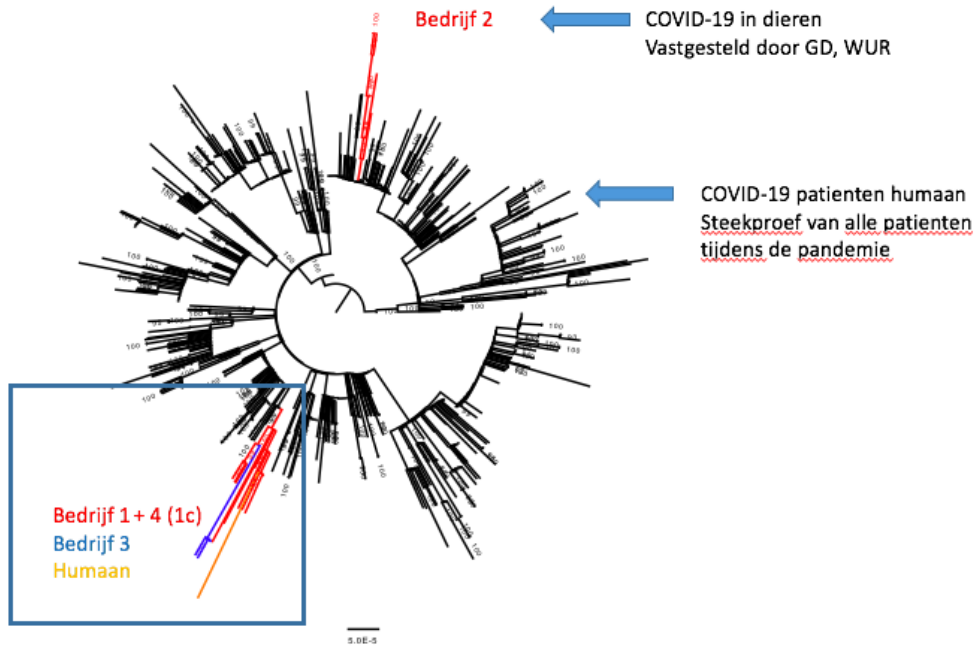
en antistoffen. Later traden bij drie personen klachten op en werd materiaal afgenomen voor PCR op respectievelijk 18 mei (1) en 20 mei (2). Alle drie werden positief getest en het virus werd gesequenced. Op bedrijf NB4 werd bij één van de drie personen met milde klachten SARS-CoV-2 aangetoond.

Om na te gaan hoe de virussen van de nertsen gerelateerd zijn aan die van omwonende patiënten werd materiaal opgevraagd van patiënten die eerder waren gediagnosticeerd met SARS-CoV-2 binnen de 4-cijferige postcode gebieden waar ook de bedrijven in vallen, om deze sequenties te vergelijken met de verkregen sequenties van nertsen en mensen woonachtig of werkzaam op de nertsenbedrijven.

