

Assessing cross-neutralization activity for SARS-CoV-2 spike mutants

SSI 02. November 2020, Anders Fomsgaard, professor & Maria Magdalena Lassaunière, senior researcher

SSI has so far identified seven unique mink mutations/changes in the spike protein the sars-cov-2 variants in mink and infected people with contact to the farms. We have tested the first variant from farm-1 and here we have tested a variant with four simultaneous changes in the spike. This variant is dominating farm-6, 9, 10, 14, 18 (CHCNR 99768, 10967, 92288, 91966, 97712) and in the present experiments we isolated this same mink variant virus from a human patient and used it to evaluate if this virusvariant was sensitive or not to neutralizing antibodies (antisera) from a collection of convalescent individuals.

Virus culture

A mink and human clinical sample containing the SARS-CoV-2 virus with the spike mutations of interest is identified. The virus is grown on mammalian cells, a monkey kidney cell line named VeroE6, from the clinical sample in two subsequent rounds. Prior to use, nucleotide sequencing of the isolated virus is used to confirm that the cell culture process did not introduce additional mutations that were not present in the original clinical sample. To date, all viruses evaluated for cross-neutralization of antisera were identical in the spike protein compared to that found in the clinical sample.

Neutralization assay in Biosafety-3 laboratory

To determine if a mutant virus has reduced sensitivity to existing neutralizing antibodies, a predetermined amount of the mutant virus is mixed with serially diluted sera from patients that were infected with SARS-CoV-2 early in the Danish epidemic. The same sera is mixed with the same amount of virus from a strain that does not have the spike mutations. The virus and sera are incubated for 1 hour to allow the antibodies in the sera to bind to the virus. The virus/antibody mix is added to VeroE6 cells and incubated for 24 hours. Those antibodies that neutralize the virus will block its ability to infect cells and thus lead to a lower amount of virus present in the cells. After 24 hours, the amount of virus in the cells are measured by fixing the cells to the cell culture plate. This fixation process exposes the virus proteins produced during the infection of the cells. One of these proteins is the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. In a standard ELISA targeting the nucleocapsid protein, the amount of virus is determined. Using appropriate controls for each virus evaluated, a 50% cut-off value is calculated. The serum dilution at the 50% cut-off value is reported as the neutralization titer.

Results

Convalescent sera from 9 people (10 serum samples were tested, but one was inconclusive, so only 9 are reported) previously infected with SARS-CoV-2 early in the Danish epidemic were used to evaluate cross-neutralization activity against a mutant virus. Each serum sample was tested in duplicate with the mutant virus and the reference virus (without spike mutations).

	Serum sample – Neutralisation Titer								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Reference virus	39	68	54	67	186	>1280	846	186	291
Mutant virus	28	5	9	30	67	>1280	606	54	177
% Difference	-28%	-93%	-83%	-55%	-64%	0%	-28%	-71%	-39%

The mutant virus resulted in reduced neutralization activity for 8 out of 9 sera tested when compared to a virus that lacks the spike mutations. The effect varied between the sera and ranged from a reduction of 25% to as high as 93% neutralization activity.

In conclusion, this indicate that mink virus variants with four of the seven identified mink-mutations/changes in the spike protein show less sensitivity (resistance) for neutralizing antibodies from persons with previous covid-19 infection. It is important to note that these results are preliminary and are in the process of being confirmed in an independent repeat experiment, but suggest that mink-specific mutation potentially can influence virus' sensitivity to protective antibodies.



03. november 2020

Notat

Orientering om fundet af ny virusvariant i mink

Virusmutationer er små ændringer i virus arvemateriale, som opstår løbende i forbindelse med at virus kopierer sig. Jo flere virus, der kopieres, jo større er sandsynligheden for, at der opstår mutationer. En virus arvemateriale og hermed eventuelle mutationer kan afdækkes ved helgenomsekventering. Der er blandt minkvarianterne af SARS-CoV-2 (det coronavirus, der forårsager COVID-19) set flere eksempler på ændringer i spike proteinet. Nogle af disse ændringer er unikke idet de relaterede til, at virus tilpasser sig mink. Spike proteinet er væsentligt, idet mennesker efter en naturlig infektion danner antistoffer over for spike proteinet, og de potentielle COVID-19 vaccine kandidater er også baseret på dette protein. Der er derfor en risiko for, at effekten af spike-baserede anti-COVID19 vacciner kan være påvirket, når der sker ændringer i denne del af arvematerialet.

Tilstedeværelsen af et omfattende reservoir af virus i mink indebærer en alvorlig trussel mod folkesundheden, idet virus spredes fra dyr til mennesker. Risikoen for mutationer gør denne risiko særlig alvorlig. Denne bekymring blev rejst af Statens Serum Institut da de første mutationer blev påvist. Det blev dog vist, at de nuværende vaccinekandidater vil kunne dække de variationer af virus, der er opstået blandt mennesker henover foråret. SSI har på nuværende tidspunkt identificeret syv mutationer i spike proteiner (fundet hos mink og mennesker med tilknytning til minkfarme). Foreløbige undersøgelser tyder på, at et bestemt virus med fire af disse ændringer i spike proteiner udviser nedsat følsomhed for neutraliserende antistoffer fra flere personer med overstået infektion. Dette er påvist i et laboratorieforsøg, hvor man ser, at det særlige minkvirus ikke i samme grad hæmmes i vækst af antistoffer som et almindeligt humant-tilpasset SARS-CoV-2. Dette er bekymrende da det kan have betydning for en kommende COVID-19 vaccines effekt over for smitte med disse varianter, i særdeleshed såfremt der er tale om vacciner der primært virker gennem at danne antistoffer. Igangværende undersøgelser vil afdække problemstillingen yderligere.

Det pågældende virus med fire ændringer i generne for spike protein er påvist i fem nordjyske minkfarme og i mindst 12 patientprøver, hvoraf mindst fire har tilknytning til minkerhverv.



3. november 2020

MFVM har anmodet SUM om en risikovurdering ift. human sundhed, hvis minkavlere efter aflivning af smittede dyr eller pelsning i 2020-sæsonen, fortsætter minkproduktionen ind i 2021 som normalt. Der er alene brug for en vurdering af risiko, ikke forslag til mulige løsninger.

