



**SARS-CoV-2 antistoffen
onderzoek bij varkens in
Nederland**
Eindrapportage

Prof. dr. J.A. Stegeman

Namens de consortium partners

Universiteit Utrecht

Erasmus MC

Royal GD Deventer

Amphia Ziekenhuis

Oktober 2020

Inhoud

Hoofdstuk 1	3
Introductie	3
Aanleiding	3
SARS-CoV-2 bij varkens	3
Hoofdstuk 2	6
Materiaal en methoden	6
Evaluatie van de SARS-CoV-2 antilichaamtest	6
Seroprevalentie status voor SARS-CoV-2 bij varkens	6
Bedrijfsselectie	7
Steekproef	7
Monsterverzameling en -verwerking	8
Test algoritme	8
Gegevensanalyses en -statistiek	8
Ethiek en data eigendom	8
Hoofdstuk 3	9
Resultaten	9
Evaluatie van de SARS-CoV-2 antilichaamtesten	9
Serologie resultaten voor SARS-CoV-2 bij varkens	10
Hoofdstuk 4	12
Discussie en conclusie	12
Conclusie en relevantie	13
Hoofdstuk 5	14
Referenties	14
Bijlage 1	16

Hoofdstuk 1

Introductie

Aanleiding

In Nederland is SARS-CoV-2 sinds begin 2020 wijd verspreid bij mensen. In maart 2020 werd in een specifieke regio van de provincie Noord-Brabant een opvallende dichtheid van COVID-19 infecties waargenomen, waarbij de gemeenten Uden en Gemert-Bakel ~215 gevallen per 100.000 inwoners rapporteerden (Osiris-Algemene-Infectieziekten-database, 2020). Deze regio is ook een van de meest varkensdichte regio's in het land en verschillende media veronderstelden associaties tussen de hoge aantallen humane patiënten met SARS-CoV-2 en infecties bij vee.

SARS-CoV-2 bij varkens

In de vroege fase van de epidemie, maart 2020, waren er zorgen dat varkens besmet zouden kunnen worden met SARS-CoV-2 en het potentieel bijkomend risico voor de mens. Een van de redenen voor deze hypothese was dat de aminozuren die coderen voor het angiotensine-converterende enzym 2 (ACE2) receptor bij varkens een hoge homologie vertonen met de genetische code voor de ACE2 receptor bij mensen. Deze receptor is belangrijk voor SARS-CoV-2 om cellen te infecteren (Gu and Korteweg, 2007; Imai et al., 2005; Wan et al., 2020). Bovendien hadden Chinese onderzoekers in 2018 melding gemaakt van massale sterfte en acute diarree bij varkens veroorzaakt door een ander vleermuis gerelateerd Coronavirus, genaamd SADS (Zhou et al., 2018). Ten slotte kunnen varkens wel experimenteel worden besmet met SARS-CoV-1 (SARS coronavirus 1) en MERS-CoV (Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus), maar varkens fungeren voor deze virussen als eindgastheer. Varkens vertonen geen openlijke tekenen van ziekte en kunnen deze infecties niet efficiënt overbrengen naar andere varkens. De bijdrage van varkens aan de blootstelling van mensen aan deze corona virussen is op grond van deze gegevens verwaarloosbaar.

Voor andere specifieke coronavirussen is het bekend dat deze heel efficiënt tussen varkens kunnen verspreiden en tevens endemisch kunnen worden op varkensbedrijven, zoals het respiratoir varkens coronavirus (PRCV), het gastro-enteritisvirus (TGEV), het porcine epidemische diarree virus (PEDV) en het hemagglutinatie encefalomyelitisvirus (PHEV). Bij het gebruik van diagnostische tests voor detectie van antistoffen tegen SARS-CoV-2 moet rekening worden gehouden met de mogelijke kruisreacties met de endemisch voorkomende coronavirussen. ErasmusMC heeft verschillende SARS-CoV-2 antilichaamtesten opgezet, (Okba et al., 2020; Westerhuis et

al., 2020) wat onderzoek naar blootstelling aan SARS-CoV-2 mogelijk maakt.

Het potentieel vermogen van SARS-CoV-2 om varkens te infecteren, eventuele klinische effecten en eventuele overdracht tussen varkens onder geconditioneerde omstandigheden, is onlangs onderzocht in verschillende onderzoekscentra wereldwijd (Harbin (HRVI, CN) (Shi et al., 2020), IRTA/CRISA (ES) (Veragara-Alert et al., 2020), FLI (GE) (Schlottau et al., 2020), CFIA (CA) (Pickering et al., 2020) en KSU (USA) (Meekins et al., 2020). In deze studies (Bijlage 1, Tabel 1) bleek bij de meeste experimenteel blootgestelde varkens dat varkens niet besmet kunnen worden. Vier van de vijf gepubliceerde experimentele studies melden afwezigheid van klinische verschijnselen, evenals afwezigheid van virus of slechts zeer lage en voorbijgaande niveaus van virusdetectie na blootstelling. Slechts één studie maakt melding van één monster met infectieus SARS-CoV-2 virus, geïsoleerd uit een lymfeklier op dag 13 na infectie (Pickering et al., 2020). Een andere studie toonde aan dat varkens na intraveneuze of intramusculaire infectie een antilichaamrespons hebben die specifiek is voor SARS-CoV-2 (Veragara-Alert et al., 2020). Er wordt op basis van deze resultaten gesuggereerd dat het virus immunogeen is voor varkens, in reactie op specifieke blootstellingsroutes (Veragara-Alert et al., 2020).