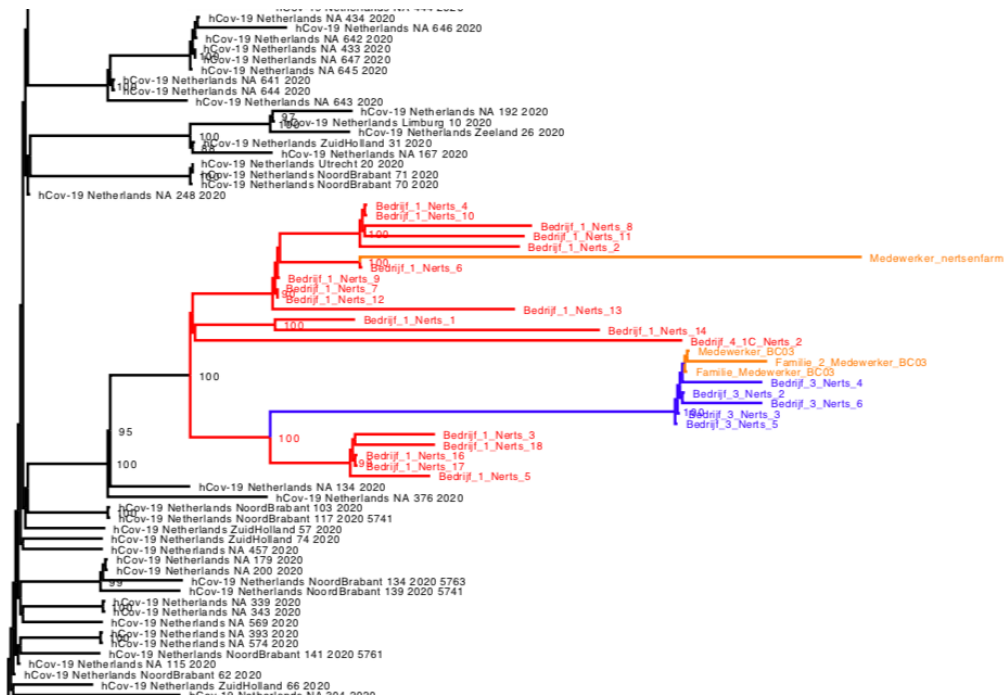
Sequentieanalyse

De sequenties van de virussen zijn bepaald en geanalyseerd. Het gaat om 17 dieren van NB1, 8 dieren van NB2, 5 dieren van NB3 en 1 dier van NB4. Figuur 2 laat zien dat de nertsen op NB1 en NB2 tot verschillende clusters behoren en dus vanuit een verschillende bron zijn besmet en elkaar niet besmet kunnen hebben. Binnen elk van de bedrijven zijn de verschillen tussen de aangetoonde virussen klein, maar groter dan wordt gezien bij mensen die in groepen bijeen wonen (bv bij een uitbraak in verpleeghuizen). Dat is een aanwijzing voor het al langer aanwezig zijn van het virus is op de bedrijven (meerdere weken). De sequentie van SARS-CoV-2 op bedrijf NB4 is nauw verwant aan die van NB1. NB1 en NB4 hebben een nauwe relatie en gezien de ziektegeschiedenis is het meest waarschijnlijk dat NB4 vanuit NB1 is besmet. Echter, ook de sequenties van NB3 vormen een cluster binnen de sequenties van NB1 en samen met de ziektegeschiedenis op de bedrijven lijkt het ook hier het meest aannemelijk dat NB3 vanuit NB1 is geïnfecteerd. Een epidemiologische link kon hier echter niet worden opgespoord. De gevonden verschillen tussen de sequenties van de virussen binnen de bedrijven duiden op nerts op nerts transmissie.

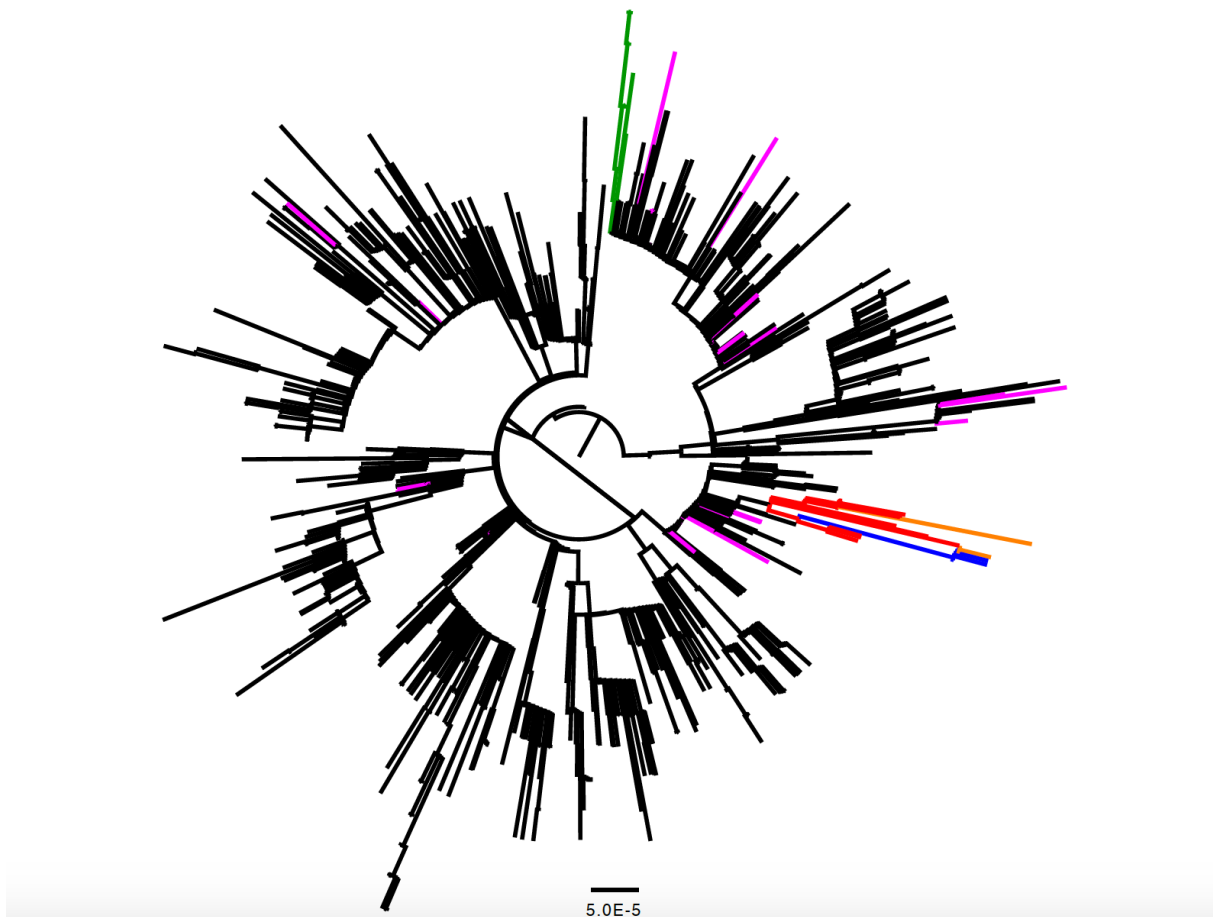
De sequenties van een persoon op bedrijf NB1 en drie personen op bedrijf NB3 zijn nauw verwant aan virussen die ook bij de dieren op de desbetreffende bedrijven werden gevonden, meer verwant dan met andere in Nederland vastgestelde sequenties (Figuur 3). Op NB1 ging het om een persoon die pas een aantal weken met de nertsen werkte en op NB3 om drie personen die bij aanvang negatief werden getest en pas ruim een week na diagnose bij de nertsen verschijnselen ontwikkelden. Het hele cluster van virussen bij dieren en mensen op NB1, NB3 en NB4 is duidelijk verschillend van virussen die in de voorafgaande weken in de regio gevonden werden bij mensen, ook na aanvulling van een selectie van sequenties uit dezelfde postcodegebieden (Figuur 4). De ziektegeschiedenis en de clustering van de virussequenties ondersteunen de conclusie dat aanvankelijk de nertsen vanuit een mens geïnfecteerd zijn geraakt maar dat op NB1 en NB3 tenminste een persoon zeer waarschijnlijk vanuit de nertsen is besmet.