Opsummering

Per 2. november 2020 er der konstateret SARS-CoV-2 smitte på 191 minkfarme. Denne udvikling er sket til trods for en intensiv indsats fra myndighedernes side mhp. at begrænse smitten. Samtidig ses smitte med nye typer SARS-CoV-2 virus, der tilpasser sig mink (minkvarianter) i lokalbefolkningen, og der er en stærk geografisk og tidsmæssig sammenhæng mellem antal positive minkfarme og smitteforekomst blandt mennesker. Mink med SARS-CoV-2 udgør et stort reservoir af virus, der er en stor erhvervsrisiko forbundet med minkavl i smittede områder, og det er ikke lykkedes at begrænse yderligere spredning til det omgivende samfund. På grund af de ændringer, der optræder i spike proteinet i flere af minkvarianterne af virus, er der risiko for at vacciner, der er rettet imod spike proteinet ikke vil give optimal beskyttelse imod de nye virus, der opstår i mink, og immuniteten fra overstået COVID-19 infektion kan give mindre beskyttelse mod de nye virusvarianter.

Hvis minkproduktionen fortsættes i Danmark, således at der i 2021 genetableres en stor population af mink, vurderes det for overvejende sandsynligt, at denne population vil være modtagelige for smitte. Derudover forventes der stadig at være SARS-CoV-2 i omløb blandt mennesker og ingen betydende immunitet i befolkningen før størstedelen af befolkningen er vaccineret. Dermed er der en betydelig risiko for gentagelse af smittespredning blandt mink og mennesker, som er set i Vestdanmark i 2020. Dette vurderes at indebære en stor risiko for folkesundheden, både ved at medføre større sygdomsbyrde blandt mennesker, og ved at et stort virusreservoir i mink øger risikoen for, at der igen opstår nye virusmutationer, som vacciner ikke giver optimal beskyttelse imod. Samlet set kan den flokimmunitet, der opnås ved vaccination eller overstået infektion, risikere at blive svækket eller udeblive. Det må samtidigt forventes at betyde en væsentlig forringelse af vores muligheder for at bevare epidemikontrol i Danmark, hvilket kan medføre, at man må indføre yderligere restriktioner og begrænsninger på samfundslivet mv.

Konklusion: En fortsat minkavl under en igangværende COVID-19 epidemi indebærer en betydelig risiko for folkesundheden, herunder for mulighederne for at forebygge COVID-19 med vacciner.

Baggrund

Siden primo juni 2020 er der i alt konstateret smitte med SARS-CoV-2 på 191 minkfarme. Disse er primært beliggende i Region Nordjylland og i Midt- og Vestjylland. Viden om introduktion af smitte samt konsekvenser for smitte mellem mink og menneske er primært baseret på data fra Nordjylland. Sammenfattende er det sandsynliggjort, at introduktion af smitte med SARS-CoV-2 til den første minkfarm er sket ifm. smitte fra menneske til mink i ugerne op til udbruddet.



Efterfølgende er der i juni 2020 set udtalt smittespredning til lokalsamfund ifm udbrud på et plejehjem, forårsaget af en variant af SARS-CoV-2 udviklet blandt mink (herefter kaldet SARS-CoV-2 minkvariant). Siden primo august 2020 er der konstateret smitte på 168 minkfarme i Region Nordjylland – alle med SARS-CoV-2 minkvariant. Sideløbende hermed er der konstateret en stigende forekomst af SARS-CoV-2 blandt borgere i Region Nordjylland, hvor nu ca. halvdelen skyldes SARS-CoV-2 minkvariant (for detaljer se Bilag 1).

Der er løbende sket flere mutationer i SARS-CoV-2 minkvariant, hvor der indtil nu er fundet 5 clustre. Derudover er der sket introduktion af to nye SARS-CoV-2 typer i henholdsvis Esbjerg og Vejle kommuner, som ikke er beslægtede med minkvarianten.

Mutation hos virus

Virusmutationer er små ændringer i virus arvemateriale, som opstår løbende i forbindelse med at virus kopierer sig. Jo flere virus, der kopieres, des større er sandsynligheden for, at der opstår mutationer. En virus arvemateriale, og hermed eventuelle mutationer, kan afdækkes ved helgenomssekventering (WGS). Der er blandt minkvarianterne af SARS-CoV-2 set flere eksempler på ændringer i spike proteinet. Spike proteinet er væsentligt, idet mennesker efter en naturlig infektion danner antistoffer over for spike proteinet, og de potentielle COVID-19 vaccine kandidater er også baseret på dette protein. Der er derfor en risiko for, at effekten af spike-baserede anti-COVID19 vacciner kan være påvirket, når der sker ændringer i denne del af arvematerialet.

Tilstedeværelsen af et omfattende reservoir af virus i mink indebærer en alvorlig trussel mod folkesundheden, idet virus spredes fra dyr til mennesker. Risikoen for mutationer gør denne risiko særlig alvorlig. Mutationer i spike proteinet forekommer også i virus blandt mennesker (på verdensplan) uden tilknytning til minkfarme, men ikke eller uhyre sjældent de samme mutationer som opstår i mink. Det er dog blevet vist, at de nuværende vaccinekandidater vil kunne dække de variationer af virus, der er opstået blandt mennesker henover foråret.

Bekymringen om ændringer i spike proteinet i minkvarianter af SARS-CoV-2 blev rejst af Statens Serum Institut da de første mutationer blev påvist. Der er blandt minkvarianterne set syv forskellige mutationer i Spike proteinet og eksempler på op til 4 forskellige ændringer i Spike proteinet i samme virus. Et bestemt virus med 4 ændringer i generne for spike protein er påvist i fem nordjyske minkfarme og i 12 patientprøver, heraf 4 med direkte forbindelse med tre af disse farme (cluster 5). Foreløbige undersøgelser tyder på, at dette virus udviser nedsat følsomhed for neutraliserende antistoffer fra flere personer med overstået infektion. Dette er påvist i et laboratorieforsøg, hvor man ser, at det særlige minkvirus ikke i samme grad hæmmes i vækst af antistoffer fra mennesker, som har været smittet med en ikke-minkrelateret variant af SARS-CoV-2. Igangværende undersøgelser vil afdække problemstillingen yderligere. Yderligere varianter er identificeret ved sekvensering men ikke undersøgt for neutralisation endnu. Dette er bekymrende, da det potentielt kan have betydning for en kommende COVID-19 vaccines effekt over for smitte med nye minkvarianter, og indebære en risiko for nedsat immunitet over for disse efter overstået COVID-19 infektion, hvilket har betydning for den enkelte og for flokimmuniteten i samfundet.