De resultaten van de experimentele studies met SARS-CoV-2 bij varkens sluiten niet per se uitbraken onder veldomstandigheden uit. In dierexperimenten blijkt namelijk de wijze van blootstelling en transmissie in het veld soms moeilijk na te bootsen. Voorbeelden van verschillen tussen transmissie na experimentele en natuurlijke blootstelling van andere virussen bij varkens zijn mond- en klauwzeer virus bij gevaccineerde varkens (Orsel et al., 2007) en Hepatitis E virus (Bouwknegt et al., 2009). Ook onderzoekers van SARS-CoV-2 infecties bij varkens benoemen de noodzaak van veldonderzoek (Pickering et al., 2020).

In deze studie evalueren wij of SARS-CoV-2 heeft geleid tot uitbraken in de varkensstapel, door middel van het meten van antilichamen tegen SARS-CoV-2 bij varkens uit de regio Uden/Gemert-Bakel. We veronderstellen dat verschillende varkensbedrijven rond de gemeenten Uden en Gemert-Bakel zijn blootgesteld aan SARS-CoV-2 dat circuleert onder de humane bevolking. De infecties in de nertsenhoudery tonen ook aan dat dieren in deze regio zijn blootgesteld aan het virus. In het geval dat het varken in staat is het virus efficiënt over te brengen ($R_0 > 1$, ofwel een geïnfecteerd

dier infecteert meer dan 1 andere dieren), kan dit na introductie van het virus resulteren in grote uitbraken (d.w.z. de meerderheid van de dieren raakt geïnfecteerd). De kans op zo'n grote uitbraak is $(1 - (1/R_0))$. Bijvoorbeeld in geval $R_0=3$ is de kans op een grote uitbraak $2/3$ en zal de verwachte prevalentie van antistoffen in een groep uiteindelijk $\pm 94\%$ zijn (de fractie vatbare individuen aan het eind van een uitbraak is: $s(\infty) = \exp(-R_0(1 - s(\infty)))$ (Kermack, 1927)). Derhalve zijn beperkte steekproefgroottes per bedrijf voldoende om efficiënte spreiding onder varkens op te sporen.

Om het bestuderen van de onderzoeksvraag mogelijk te maken, moet de specificiteit van de beschikbare serologische SARS-CoV-2 tests bij gebruik op varkensserum worden geëvalueerd. Daarom zijn de doelstellingen van deze studie:

1. De kruisreactiviteit van de SARS-CoV-2 serologische tests evalueren op antilichamen tegen andere coronavirussen bij varkens.
2. Onderzoeken van het percentage dieren dat antistoffen heeft tegen SARS-CoV-2-virus bij slachtvarkens uit de gemeente Uden en omgeving (d.w.z. Gemert-Bakel, Deurne, Sint-Anthonis, Landerd en Meierijstad) in het voorjaar en de vroege zomer van 2020 (tijdens mogelijke blootstelling).

Hoofdstuk 2

Materiaal en methoden

Het project bestond uit twee fasen; testevaluatie en het seroprevalentieonderzoek van slachtvarkens.

Evaluatie van de SARS-CoV-2 antilichaamtest

Beschikbare serologische testen voor detectie van antilichamen tegen SARS-CoV-2 zijn niet eerder gevalideerd voor gebruik bij varkens. Om de specificiteit van de test in deze studie te evalueren zijn serummonsters geselecteerd die in 2014 zijn verkregen uit dieren van de Academic Training Facility "de Tolakker" van de Universiteit Utrecht. Zestig (60) serummonsters van varkens (fokzeugen en gelten >10 weken leeftijd), waarvan bekend is dat een proportie positief heeft getest op antilichamen tegen PHEV (bèta-coronavirus van varkens), werden geselecteerd voor evaluatie van de SARS-CoV-2 antilichaam test.

De sera werden gescreend op de aanwezigheid van IgG-antilichamen tegen het SARS-CoV-2 "spike ectodomain" en tegen de varkenscoronavirussen PHEV en SDCV S1-antigenen met behulp van de proteïn microarray, zoals eerder beschreven voor andere coronavirussen (Reusken et al., 2013a; Reusken et al., 2013b) en voor SARS-CoV-2 (Westerhuis et al., 2020). Fluorescentiesignalen werden gekwantificeerd zoals eerder beschreven (Reusken et al., 2013a). Alle sera zijn getest in een verdunning van 1/20. De afkapwaarde, waarboven sera als "mogelijk positief" worden geclassificeerd, werd bepaald op basis van de gemiddelde signaalintensiteit plus 3 standaarddeviaties, resulterend in een waarde van 9.000 relatieve fluorescentie-eenheden (RFU). Bevestiging van mogelijke positieve sera vindt plaats door middel van een neutralisatietest (Plaque Reduction Neutralisation Test (PRNT)), die eerder is gevalideerd voor humaan gebruik (Okba et al., 2020). De PRNT test wordt gezien als zeer specifiek.