Figuur 2. Fylogenetisch diagram van een steekproef van de sequenties van Nederlandse humane SARS-CoV-2 positieve patiënten die tot nu toe zijn gegenereerd. De monsters (nerts en humaan) van de nertsenbedrijven NB1, NB2, NB3 en NB4 zijn weergegeven in verschillende kleuren.



Figuur 3: Vergroting van de fylogenetisch boom van Figuur 2, ingezoomd op de sequentiedata van bedrijven 1, 3 en 4. Zowel op bedrijf 1 als op bedrijf 3 zijn personen met een COVID-19 infectie waarbij de virussequentie het meest lijkt op virussen gevonden bij nertsen.



Figuur 4: Aanvullende sequenties van personen uit de 4-cijferige postcode gebieden in de buurt van de bedrijven, aangegeven in paars, clusteren niet met sequenties van nertsbedrijven.

Serologisch onderzoek bij de nertsen

Een eerste monsternamen van bloed ten behoeve van serologisch onderzoek vond plaats op 27 en 28 april (respectievelijk NB2 en NB1ab). Omdat bij de verwerking van de monsters de dieridentificaties van de monsters verloren is gegaan, werd per bedrijf een steekproef van 8 samples getest in de virusneutralisatie test (VNT). Op een monster van NB1a na werden in al deze monsters antistoffen tegen SARS-CoV2 aangetoond.

Bij de tweede bloedbemonstering op 12 en 13 mei, van respectievelijk NB1ab en NB2) werden op bedrijf NB1a alle 60 bemonsterde dieren seropositief bevonden. Op bedrijf NB1b waren 52 van de 60 bemonsterde dieren seropositief en op bedrijf NB2 waren alle 60 dieren seropositief in de VNT.

Bij een derde bloedbemonstering op 25 en 26 mei (respectievelijk NB2 en NB1ab) waren alle 60 bemonsterde dieren seropositief op bedrijf NB1a, 54 van 60 op bedrijf NB1b en 57 van de 60 op bedrijf NB2.

Onderzoek in omgeving en in mest

Luchtmetingen

NB1 en NB2

Omgevingsmonsters zijn op drie dagen, steeds met een week ertussen, genomen op drie locaties (NB1A, NB1B, NB2) conform het projectplan.