Betydning for human sundhed hvis minkproduktion fortsætter som normalt

Hvis minkproduktionen fortsætter som normalt, vil der efter pelsning være et antal levende mink tilbage som anvendes som avlsdyr til næste års produktion. Antallet svarer til ca. 20% af den årlige bestand på ca. 17 millioner mink. I lyset af den aktuelle situation vil dette antal bestå af 1) mink som ikke er smittet med SARS-CoV-2, 2) nogle mink som formodentlig har dannet antistoffer mod SARS-CoV-2, samt 3) formodentlig nogle mink som er uerkendt smittet med SARS-CoV-2. Fordelingen af disse grupper er ukendt. Dette betyder, at der i kommende måneder efter pelsning fortsat vil kunne forventes udbrud og forekomst af smitte med SARS-CoV-2 blandt mink. Derfor vil der også fortsat være en risiko for smitte fra mink til mennesker.

I forbindelse med påbegyndelsen af næste års avlssæson vil der fortsat være risiko for smitte af SARS-CoV-2 blandt mink. Blandt mink der ikke har været udsat for smitte med SARS-CoV-2 vil alle mink være i risiko for at blive smittet. Blandt mink hvor der tidligere har været smitte med SARS-CoV-2 forventes, at der vil være en del, der har udviklet antistoffer mod SARS-CoV-2. Det vides ikke i hvor høj grad, -eller hvor længe-, disse antistoffer beskytter mod ny smitte med SARS-CoV-2, og det vides ej heller i hvor høj grad disse antistoffer vil blive videregivet til minkhvalpe. Det vurderes dog, at der i starten af nyfødte mink's liv vil være en beskyttelse fra materielle antistoffer. Denne beskyttelse antages dog at aftage, således at der efter nogle måneder igen vil være en stor population af mink uden antistofbeskyttelse mod SARS-CoV-2.

Der er foreløbig ikke tegn på, at smitten i minkfarme mindskes over tid. En fortsat tilstedeværelse af SARS-CoV-2 i minkproduktionen, og det faktum at smitten typisk opdages sent i forløbet i de enkelte farme, vil medføre en risiko for spredning i forhold til handel med avlsdyr. Derudover vil risikoen afhænge af den på tidspunktet fundne forekomst af SARS-CoV-2 blandt mennesker. Såvel starten på første og anden fase i udbruddet skete på tidspunkter med forholdsvis lav incidens i befolkningen, og det må forventes, at yderligere stigning i befolkningsincidensen vil forøge risikoen for introduktion af nye virustyper til mink fra mennesker, som senest set i Esbjerg og Vejle kommuner.

Hvis minkproduktionen fortsættes i Danmark, således at der i 2021 genetableres en stor population af mink, vurderes det for overvejende sandsynligt, at denne population vil være modtagelige for smitte. Derudover forventes der stadigt at være SARS-CoV-2 i omløb blandt mennesker og ingen betydende immunitet i befolkningen før størstedelen af befolkningen er vaccineret. Dermed er der en betydelig risiko for gentagelse af smittespredning blandt mink og mennesker, som er set i Vestdanmark i 2020. Dette vurderes at indebære en stor risiko for folkesundheden, både ved at medføre større sygdomsbyrde blandt mennesker, og ved at et stort virusreservoir øger risikoen for, at der igen opstår nye virusmutationer, som vacciner ikke giver optimal beskyttelse imod. Samlet set kan den flokimmunitet, der opnås ved vaccination eller overstået infektion, risikere at blive svækket eller udeblive. Det må samtidigt forventes at betyde en væsentlig forringelse af vores muligheder for at bevare epidemikontrol i Danmark, hvilket kan medføre, at man må indføre yderligere restriktioner og begrænsninger på samfundslivet mv.

3. november 2020

Bilag 1

Udvikling i SARS-CoV-2 smitte blandt mennesker som følge af smittede minkfarme

Sammenfatning

Omtrent halvdelen af nordjyske tilfælde af humane SARS-CoV-2 er direkte eller indirekte forårsaget af smittede mink. Dette understøttes af et tidsmæssigt sammenfald mellem lokal forekomst af smittede minkfarme og tilfælde blandt mennesker forårsaget af SARS-CoV-2 minkvarianten i nordjyske kommuner, samt af at minkvarianten sjældent eller slet ikke forekommer i områder uden smittede minkfarme.

Såfremt minkfarme i hele landet smittes vil man rimeligvis kunne forvente et lignende billede i andre regioner, med mindre en effektiv aflivningsstrategi kan nedsætte spredningen fra minkfarme til det omgivende samfund.

Resultaterne tyder således på, at SARS-CoV-2-smittede minkfarme udgør en væsentlig risiko for smitte til det omgivende samfund på trods af de forebyggende tiltag, i form af værnemidler og andre beskyttende foranstaltninger, der hidtil er truffet.

Indledning

Dette bilag beskriver den generelle udvikling i forekomsten af bekræftede tilfælde af SARS-CoV-2 i Region Nordjylland og region Midtjylland fra uge 24 til uge 44, samt hvor stor en andel minkvarianten udgør i forhold til andre, ikke-minkrelaterede SARS-CoV-2-varianter, i de to regioner i ugerne 24 til 42.

Det er vigtigt at bemærke, at ikke alle prøver bliver WGS-typet (Whole Genome Sequencing), og kun 14,9% af alle positive PCR-prøver fra Region Nordjylland i den beskrevne periode er sekventeret. Der selekteres ikke i forhold til hvilke prøver, der sekventeres. Dermed antages det, at andelen af minkvarianter blandt alle prøver der er WGS typet udgør en repræsentativ andel af alle positive prøver.