Seroprevalentie status voor SARS-CoV-2 bij varkens

Van vleesvarkensbedrijven die leveren aan Nederlandse slachterijen is herhaaldelijk een steekproef genomen van vleesvarkens tijdens het slachtproces in de slachterij. De oorsprong van de varkens was beperkt tot het vooraf gedefinieerde geografische gebied.

Bedrijfsselectie

Initieel zijn eenentwintig bedrijven met vleesvarkens geïdentificeerd die aan de inclusiecriteria voldeden; 1) gelegen in de specifieke geografische regio met een straal van ~10km rond Uden/Gemert-Bakel, 2) worden beschouwd als frequente leveranciers van specifieke slachterijen in Nederland omdat het doel was om herhaaldelijk bloed van varkensleveringen van deze bedrijven te verzamelen, 3) waarvan historische monsters uit 2019 beschikbaar zijn voor eventuele vergelijking. Drie bedrijven leverden in de studieperiode geen varkens aan de slachterijen en werden daarom niet bemonsterd.

Van elke bedrijf werden bloedmonsters van vleesvarkens verzameld van meerdere leveringen, die normaliter routinematig al genomen worden in de slachterij voor onderzoek op *Toxoplasma gondii* en *Mycobacterium Avium spp.*. Bloedmonsters werden verzameld tussen 1 april en 30 juli 2020. Er werd verondersteld dat deze varkens in februari-maart 2020, tussen de één en vijf maanden oud waren en mogelijk zijn blootgesteld aan besmette mensen, wat overeenkomt met het begin van de epidemie bij mensen in Nederland.

Steekproef

De beoogde steekproefgrootte per bedrijf was bepaald op twaalf serummonsters, gebaseerd op de veronderstelling dat, na introductie zou resulteren in een grote uitbraak (kans = $(1-(1/R_0))$) en transmissie in een gesloten varkenseenheid, >63% van de varkens zal infecteren en daarmee tot hetzelfde percentage antistoffen zal leiden (dit is de verwachte waarde wanneer $R_0 > 1.5$) en dat daarna transmissie in het bedrijf wordt gehandhaafd. Hoewel zes monsters per groep dieren voldoende zouden moeten zijn om een dergelijke seroprevalentie met 95% betrouwbaarheid te detecteren, is dit op de meeste bedrijven een veelvoud van dit aantal geanalyseerd omdat de varkens werden geleverd uit meerdere groepen, in afzonderlijke leveringen.

Van 18 bedrijven werden in totaal 660 varkensserummonsters verzameld waarvan er van 17 bedrijven 417 serummonsters zijn geanalyseerd. Per levering zijn 2 tot 6 serummonsters verzameld van minimaal één levering tot maximaal zes leveringen per bedrijf (Bijlage 1, Tabel 2).

Van drie bedrijven zijn de meeste varkens laat in de projectperiode geslacht en zijn er slechts 10, 6 en 0 monsters getest. Gezien de resultaten op de andere bedrijven is besloten om de overige monsters niet verder te analyseren.

Monsterverzameling en -verwerking

Bloedmonsters werden verzameld (in serumgeluizen) in de slachterij bij verbloeding en vervolgens naar het laboratorium gestuurd voor centrifugatie. Vervolgens werd 1 milliliter serum in 96-Well Polypropyleen DeepWell™ opslagplaten gepipetteerd en opgeslagen bij -20°C totdat monsters voor analyse naar het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam werden vervoerd.

Test algoritme

Monsters werden als negatief beschouwd voor SARS-CoV-2 antilichamen wanneer deze negatief testten met de proteïn array.

Monsters met positieve testresultaten in de proteïn array alsmede monsters waarvan de testuitslag niet bepaald kon worden, als gevolg van hoge achtergrondsignalen, werden vervolgens getest in de PRNT, zoals eerder beschreven (Okba et al., 2020; Westerhuis et al., 2020).

In het geval dat de PRNT-test een positief signaal gaf (titer ≥ 40) werden de monsters vervolgens opnieuw getest in een zogenaamde Receptor-Binding-Domain ELISA-test (RBD-ELISA), aangepast aan Okba et al. (2020) die ook gebruikt wordt voor antistofdiagnostiek bij nertsen, honden en katten. De afkapwaarde voor de RBD-ELISA was ingesteld op 0.300. Monsters die positief testten in zowel de PRNT als RBD-ELISA werden als positief voor SARS-CoV-2 antilichamen beschouwd.

Vervolgens werden de testresultaten besproken door het panel van auteurs met als doel om tot een consensus te komen.

Gegevensanalyses en -statistiek

Analyse van de serologische test uitslagen werd uitgevoerd met GraphPad Prism (versie 6.02) en de data is geanalyseerd met MS Excel™.