- Drie stationaire meetlocaties met actieve sampling per stal, meting inhaleerbaar stof (massafractie van de in lucht zwevende deeltjes die het ademhalingsorgaan kan penetreren) en meting PM₁₀ (fijnstoffractie van deeltjes met een nominale aerodynamische diameter van 10 µm of kleiner).
- Twee persoonlijke luchtmetingen (metingen gedaan met een pompje meegedragen door veldwerkers; vanaf 2 mei (inhaleerbaar stof), en vanaf 5 mei inhaleerbaar stof en PM₁₀)

Buiten de stal zijn op elke meetdag 6-uurs luchtmonsters genomen:

- Op alle meetdagen zijn drie meetpunten buiten gekozen, waarbij rekening is gehouden met de windrichting (benedenwinds op zowel korte afstand van de stal (circa 10 meter) als op circa 100 meter afstand; bovenwinds op circa 50 meter afstand van de stal).

Buiten de stal zijn langdurige luchtmonsters genomen:

- Op het erf van elke locatie zijn twee pompen geplaatst, één Derenda 10 L/min met Harvard impactor (PM₁₀), en één Gilian GilAir 5 pomp 3,5 L/min met GSP sampler (inhaleerbaar stof). Om de vier dagen zijn de filters gewisseld.
- Op drie locaties (Milheeze dorp, 1500 m van bedrijf NB1A; Beek en Donk dorp, 1200 m van bedrijf NB2; Bunnik, achtergrondlocatie) zijn Derenda pompen geplaatst (10 L/min met Harvard impactor (PM₁₀)). Om de week zijn de filters gewisseld.

In Tabel 2 staan de monsters die in week 1 positief zijn bevonden gebaseerd op qPCR analyse (WBVR, Lelystad). Alle positieve monsters waren inhaleerbaar stofmonsters. Alle PM₁₀ monsters van NB1 en NB2 waren negatief. In de tweede en derde week waren alle luchtmonsters negatief.

Tabel 2. Meetresultaten luchtmonsters NB1 en NB2

Locatie	Datum	Week	Samples in de stal	Persoonlijke monsternamen	6-u buiten de stal	Langdurig buiten de stal
NB1A	28-4	1	2 x lage concentratie virus in inhaleerbaar stof (Ct 35,95 en 38,18)		ND	ND
NB2	30-4	1	1 x lage concentratie virus in inhaleerbaar stof (Ct 35,14)		ND	ND
NB1B	2-5	1	1 x lage concentratie virus in inhaleerbaar stof (Ct 35,03)	2 x lage concentratie virus in inhaleerbaar stof (Ct 35,44 en 37,18)	ND	ND
NB1A	5-5	2	ND	ND	ND	ND
NB2	7-5	2	ND	ND	ND	ND
NB1B	9-5	2	ND	ND	ND	ND
NB1A	12-5	3	ND	ND	ND	ND
NB2	14-5	3	ND	ND	ND	ND
NB1B	16-5	3	ND	ND	ND	ND

ND: niet detecteerbaar

NB4

Omdat op NB4 wel SARS-CoV-2 middels PCR werd aangetoond, maar er geen sprake was van opvallende kliniek of sterfte is het bedrijf bezocht voor additionele luchtmetingen.

In de stal zijn op één meetdag 6-uurs luchtmonsters genomen:

- Zes stationaire meetlocaties met actieve sampling, meting inhaleerbaar stof.
- Twee persoonlijke luchtmetingen, inhaleerbaar stof en PM₁₀

Buiten de stal, op het erf zijn meerdaagse luchtmonsters (3 of 4 dagen) genomen op vier posities:

- Locatie NB4 positie A, direct bij open ingang van de stal.
- Locatie NB4 positie B en NB4 positie C, op een paar meter afstand van NB4 positie A.
- Locatie NB4 positie D, bij ingang kantine, aan de voorkant van het bedrijf, buiten de omheining waar de stallen liggen, maar binnen de omheining van de bedrijfslocatie.

Er is in verschillende stoffracties gemeten: PM₁₀, inhaleerbaar stof, en met Harvard impactor zonder impactieplaat ("totaal stof"). Niet op alle locaties/data zijn alle stoffracties gemeten.

In Tabel 3 en 4 staan de resultaten van de qPCR analyse. In fijnere stoffracties werd minder virus RNA aangetoond dan in grovere fracties (totaal/inhaleerbaar > PM₁₀). Binnen in de stal en buiten op het erf werd virus RNA aangetoond.