Kort beskrivelse af SARS-CoV-2 smitte i minkfarme

Den første fase (Uge 24-27) af minkudbruddet omfattede tre farme, to i Hjørring og en i Frederikshavns Kommune, hvor mink efterfølgende blev aflivet af forsigtighedsgrunde.

Efter uge 27 blev der ikke observeret flere smittede farme før den fjerde farm blev konstateret PCR-positiv i uge 33.

Anden fase af minkudbruddet (uge 33 og frem) har indtil 2. november omfattet 188 smittede og 33 mistænkte minkfarme. I anden fase har man først forsøgt en isolations- og fritestningsstrategi, hvorefter en aflivningsstrategi blev vedtaget og iværksat. Antallet af smittede farme og den geografiske udbredelse af områder med smittede farme stiger fortsat. Indtil uge 42 var alle smittede farme smittet med minkvarianten, der stammer fra den første smittede farm. Senest er der sket introduktion af to nye SARS-CoV-2-varianter i

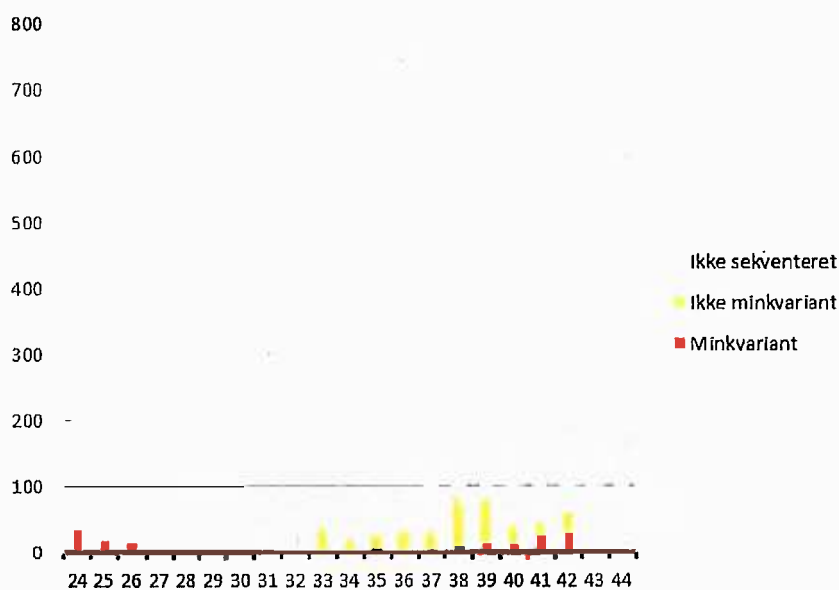


henholdsvis en minkbesætning i Vejle og Esbjerg kommuner, hvilket tyder på, at virus er introduceret fra mennesker, der ikke har været smittet med minkvariant.

Region Nordjylland

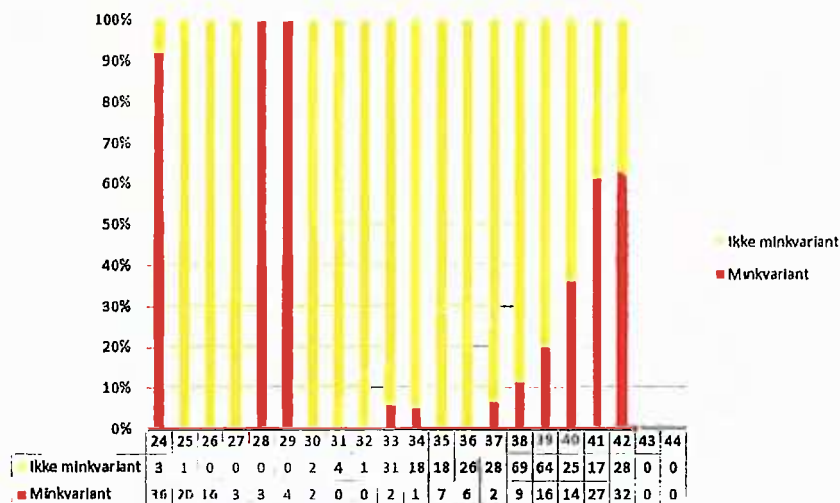
Inden den første farm blev smittet i juni (uge 24) var der stort set ingen smittede personer i Nordjylland. Den første fase af udbruddet bestod af tre farme. Her blev minkvarianten af SARS-CoV-2 beskrevet for første gang, og det blev konstateret, at den danske og de hollandske minkvarianter af virus var forskellige og derfor ikke led i en fælles smittekæde. Minkvarianten spredte sig via smittede personer med enten direkte kontakt eller via kolleger eller husstandsmedlemmer mellem de tre første farme, og videre til det øvrige samfund, herunder plejehjem, hjemmepleje, en busrejse til Bornholm, og omfattede mindst 90 personer. På dette tidspunkt var minkvarianten den dominerende SARS-CoV-2-variant i Nordjylland (figur 1 og 2).

I perioden mellem den første og den anden fase af minkudbruddet blev der kun fundet få tilfælde af SARS-CoV-2 i Region Nordjylland blandt mennesker (figur 1), og kun ganske få tilfælde af personer med minkvarianten (figur 2, tabel 1). Disse personer var bosiddende i flere forskellige kommuner i Region Nordjylland. Den generelle stigning i smitte blandt mennesker i regionen startede i uge 33 og tog fart fra og med uge 37 (Figur 1). I denne periode skyldtes den generelle stigning i samfundet primært andre typer end minkvarianten, som det ses af figur 1 og 2.



Figur 1: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i Region Nordjylland pr. uge. Fordeling mellem minkvariant (rød) og andre virus-varianter (gul) er vist.

Figurforklaring: I alt 14,9% af prøverne er WGS-typet. Højden af hver søjle repræsenterer det samlede antal positive tilfælde pr. uge i Region Nordjylland. Den røde/gule del af søjlen repræsenterer antallet af sekventerede prøver. Den grå del af søjlen repræsenterer antallet af tilfælde, hvor virus ikke er sekventeret.