Ethiek en data eigendom

De bloedmonsters zijn genomen tijdens het verbloeden van vleesvarkens in Nederlandse slachterijen. De monsters zijn afkomstig van willekeurig geselecteerde slachtvarkens (~ 180 dagen oud) van geselecteerde bedrijven (zie eerder). Deze manier van monstername valt niet onder de Wet op de Dierproeven en verlening van een vergunning door de CCD was derhalve niet noodzakelijk. De bloedmonsters zijn eigendom van de slachterij die heeft ingestemd met en meegewerkt aan de monstername. De monsters zijn geanonimiseerd en de resultaten zijn niet herleidbaar naar specifieke herkomstbedrijven.

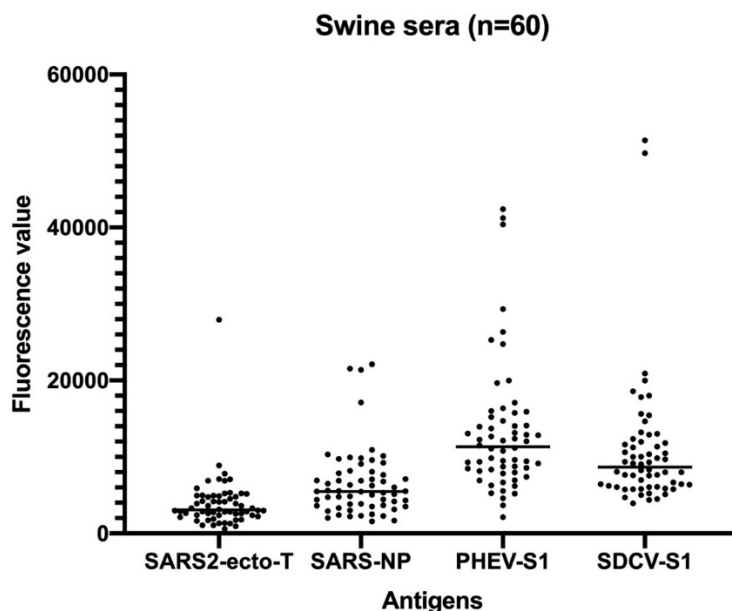
Hoofdstuk 3

Resultaten

Evaluatie van de SARS-CoV-2 antilichaamtesten

De testevaluatie is uitgevoerd op 60 serummonsters van zeugen en gelten van varkensbedrijf "de Tolakker" van de Universiteit Utrecht uit 2014, waar in een eerder onderzoek een deel positief is getest voor antistoffen tegen PHEV.

Een van zestig (1/60) sera had een RFU-waarde boven de afkap-waarde voor SARS-CoV-2 antilichamen in de protein array. Dat serum testte vervolgens niet positief op PHEV-antilichamen. De PRNT test voor neutraliserende antistoffen tegen SARS-CoV-2 (Okba et al., 2020) resulteerde in een negatieve uitslag voor het monster dat een uitslag boven de afkapwaarde had in de protein array (Figuur 1).



Figuur 1. Reactiviteit van varkens serum van de Tolakker uit 2014 met SARS-CoV-2 spike ectodomain, en varkenscoronavirussen PHEV en SDCV S1 antigenen met behulp van de protein Microarray. De afkapwaarde is vastgesteld op 9.000 RFU voor SARS-ecto-T.

Op basis van deze resultaten is geconcludeerd dat serum van varkens van een bevestigd PHEV positief bedrijf slechts minimale reactiviteit toont tegen SARS-CoV-2 in de protein microarray. Het serummonster met de hoogste fluorescentie tegen SARS-CoV-2 in de protein array, kon niet worden bevestigd met de SARS-CoV-2 PRNT. De protein array kan daarmee worden gebruikt om varkensserummonsters vooraf te screenen met gebruik van de PRNT ter bevestiging van monsters met hogere fluorescentiewaarden.