Tabel 3. Meetresultaten luchtmonsters in de stal, NB4

Datum	Type meting	Stationair	Persoonlijk
19-5	Inhaleerbaar stof	Ct 33,0; 33,9; 34,4; 36,2; ND; ND	31,7 en 31,8
19-5	PM ₁₀	Ct 34,8; 35,8;; 36,9	33,0 en 35,5

NA: niet geanalyseerd.

Tabel 4. Meetresultaten luchtmonsters buiten de stal, vier posities op het erf, NB4

Startdatum	Type meting	NB4 positie A	NB4 positie B	NB4 positie C	NB4 positie D
13-5	Inhaleerbaar stof	34,8			
13-5	PM ₁₀	ND			
16-5	Inhaleerbaar stof	33,9			
16-5	PM ₁₀	37,2			
21-5	Inhaleerbaar stof	32,2			
21-5	PM ₁₀	35,0			
22-5	Totaal stof	ND	34,5	ND	ND
25-5	Inhaleerbaar stof	36,1	ND	37,6	ND
25-5	PM ₁₀	ND			
25-5	Totaal stof	34,9	38,4	35,4	ND
28-5	Inhaleerbaar stof	ND			ND
28-5	PM ₁₀	33,0			
28-5	Totaal stof	31,1	33,0	34,9	32,5

ND: niet detecteerbaar.

Onderzoek dierverblijven

Op iedere meetlocatie (NB1A en NB1B, NB2, NB4) zijn, tijdens elke meetdag, monsters in circa 10 dierverblijven genomen, waarbij met name gekozen is voor bemonstering in kooien van recent gestorven dieren, ziek ogende dieren, of dieren waarbij door de GD bloed getapt is. De volgende monsters zijn genomen:

- Dry swab van drinkwatervoorziening
- Feces uit de kooi indien aanwezig of van de grond onder de kooi (soms vermengd met strooisel)
- Voerresten (ingedroogd of vers), boven op de kooi
- Strooisel uit het nachthok
- Veegmonster van de hardboard rand van het nachthok
- EDC's (passieve luchtmonsters). geplaatst boven op lege kooien, of op andere locatie dichtbij de kooien; blootstellingsduur één week

Resultaten van de bovengenoemde monsters staan in Tabel 5. Alle veegmonsters van de rand van het nachthok zijn positief, en ook een groot percentage van de strooiselmonsters en passieve luchtmonsters.

Tabel 5. PCR resultaten van omgevingsmonsters, NB1, NB2 en NB4

Sample type	N (%) detecteerbaar
Veegmonster van hardboard rand kooi	99/99 (100%)
Strooiselmateriaal uit nachthok	81/94 (86%)
Passieve luchtmonsters (EDC)	81/99 (82%)
Feces uit of onder de kooi	55/95 (58%)
Swab van drinkwatervoorziening	34/100 (24%)
Voerresten	11/91 (12%)

Onderzoek dierverblijven na ruiming

Op NB4 zijn op 23 juni, twee weken na het ruimen van de nertsen, dezelfde 14 kooien opnieuw bemonsterd. Op 19 mei was virus detecteerbaar in 14/14 strooiselmonsters. Zowel de bovenste laag van het strooisel (dat bij ruimen met desinfectiemiddel is behandeld) als materiaal iets dieper in de strooisellaag is bemonsterd, en in 10/14, respectievelijk 12/14 monsters was viraal RNA nog steeds detecteerbaar. De overall trend is toename in Ct voor post-ruiming versus pre-ruiming (paar uitzonderingen daargelaten), hetgeen duidt op afname van de hoeveelheid viraal RNA. In welke mate dat het effect is afbraak in de tijd of de desinfectie is niet duidelijk. Ook was de Ct waarde in de bovenlaag hoger dan in de bodemlaag. Een aantal monsters in de bodemlaag hadden een opvallend lage Ct waarde (20 tot 24), wat duidt op aanwezigheid van een grote concentratie viraal RNA. Van in totaal vijf monsters met laagste Ct-waarden (hoogste concentraties virus RNA) is viruscultuur ingezet op verocellen. Ook na passage van de celculturen kon geen infectieus virus aangetoond worden.

Tabel 6. PCR resultaten van strooiselmonsters na het ruimen van de nertsen, NB4

	Pre-ruiming	Post-ruiming hok bodemlaag	Post-ruiming hok bovenlaag
hok	PCR_Ct	PCR_Ct	PCR_Ct
1	30,36	30,1	27,48
2	29,97	ND (te weinig stromateriaal: mengselmonster van bodem- en bovenlaag)	
3	29,62	31,21	ND
4	28,28	29,99	32,62
5	26,54	24,38	24,98
6	28,28	30,39	ND
7	27,12	33,32	ND
8	25,68	28,55	27,16
9	27,33	20,37	30,82
10	26,39	ND	30,83
11	23,47	30,02	30,16
12	21,84	28,27	36
13	22,14	21,83	26,82
14	30,15	42	41,2

ND: niet detecteerbaar.