Figur 2*: Fordeling af de sekventerede prøver på minkvariant (rød) og andre SARS-CoV-2-varianter (gul) pr. uge i Region Nordjylland.

*) WGS-typning er en tidskrævende proces, og derfor vil de nyeste resultater stamme fra personer, der var positive for 2-3 uger siden. Derfor ses ingen sekvensresultater for uge 43 og uge 44 i figur 1 og 2.

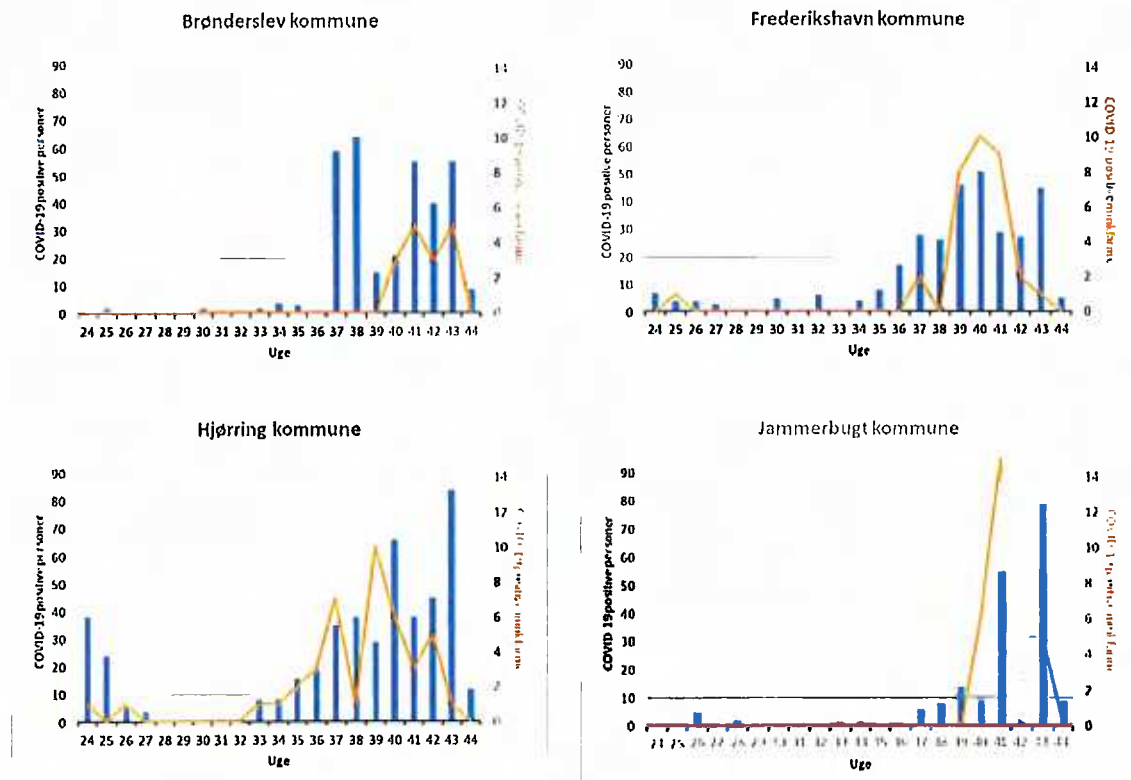
Der foretages ingen selektion af prøver i forhold til sekventering, og ud fra de aktuelle sekvensresultater udgjorde minkvarianten således kun 17,8% (95% CI 13,2-23,2) af det samlede antal prøver i september, hvorefter der sås en stigning til 52,9% (95% CI 43,6-62,2) i de to første uger af oktober (tabel 1). Andelen af bekræftede humane tilfælde af SARS-CoV-2 i Nordjylland, som skyldes minkvarianten, er stigende (figur 2), og denne stigning falder sammen med stigningen i antallet af SARS-CoV-2-smittede minkfarme (figur 3). I uge 41 og 42 har minkvarianten således udgjort ca. halvdelen af de humane tilfælde i Region Nordjylland (figur 2 og tabel 1).

Den anden fase af udbruddet af SARS-CoV-2 i minkfarme begyndte i uge 33 i Hjørring kommune, med en enkelt smittet farm (figur 3). Frem til uge 37 blev kun enkelte farme smittede. Herefter tog udbruddet fart, hvor flere farme i Hjørring kommune og den første farm i Frederikshavns kommune blev konstateret smittede (figur 3). I takt med at der i Region Nordjylland sås en stigning i antal smittede minkfarme, sås en efterfølgende stigning i antallet af smittede personer i regionen (figur 1). På denne baggrund kan det konkluderes, at minkvarianten har spillet en væsentlig rolle for antallet af bekræftede tilfælde af SARS-CoV-2 i befolkningen i Nordjylland.



Tabel 1: Procentvis fordeling af minkvariant og andre typer i Region Nordjylland, samt sikkerheds interval fordelt på måned.

Periode	Ikke minkvariant		Minkvariant		Antal sekventerede prøver
	Antal	Andel (95% CI)	Antal	Andel (95% CI)	
1.6-30.6 2020	4	5 (1-13)	74	95 (87-99)	78
1.7-31.7 2020	4	29 (8-58)	10	71 (42-92)	14
1.8-31.8 2020	72	88 (79-94)	10	12 (6-21)	82
1.9-30.9 2020	199	82 (77-87)	43	18 (13-23)	242
1.10-31.10 2020	56	47 (38-56)	63	53 (44-62)	119
1.8-31.10 2020	335	62 (58-67)	200	37 (33-42)	535