Serologie resultaten voor SARS-CoV-2 bij varkens

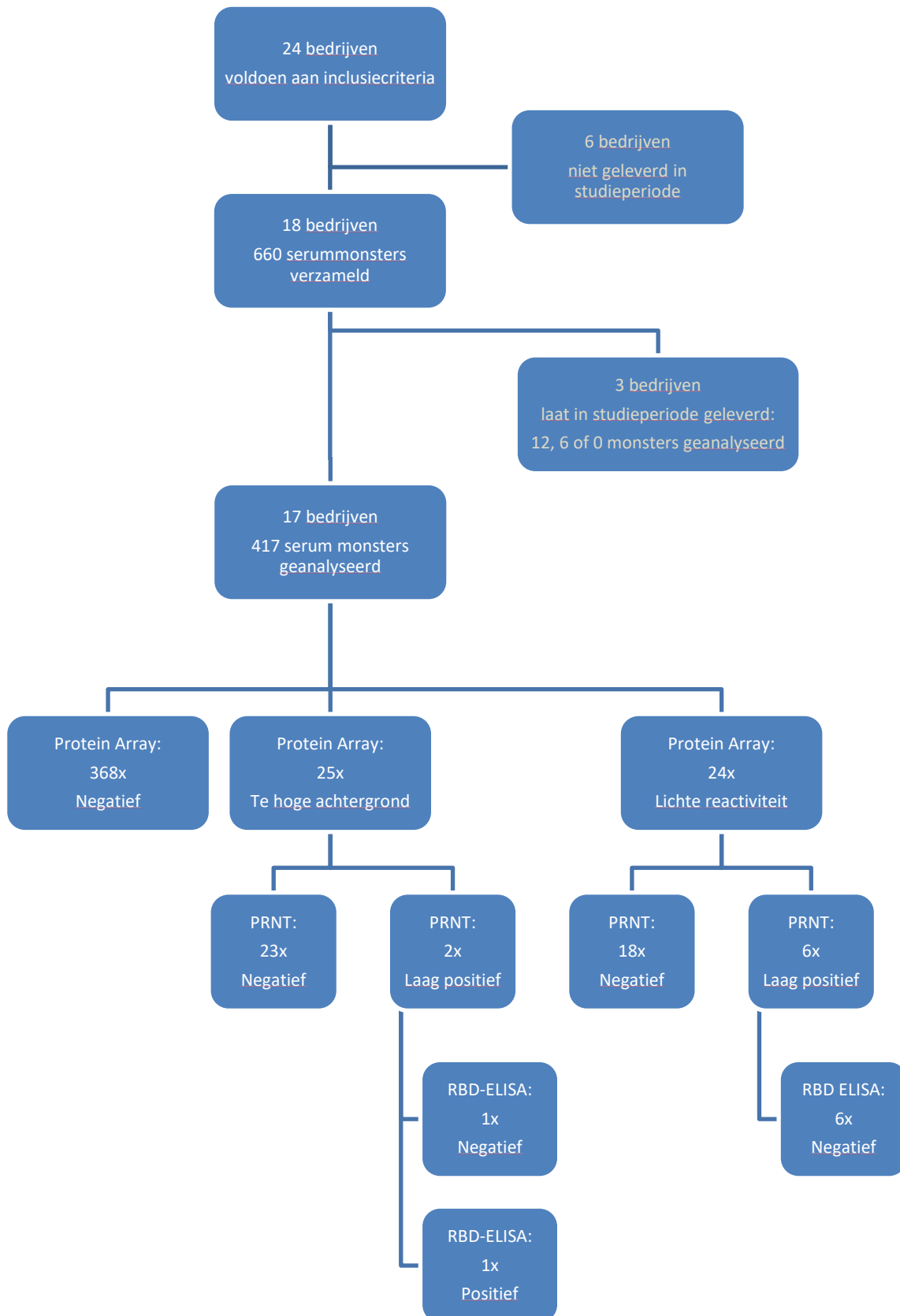
In totaal zijn 417 monsters van 17 bedrijven getest. 368/417 bloedmonsters van 17 bedrijven hebben een negatieve testuitslag in de protein array (88.2%) (Figuur 2 en Bijlage 1, Tabel 2). Een klein deel van de sera (24/417 (5.8%)) toonde lichte reactiviteit in de protein array en werd getest in de SARS-CoV-2 PRNT, evenals 25/417 (6.0%) monsters waarvoor het resultaat in de protein array "onbepaald" was (hoge achtergrond) (Figuur 2).

Zes van de 24 monsters met lage reactiviteit in de protein array waren laag positief in de PRNT (titer 40-160), allemaal afkomstig van hetzelfde bedrijf (bedrijf 1) (en verzameld uit dezelfde levering op één gegeven moment) (Bijlage 1, Tabel 3). Bovendien waren twee andere sera, van twee andere bedrijven, positief in de PRNT, maar voor deze monsters kon een testresultaat voor de protein array niet worden bepaald vanwege een hoog achtergrondsignaal). De overige 23 monsters met een hoog achtergrondsignaal in de protein array testten negatief in de PRNT.

Alle sera (acht monsters) met een positieve PRNT (\geq titer 40) werden ook getest met de RBD-ELISA. De zes monsters van één bedrijf waren negatief in de RBD-ELISA. Een van de twee andere monsters met een hoog PRNT signaal testte negatief in de RBD-ELISA (Figuur 2, Bijlage 1, Tabel 3).

Eén monster testte positief met de RBD-ELISA en in de PRNT. Voor het bedrijf waar dit monster, met zowel een positieve PRNT als RBD-ELISA uitslag, is gevonden hebben in zowel de twee bemonsterde leveringen vóór als de drie bemonsterde leveringen ná de betreffende levering alle varkens negatief getest (N=35) (Bijlage 1, Tabel 3).

Samenvattend, op 16 van de 17 bedrijven zijn, op basis van het testalgoritme, geen antilichamen tegen SARS-CoV-2 aangetoond. Op één bedrijf testte één van de 36 serummonsters positief.



Figuur 2. Samenvatting van het aantal bedrijven, het aantal verzamelde en geanalyseerde serum monsters met bijbehorende resultaten.

Hoofdstuk 4

Discussie en conclusie

Het doel van deze studie was om uit te sluiten dat SARS-CoV-2 zich efficiënt verspreid heeft onder de varkens in de regio Uden/Gemert-Bakel, waar het virus zich in het voorjaar van 2020 eerder verspreidde onder de algemene humane bevolking.