In andere omgevingsmonsters van de geruimde kooien werd minder vaak virus RNA gedetecteerd dan in de strooisellaag (Tabel 7).

Tabel 7. PCR resultaten van overige kooimonsters na het ruimen van de nertsen, NB4

Sample type	N (%) detecteerbaar
Veegmonster van hardboard rand kooi	3/18 (17%)
Feces uit of onder de kooi	4/18 (22%)
Swab van drinkwatervoorziening	0/18 (0%)
Voerresten	0/18 (0%)
Passieve luchtmonsters (EDCs)	3/11 (27%)

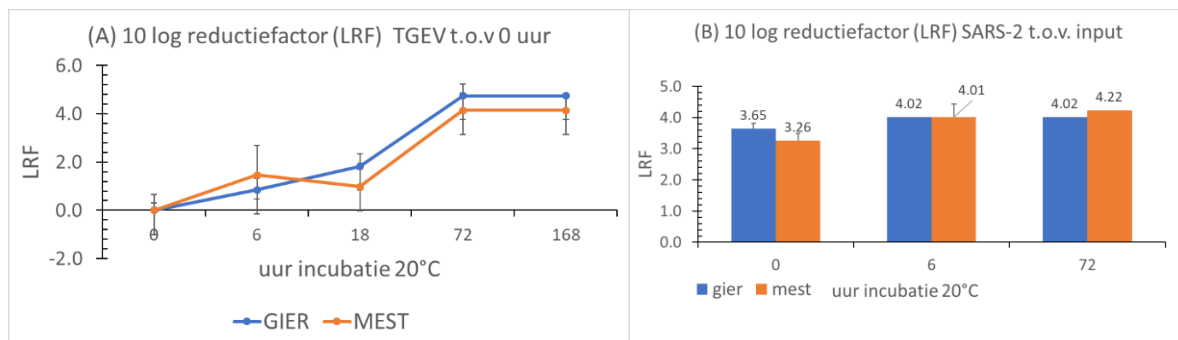
Fecesonderzoek

Er zijn ook willekeurig rectaalswabs genomen van dieren verspreid over de stal, gelijktijdig met de bloedafname voor het serologisch onderzoek. In NB1(a en b) zijn daarbij bij de eerste monsternamen 53 monsters genomen waarvan in 11 viraal RNA werd aangetoond met de PCR (Ct waarden tussen de 36 en 39). In NB2 werden 30 monsters genomen waarvan in 9 monsters viraal RNA werd aangetoond met PCR (Ct-waarden tussen de 30-35).

Bij de tweede monstername werd het PCR onderzoek gekoppeld aan het serologisch onderzoek. Bij deze tweede monstername (periode 22 tot 29 mei) werd geen viraal RNA meer aangetoond in de ontlasting. Het is niet gelukt virus te kweken uit rectaalmonsters.

Overleving van SARS-2 en TGEV in mest en giertank vloeistof.

Mesthoopmateriaal en giertankvloeistof van een onbesmet nertsbedrijf (negatief getest in serologische screening en Early Warning en gelegen boven de rivieren) zijn gespiked met infectieus SARS-CoV-2 en het Transmissible gastroenteritis virus (TGEV). TGEV is een coronavirus dat in de darm van varkens replicateert en in hoge concentraties in feces wordt uitgescheiden en in mest stabiel/infectieus blijft. Mest- en giertankmonsters die bewaard waren bij 4°C zijn in duplo gespiked, verdeeld in porties en gedurende maximaal 1 week (168 uur) opgeslagen bij 20°C. Voor TGEV zijn op 0 uur (direct na spiken), 6, 18, 72 en 168 uur duplo porties ingevroren bij -80°C. Voor SARS-CoV-2 zijn er op 0 uur (direct na spiken), 6, en 72 uur duplo porties ingevroren bij -80°C. In alle samples is de concentratie van infectieus (= op cellen te kweken) virus bepaald d.m.v. titratie en is de afname in concentratie infectieus virus t.o.v. de concentratie virus teruggevonden bij 0 uur (TGEV) of t.o.v. de concentratie gespikete hoeveelheid infectieus SARS-CoV-2 virus (input) op elk tijdstip berekend en weergegeven als 10 log reductiefactor in virustiter (LRF)(Figuur 5). Na 6 en 18 uur werd er ~10% infectieus TGEV teruggevonden in de mest en giertankvloeistof. Na 72 uur kon er geen infectieus TGEV meer worden aangetoond (max. meetbare LRF=4.2 en 4.8 voor mest en gier respectievelijk). Spiking van SARS-CoV-2 in mest en giertankvloeistof bij 4°C, zonder incubatie bij 20°C (0 uur) reduceerde de hoeveelheid kweekbaar SARS-CoV-2 fors (LRF=3.3 en 3.7, respectievelijk). Na 6 uur werd er geen infectieus SARS-CoV-2 meer in de giertankvloeistof gemeten (max. meetbare LRF=4.02) en was er in de mest nog een kleine fractie (<0.1%) van het gespikte SARS-CoV-2 infectieus. Na 72 uur werd er ook in mest geen infectieus SARS-CoV-2 meer aangetoond. Uit PCR analyse bleek dat er na 0, 6 en 72 uur incubatie geen meetbare afbraak van SARS-CoV-2 RNA had plaatsgevonden, zowel in de mest als giertankvloeistof.