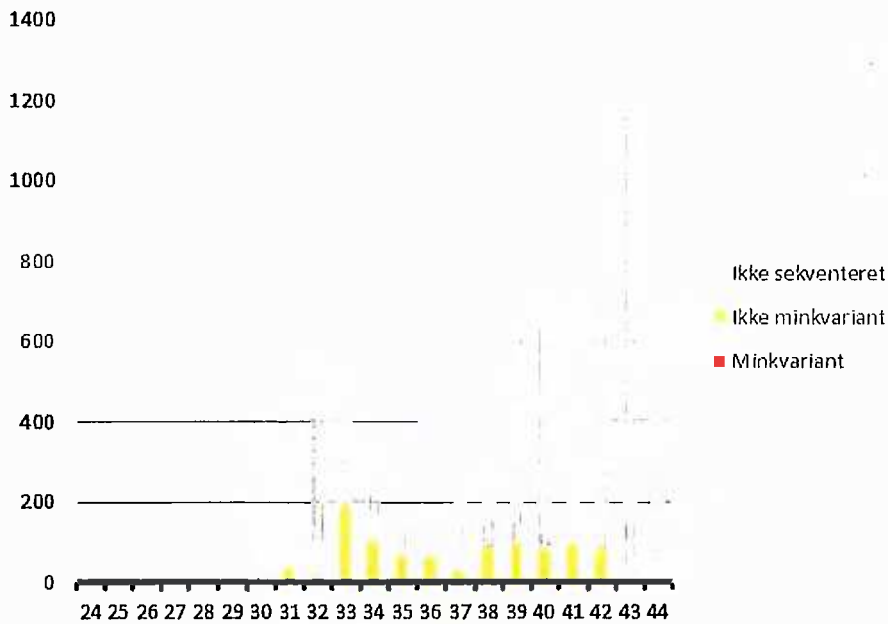


Figur 3: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i udvalgte nordjyske kommuner pr. uge (blå søjler), sammenholdt med nye smittede farme (orange kurve).

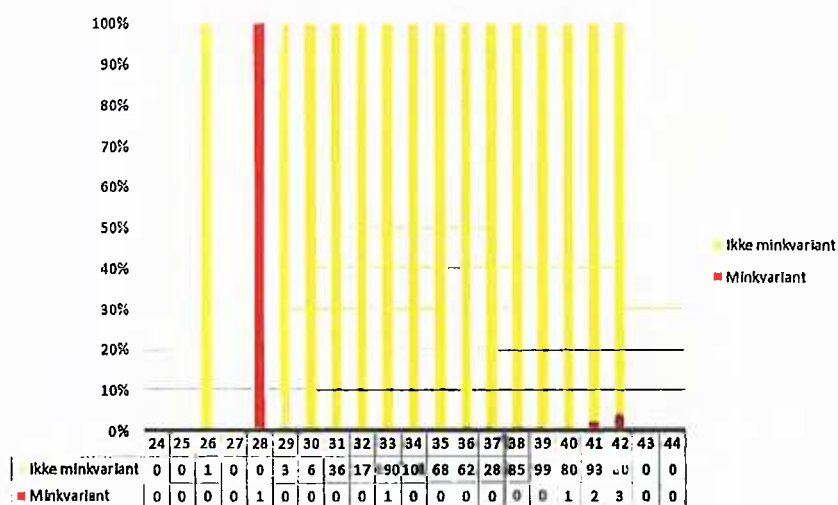


Region Midtjylland

Minkvarianten er kun set i ganske få af de bekræftede humane tilfælde af SARS-CoV-2 i Region Midtjylland (Figur 4 og 5). Den første smittede farm i Region Midtjylland blev udpeget til nærmere undersøgelse d. 02. oktober 2020 (uge 41). Hvis udbrudsforløbet i Region Midtjylland ligner forløbet i Nordjylland, vil det forventes, at andelen af minkvarianten i befolkningen stiger i de kommende uger. Hvis aflivningsstrategien har en afbødende effekt, vil denne stigning udeblive eller være mindre udtalt.



Figur 4: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i Region Midtjylland pr. uge. Andel af minkvariant (rød) og andre typer (gul). Grå: Ej sekventeret.

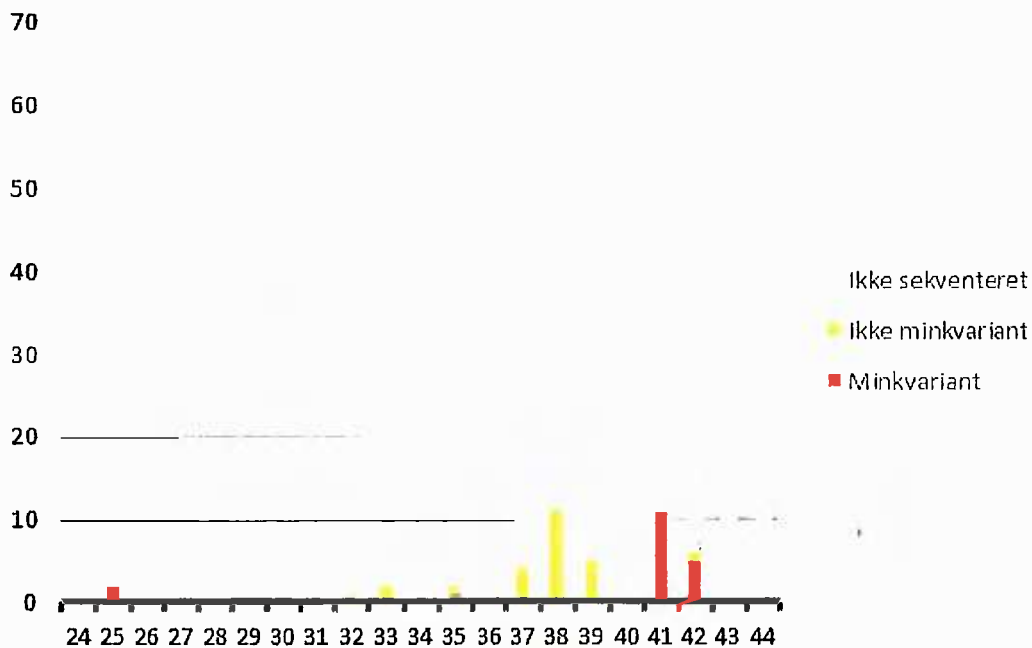


Figur 5: Fordeling af de sekventerede prøver pr. uge i Region Midtjylland

Forekomst af SARS-CoV-2 i udvalgte nordjyske kommuner.