De resultaten van de testevaluatiefase (serum uit 2014 en negatief voor SARS-CoV-2 antistoffen) geven aan dat in de protein array weliswaar enige reactiviteit zichtbaar was, maar de PRNT kon die reactiviteit niet bevestigen. De specificiteit van de gekozen seriële testprocedure voor het doel van het screenen van varkensserum voor antistoffen tegen SARS-CoV-2 is goed.

De bevindingen ten aanzien van de serummonsters van slachtvarkens (1 van de 417 serum monster positief getest) rechtvaardigt de conclusie dat SARS-CoV-2 in het voorjaar van 2020 niet op grote schaal is geïntroduceerd en verspreid op varkensbedrijven in de regio Uden/Gemert-Bakel.

Wanneer aangenomen wordt dat de immuunrespons tegen SARS-CoV-2 zoals gemeten met de PRNT en RBD ELISA niet transient, maar langdurig is, is het ene positief geteste serummonster op drie verschillende manieren te verklaren. Er kan sprake zijn van een kruisreactie, bijvoorbeeld met andere CoVs die bij varkens circuleren. Er kan ook sprake zijn van een beginnende uitbraak van SARS-CoV-2 op het bedrijf. De bevindingen bij monsters van hetzelfde bedrijf uit leveringen vóór ($n=2$) en ná ($n=3$) het positief geteste dier sluiten de beginnende uitbraak uit. Tenslotte kan sprake zijn van een zogenaamde 'kleine' uitbraak met beperkte verspreiding of een immuunrespons ten gevolge van blootstelling zonder virusvermeerdering.

Het initiële testprotocol, screenen met de protein array en bevestiging met de PRNT, gaf bij sera van vijf verschillende boerderijen een laag positief signaal, volgens de vooraf gedefinieerde afkapwaarden. De sera zijn ook onderzocht met de RBD-ELISA, die ook gebruikt wordt als diagnostische test voor SARS-CoV-2 bij andere diersoorten, zoals nertsen, honden en katten. Geen van de sera was uiteindelijk positief in alle SARS-CoV-2 testen. Kruisreactiviteit in het varkensserum kan niet worden uitgesloten, deels als gevolg van het ontbreken van betrouwbare serologische testen voor andere coronavirussen bij varkens. In de studie van Veragara-Alert wordt een transiënte serologische reactie tegen het N-eiwit vóór challenge

geobserveerd bij één big en ook als kruisreactie geïnterpreteerd (Veragara-Alert et al., 2020). In de testen zoals beschreven in dit rapport is echter geen gebruik gemaakt van dit eiwit, wat vaker kruisreactiviteit tussen verschillende coronavirussen laat zien.

Op bedrijf 1 was sprake van een zwak signaal bij 6 van 6 dieren uit één levering volgens het testalgoritme. Een hertest met de RBD-ELISA op deze monsters resulteerde in een signaal onder de afkapwaarde en daarmee is het zeer onwaarschijnlijk dat deze dieren werkelijk specifieke antistoffen tegen SARS-CoV-2 hadden. Bovendien hebben vervolgon monsters van hetzelfde bedrijf allen negatief getest en derhalve lijkt hier geen sprake te zijn van een uitbraak.

Zowel in de experimentele studies met varkens als in het serologisch onderzoek van slachtvarkens in de regio Uden/Gemert-Bakel is geen aanwijzing gevonden voor uitgebreide transmissie van SARS-CoV-2 onder varkens. Gezien de lagere incidentie van SARS-CoV-2 bij mensen in andere delen van Nederland ten tijde van deze studie, is het onwaarschijnlijk dat onderzoek van varkens elders in Nederland tot een andere conclusie had geleid.

Conclusie en relevantie

Op basis van de bevindingen in dit onderzoek is geconcludeerd dat er geen aanwijzingen zijn voor spreiding van SARS-CoV-2 op varkensbedrijven in de regio rond Uden en Gemert-Bakel.

Op grond van de huidige informatie wordt de rol van varkens aan de epidemie van SARS-CoV-2 bij de mens verwaarloosbaar geacht.