Figuur 5. Afname in infectiviteit van gespiked TGEV (A) en SARS-2 (B) in mesthoop materiaal en giertank vloeistof van een "PCR-negatief" nertsbedrijf.

Conclusie: De overlevingstijd van gespiked infectieus SARS-CoV-2 in de mesthoop en giertankvloeistof is kort. Na 3 dagen opslag bij 20°C kon er geen infectieus SARS-CoV-2 virus terug geïsoleerd worden uit de mest en giertankvloeistof. Er vond echter geen aantoonbare afbraak van SARS-CoV-2 RNA plaats gedurende de 3-daagse opslagperiode. PCR resultaat in mest en gier blijkt daarmee geen goede maat voor de infectieusiteit van het virus. Mogelijk wordt het "spike oppervlakte eiwit" van het SARS-CoV-2 bij 20°C zodanig aangetast in mest en giertankvloeistof dat de binding van dit eiwit aan zijn membraan receptor om infectie van cellen te initiëren niet meer mogelijk is.

Onderzoek bij katten

Katten op bedrijf NB1 zijn op 7, 17 en 22 mei onderzocht op aanwezigheid van virus en antilichamen. In totaal zijn 30 katten en 10 kittens onderzocht, één huiskat is herhaald onderzocht vanwege respiratoire symptomen in de tweede week. Er zijn 25 bloedmonsters afgenomen van 24

volwassen katten. Bij 7/24 dieren (29%) werden antilichamen aangetoond, waarvan bij een dier ook nog een lage concentratie virus met de PCR werd aangetoond in de keelwab (Ct waarde 33). In alle gevallen betrof het hier "wilde katten", er is geen ziektegeschiedenis bekend. In de overige dieren werden geen antistoffen of virus aangetoond. De katten zijn gecastreerd voordat ze zijn vrijgelaten. Op NB2 waren geen katten aanwezig. De aanwezige hond is niet onderzocht. Op 22 mei zijn zes katten en twee honden op NB3 onderzocht. Bij deze dieren werden geen antilichamen of virus aangetoond. Op 30 mei zijn op NB4 bloedmonsters afgenomen van 13 volwassen katten, swabs zijn afgenomen bij 13 katten en 6 kittens. Bij 3/13 katten werden antilichamen aangetoond. Bij twee katten werd virus aangetoond met PCR in de keelwab (Ct waarde 32 en 37). Op dit moment worden nog katten en honden bij nieuwe, geruimde bedrijven onderzocht. Een samenvatting van de resultaten bij katten en honden staat in Tabel 8.

Tabel 8. Resultaten van onderzoek bij katten en honden

Bedrijf	Datum	N volwassen katten	N kittens	N honden*	n/N (%) antilichamen gedetecteerd bij volwassen katten	N (%) virus gedetecteerd in keel bij katten en kittens
NB1	7, 17, 22 mei	30	10	0	7/24 (29%)	1/40 (2,5%)
NB3	22 mei	6	0	2	0/6 (0%)	0/6 (0%)
NB4	30 mei	13	6	0	3/13 (23%)	2/19 (11%)
Totaal		49	16	2	10/43 (23%)	3/65 (5%)

*Bij de honden zijn geen antilichamen of virus aangetoond

Serosurveillance alle Nederlandse nertsbedrijven en konijnenbedrijven in Noord-Brabant en Limburg

Omdat de infectie op nertsbedrijven zonder duidelijke verschijnselen en sterfte kan voorkomen (NB4) was het belangrijk om de overige Nederlandse nertsbedrijven te onderzoeken op infectie met SARS-CoV-2. Uit infectie-experimenten bij de EUR is bovendien gebleken dat konijnen ook gevoelig zijn voor infectie en daarom zijn alle konijnenbedrijven in Noord-Brabant en Limburg (n=16) en één in Overijssel en één in Friesland ook serologisch gescreend.