Brønderslev kommune

Fra uge 32-40 var andre typer end minkvarianten dominerende, og Brønderslev kommune havde et kendt udbrud i forbindelse med et "open by night" arrangement i Dronninglund, som var drevet af andre typer end minkvarianten (figur 6). Fra uge 41 dominerede minkvarianten, og der sås igen en stigning i antal bekræftede tilfælde i kommunen. Den første minkfarm blev mistænkt for SARS-CoV-2 d. 29. september 2020 (uge 40). Dermed er det sandsynligt, at stigningen i humane tilfælde fra uge 41 og frem primært er drevet af smitte fra minkfarme.

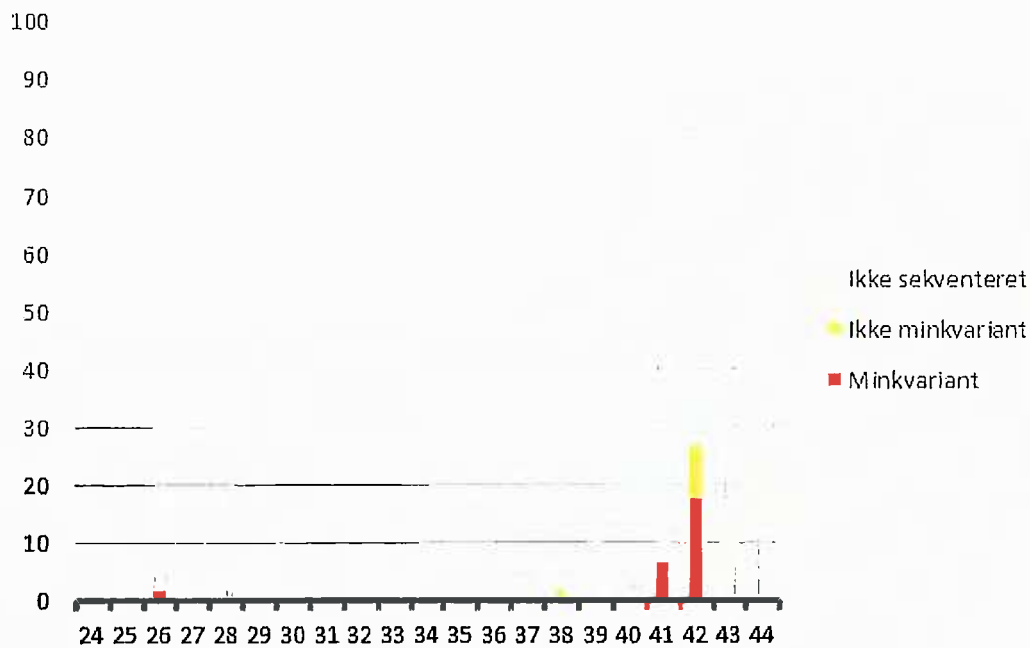


Figur 6: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i Brønderslev kommune pr. uge. Andel af minkvariant (rød) og andre typer (gul). Grå: Ej sekventeret.



Jammerbugt kommune

Før uge 41 sås næsten ingen humane tilfælde af minkvarianten. I ugerne 37-40 sås begyndende smittespredning i kommunen, men ingen tilfælde af minkvarianten. Fra uge 41 sås en kraftig stigning i antal tilfælde med minkvarianten som den dominerende type (Figur 7), hvilket stemmer overens med at første SARS-CoV-2-positive farm i Jammerbugt kommune blev udpeget d. 30-09-20 (uge 40). Også for Jammerbugt kommune indikerer resultaterne, at den markante stigning i antal humane bekræftede tilfælde af SARS-CoV-2 primært skyldes minkvarianten, og at smittede farme er en afgørende faktor i denne stigning. Men der forekommer også smittespredning i Jammerbugt kommune, som ikke er relateret til minkvarianten.



Figur 7: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i Jammerbugt kommune pr. uge. Andel af minkvariant (rød) og andre typer (gul). Grå: Ej sekventeret.

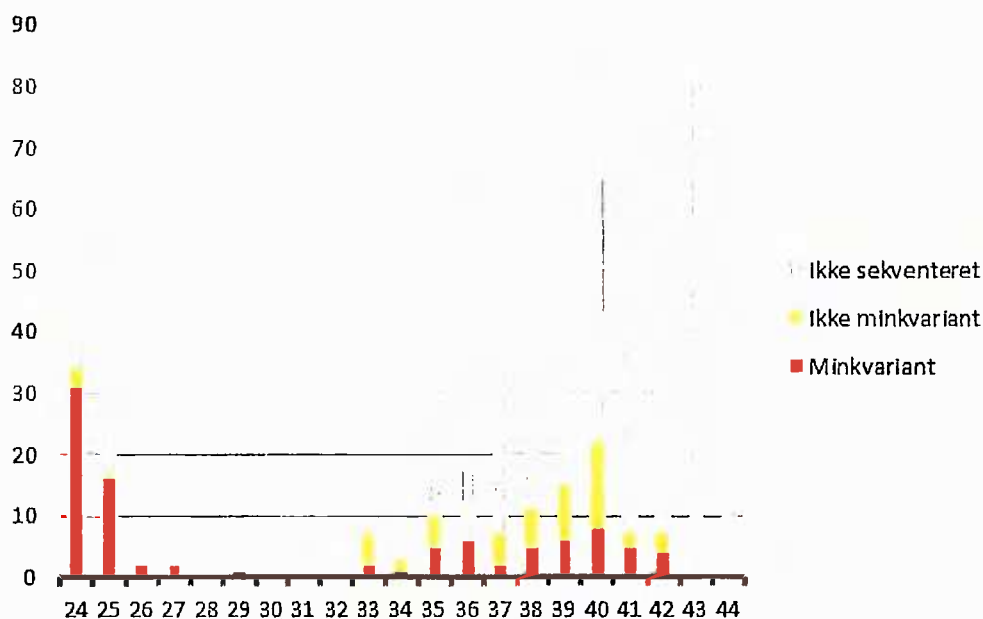


Hjørring kommune

I juni dominerede minkvarianten blandt tilfælde af SARS-CoV-2 hos mennesker i Hjørring kommune.