Hoofdstuk 5

Referenties

- Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C.B., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C., de Roda Husman, A.M., Poel, W.H., 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet Res* 5, 7.
- Gu, J., Korteweg, C., 2007. Pathology and pathogenesis of severe acute respiratory syndrome. *Am J Pathol* 170, 1136-1147.
- Imai, Y., Kuba, K., Rao, S., Huan, Y., Guo, F., Guan, B., Yang, P., Sarao, R., Wada, T., Leong-Poi, H., Crackower, M.A., Fukamizu, A., Hui, C.C., Hein, L., Uhlig, S., Slutsky, A.S., Jiang, C., Penninger, J.M., 2005. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature* 436, 112-116.
- Kermack, W.O.M., A. G., 1927. A contribution to the mathematical theory of epidemics. *Proc. R. Soc. Lond. A* 115, 700-721.
- Meekins, D.A., Morozov, I., Trujillo, J.D., Gaudreault, N.N., Bold, D., Artiaga, B.L., Indran, S.V., Kwon, T., Balaraman, V., Madden, D.W., Feldmann, H., Henningson, J., Ma, W., Balasuriya, U.B.R., Richt, J.A., 2020. Susceptibility of swine cells and domestic pigs to SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020.2008.2015.252395.
- Okba, N.M.A., Muller, M.A., Li, W., Wang, C., GeurtsvanKessel, C.H., Corman, V.M., Lamers, M.M., Sikkema, R.S., de Bruin, E., Chandler, F.D., Yazdanpanah, Y., Le Hingrat, Q., Descamps, D., Houhou-Fidouh, N., Reusken, C.B.E.M., Bosch, B.-J., Drosten, C., Koopmans, M.P.G., Haagmans, B.L., 2020. SARS-CoV-2 specific antibody responses in COVID-19 patients. *medRxiv*, 2020.2003.2018.20038059.
- Orsel, K., de Jong, M.C., Bouma, A., Stegeman, J.A., Dekker, A., 2007. Foot and mouth disease virus transmission among vaccinated pigs after exposure to virus shedding pigs. *Vaccine* 25, 6381-6391.
- Osiris-Algemene-Infectieziekten-database, 2020. Covid-19 cumulative numbers per municipality, 21 Mei 2020 ed. RIVM/I&V/EPI, Bilthoven, the Netherlands.
- Pickering, B.S., Smith, G., Pinette, M.M., Embury-Hyatt, C., Moffat, E., Marszal, P., Lewis, C.E., 2020. Susceptibility of domestic swine to experimental infection with SARS-CoV-2. *bioRxiv*, 2020.2009.2010.288548.
- Reusken, C., Mou, H., Godeke, G.J., van der Hoek, L., Meyer, B., Muller, M.A., Haagmans, B., de Sousa, R., Schuurman, N., Dittmer, U., Rottier, P., Osterhaus, A., Drosten, C., Bosch, B.J., Koopmans, M., 2013a. Specific serology for emerging human coronaviruses by protein microarray. *Euro Surveill* 18, 20441.
- Reusken, C.B., Haagmans, B.L., Muller, M.A., Gutierrez, C., Godeke, G.J., Meyer, B., Muth, D., Raj, V.S., Smits-De Vries, L., Corman, V.M., Drexler, J.F., Smits, S.L., El Tahir, Y.E., De Sousa, R., van Beek, J., Nowotny, N., van Maanen, K., Hidalgo-Hermoso, E., Bosch, B.J., Rottier, P., Osterhaus, A., Gortazar-Schmidt, C., Drosten, C., Koopmans, M.P., 2013b. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet Infect Dis* 13, 859-866.
- Schlottau, K., Rissmann, M., Graaf, A., Schon, J., Sehl, J., Wylezich, C., Hoper, D., Mettenleiter, T.C., Balkema-Buschmann, A., Harder, T., Grund, C., Hoffmann, D., Breithaupt, A., Beer, M., 2020. SARS-CoV-2 in fruit bats, ferrets, pigs, and chickens: an experimental transmission study. *Lancet Microbe* 1, e218-e225.

- Shi, J., Wen, Z., Zhong, G., Yang, H., Wang, C., Liu, R., He, X., Shuai, L., Sun, Z., Zhao, Y., Liang, L., Cui, P., Wang, J., Zhang, X., Guan, Y., Chen, H., Bu, Z., 2020. Susceptibility of ferrets, cats, dogs, and different domestic animals to SARS-coronavirus-2. *bioRxiv*, 2020.2003.2030.015347.
- Veragara-Alert, J., Rodon, J., Carrillo, J., Te, N., Useros, N.I., n, M.a.L.R.g.d.I.C., Nieto, C.v., Guallar, V.c., Valencia, A., Cantero, G., Blanco, J., Clotet, B., Bensaid, A., s, J.S., 2020. Pigs are not susceptible to SARS-CoV-2 infection but are a model for viral immunogenicity studies. Accepted in *Transboundary and Emerging Diseases*
- Wan, Y., Shang, J., Graham, R., Baric, R.S., Li, F., 2020. Receptor Recognition by the Novel Coronavirus from Wuhan: an Analysis Based on Decade-Long Structural Studies of SARS Coronavirus. *Journal of Virology* 94, e00127-00120.
- Westerhuis, B.M., de Bruin, E., Chandler, F.D., Ramakers, C.R.B., Okba, N.M.A., Li, W., Goossens, H., de Jong, M.D., Bosch, B.J., Haagmans, B.L., Fraaij, P.L.A., Sikkema, R.S., Koopmans, M.P.G., 2020. Homologous and heterologous antibodies to coronavirus 229E, NL63, OC43, HKU1, SARS, MERS and SARS-CoV-2 antigens in an age stratified cross-sectional serosurvey in a large tertiary hospital in The Netherlands. *medRxiv*, 2020.2008.2021.20177857.
- Zhou, P., Fan, H., Lan, T., Yang, X.L., Shi, W.F., Zhang, W., Zhu, Y., Zhang, Y.W., Xie, Q.M., Mani, S., Zheng, X.S., Li, B., Li, J.M., Guo, H., Pei, G.Q., An, X.P., Chen, J.W., Zhou, L., Mai, K.J., Wu, Z.X., Li, D., Anderson, D.E., Zhang, L.B., Li, S.Y., Mi, Z.Q., He, T.T., Cong, F., Guo, P.J., Huang, R., Luo, Y., Liu, X.L., Chen, J., Huang, Y., Sun, Q., Zhang, X.L., Wang, Y.Y., Xing, S.Z., Chen, Y.S., Sun, Y., Li, J., Daszak, P., Wang, L.F., Shi, Z.L., Tong, Y.G., Ma, J.Y., 2018. Fatal swine acute diarrhoea syndrome caused by an HKU2-related coronavirus of bat origin. *Nature* 556, 255-258.