Nertsen op alle Nederlandse nertsbedrijven zijn inmiddels onderzocht op antistoffen. Uit de screening kwamen 5 bedrijven met seropositieve bevindingen naar boven met respectievelijk 24/60, 21/64, 20/120, 3/60 en 1/60 positieve monsters (alle 5 bedrijven bleken ook positief in het Early Warning programma).

In totaal zijn achttien konijnenbedrijven gescreend, alle bedrijven in Noord-Brabant en Limburg (n=16) en één in Overijssel en één in Friesland. De laatste twee bedrijven werden onderzocht om ook monsters van buiten het Covid-19 risico gebied te hebben. Al deze bedrijven bleken serologisch negatief.

Conclusies

- 1) In het verloop van de uitbraken op de eerste twee besmette bedrijven nam de sterfte af gedurende de onderzoeksperiode, net als de incidentie van PCR positieve swabs bij gestorven dieren. Ook aan het einde van de onderzoeksperiode bleken echter nog enkele gestorven dieren positief in de PCR. Op het derde en het vierde besmette bedrijf waren op het eind van de onderzoeksperiode nog geen aanwijzingen voor een afnemende infectie.
- 2) SARS-CoV-2 infectie kan leiden tot pneumonie bij nertsen en ook tot sterfte, maar de morbiditeit en mortaliteit kan sterk wisselen van bedrijf tot bedrijf.

- 3) Op basis van de sequentieanalyse, ziektegeschiedenis van betrokken personen en serologie bij de nerts is introductie van het virus meerdere weken voor detectie op de bedrijven NB1 en NB2 waarschijnlijk.
- 4) PCR testen op keelwabs, genomen van dode dieren, lijken een geschikte detectiemethode voor SARS-CoV-2 infecties in nertsen, ook als er weinig klinische verschijnselen en verhoogde uitval meer waargenomen wordt. Rectaalswabs lijken geen duidelijke toegevoegde waarde te hebben als keelwabs worden genomen voor detectie van infectie.
- 5) Op grond van de virussequenties kan worden geconcludeerd dat de infectie op NB1 een andere bron heeft dan de infectie op NB2, deze nertsenpopulaties hebben elkaar niet onderling besmet. Het circulerend virus op elk van de locaties van NB1, op NB3, en op NB4 wijst op een gemeenschappelijke achterliggende bron of onderlinge besmetting.
- 6) De variatie in de sequenties van het virus wijst op nerts op nerts transmissie binnen de bedrijven, dit wordt verder ondersteund door de zeer hoge seroprevalentie onder de nertsen.
- 7) Virus RNA is aangetoond in de inhaleerbare stoffractie in de stal en in persoonlijke monsters, dit wijst op blootstelling van personen in de stal aan virus.
- 8) Bij de metingen op NB1 en op NB2 werd geen virus aangetoond buiten de stal. Bij metingen op NB4 werd virus RNA buiten de stal op het erf aangetroffen in verschillende stoffracties. Op NB4 werd geen virus RNA buiten het erf vastgesteld.
- 9) Op NB1 en NB4 zijn ook katten besmet (geweest) met SARS-CoV-2. Omdat het om "wilde" katten gaat is infectie van nerts op kat meer aannemelijk dan van mens op kat. Bij katten en honden op NB3 werd geen virus aangetoond.
- 10) Op grond van de genetische code van het virus en blootstellingsgeschiedenis is het waarschijnlijk zowel op NB1 als NB3 ten minste een persoon besmet is door een nerts.
- 11) In de databank van virusgenomen van Covid-19 patiënten in Nederland zijn geen sequenties aanwezig die ontstaan kunnen zijn uit het virus dat bij de nertsen op deze vier bedrijven circuleert (met uitzondering van de onder conclusie 10 genoemde personen). Een selectie van positieve monsters van Covid-19 patiënten (Ct<32) in de postcodegebieden rond de bedrijven is daarin meegenomen.
- 12) Met de serologische screening van alle Nederlandse nertsbedrijven zijn op vijf bedrijven antistoffen tegen SARS-CoV-2 aangetoond. Op al deze vijf bedrijven werd ook virus aangetoond in het Early Warning programma.