Bijlage 1

Tabel 1. Overzicht van resultaten uit gepubliceerde studies naar experimentele blootstelling van varkens aan SARS-CoV-2 virus (t/m 15-9-2020). # = aantal, N = Nee, Neg = Negatief, NA = Niet uitgevoerd/bepaald, + = positieve testuitslag, ± = inconsistent

Instituut	# varkens blootgesteld	# contact varkens	herkomst varkens	Ras varkens	Leeftijd varken (wkn)	route van blootstelling	Blootstelling dosis	Klinische verschijnselen	virus replicatie gevonden	virus teruggevonden <D4 post-infectie	seroconversie	Serologie & resultaten	Transmissie geobserveerd	Referentie
Harbin (China)	5	3	SPF	Landrace & Large White	~6	i.n.	10 ⁵ pfu	Geen	N	N	Neg	PRNT & Double antige ELISA: Neg	NA	Shi et al. 2020
IRTA (Spanje)	20	NA	Conventio- neel	Landrace x Large White	5-6	i.n. / e.t. / i.m. / i.v.	10 ^{5.8} TCID50	Geen	N	1 big	J	Anti-N-ELISA +: 1x i.m. & alle i.v. biggen + 1 big i.t. 1x D-0 Anti-S1 & S2 ELISA & VNT +: alle i.m. & i.v. titers (40-160) +	NA	Vergara-Alert et al. 2020
FLI (Dld)	9	3	'high health'	German Landrace	9	i.n.	10 ⁵ TCID50	Geen	N	N	Neg	IFA & VNT: Neg	N	Schlottau et al. 2020
CFIA (Canada)	16	2	Conventio- neel lokaal	American Yorkshire Crossbred	8	i.n. & intra pharynx	1 X 10 ⁶ pfu	Transiente ooguitvloeïing, 1 big ook neus uitvloeïing 1x big hoest	J; op dag 13 p.i. RNA +, virus re- isolatie uit Lnn. bij 1 big	2 biggen weinig RNA	±	PRNT & VNT: 2 dieren enkele + monster gevolgd door – uitslagen	N	Pickering et al. 2020
KSU (USA)	9	6	'high health'	NA	5	oral & i.n. & i.t.	10 ⁶ TCID50	Geen	N	J	Geen	micro- neutralization assay & RBD ELISA +: 1 sentinel pig transient effect	N	Meekins et al. 2020

Bijlage 1

Tabel 2. Overzicht verzamelde en geteste bloedmonsters en resultaten volgens het test algoritme.

Bedrijf	maand van bloed verzamelen				totaal	getest
	apr-20	mei-20	jun-20	jul-20		
1		18	6	24	48	48
2	6	12	6	21	45	18
3	6	18		18	42	42
4	6	12	6	18	42	42
5	6	17	6	20	49	23
6		24	6	6	36	24
7		12	12	12	36	24
8		6	6	12	24	10
9	6	12	6	25	49	20
10	6	12	6	12	36	36
11	6	12	6	12	36	18
12			6	18	24	6
13		18	6	11	35	18
14	6	12	6	12	36	18
15	6	12	6	12	36	18
16		6	6	8	20	12
17	12	12	6	12	42	40
18			6	18	24	0
Totaal	66	215	108	271	660	417

Bijlage 1

Tabel 3. Overzicht van testresultaten per bedrijf per maand.

PA = protein array, PRNT = Plaque reductie neutralisatie test. RBD-ELISA = Receptor Binding Domain ELISA test. "+", "-" = aantal positief en respectievelijk negatief geteste monsters in de betreffende maand.

Test resultaat per bedrijf	maand van verzamelen								Totaal per test en resultaat			
	apr-20		mei-20		jun-20		jul-20		PA -	PA + & PRNT +	RBD ELISA -	RBD ELISA +
1			12	6	6		24		42	6	6	
2	6		12						18			
3	6		17	1			18		41	1	1	
4	6		12		6		18		42			
5	6		17						23			
6			24						24			
7			12		12				24			
8			6		4				10			
9	6		12		2				20			
10	6		11	1	6		12		35	1		1
11	6		12						18			
12					6				6			
13			18						18			
14	6		12						18			
15	6		12						18			
16			6		6				12			
17	12		12		4		12		40			
Totaal	66	0	207	8	52	0	84	0	409	8	7	1