Minkvarianten opstod i den første smittede farm, som var beliggende i Sindal i samme kommune.

Udbruddet var veldokumenteret, og var et eksempel på bred smitte til det omgivende samfund, som beskrevet i indledningen. I august hvor enkelte farme blev smittet med SARS-CoV-2 i Hjørring kommune (figur 3), sås sideløbende en stigning i antallet af humane bekræftede SARS-CoV-2-tilfælde (figur 3 og 8). Minkvarianten udgjorde en betydelig del af det samlede antal sekventerede prøver (Figur 8), men der foregår også smitte, som ikke er relateret til minkfarme i Hjørring kommune.



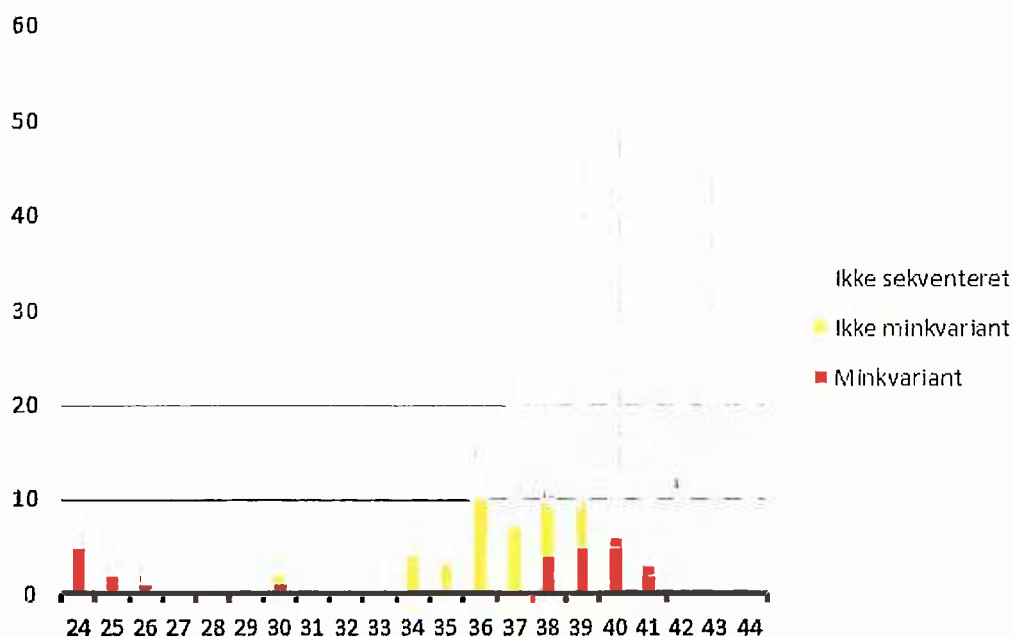
Figur 8: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i Hjørring kommune pr. uge. Andel af minkvariant (rød) og andre typer (gul). Grå: Ej sekventeret.



Frederikshavns kommune

Den ene af de tre første smittede farme fra juni måned lå i Frederikshavns kommune. Dette afspejles i antallet af tilfælde blandt mennesker på samme måde, som beskrevet for Hjørring kommune ovenfor (figur 8 og 9).

Ved begyndelsen af anden fase var smitten domineret i af andre typer end minkvarianten, men fra uge 38 begyndte minkvarianten igen at udgøre en betydende andel af de sekventerede prøver (Figur 9). Som for de andre kommuner passer stigningen i forekomsten af humane SARS-CoV-2-tilfælde med minkvarianten tidsmæssigt sammen med at første farm i Frederikshavn blev udpeget i uge 37.



Figur 9: Antal tilfælde af SARS-CoV-2 i Frederikshavn kommune pr. uge. Andel af minkvariant (rød) og andre typer (gul). Grå: Ej sekventeret.

Mette Trads Steen

Fra: Mathilde Winkel Madsen
Sendt: 3. november 2020 15:42
Til: Ida Krems
Cc: Katrine Kaldahl; Mette Trads Steen; Tyra Grove Krause; Anette Gleitze Bøtner; Kåre Mølbak; Helle Daugaard Larsen; Jannik Fonager; Ole Jensen
Emne: SV: Spm vedr. mutation/ny variant

Kære Ida

Listen over kommuner er god nok: den på ældende muterede minkvariant er fundet på fem af de første farme, som nok ligger geografisk tæt: tre omkring [redacted] (se nedenfor hvilke) Navne og adresser er offentligt tilgængelige på: <https://chr.fvst.dk/>

Som svar på spørgsmålet om sekventering: Det er SSI vurdering, at vi for prøver modtaget på hverdage, vi vil kunne analysere op til 24 prøver indenfor 24 timer. Der arbejdes pt på effektiviseringer af arbejdsgangen på SSI og lokale implementeringer af udstyret på de klinisk mikrobiologiske afdelinger rundt i landet, som med tiden vil kunne øge volumen af prøver, der kan analyseres og mindske tiden dette tager.

Mvh. Mathilde

Fra: Mathilde Winkel Madsen
Sendt: 3. november 2020 15:10
Til: Ida Krems <IKR@sum.dk>
Cc: Katrine Kaldahl <kka@sum.dk>; Mette Trads Steen <MTRS@ssi.dk>
Emne: SV: Spm vedr. mutation/ny variant

Kære Ida

På nuværende tidspunkt har vi kendskab til at denne mutation findes på farmene 6, 9, 10, 14 og 18, som ligger i Hjørring og Frederikshavn kommuner. Muligvis en farm mere, det skal jeg lige have afklaret.

Jeg vender tilbage med svar på det andet spørgsmål hurtigst muligt.

Mvh. Mathilde

Fra: Ida Krems <IKR@sum.dk>
Sendt: 3. november 2020 13:59
Til: Mathilde Winkel Madsen <MAWM@ssi.dk>
Cc: serum <serum@ssi.dk>; Katrine Kaldahl <kka@sum.dk>; Mette Trads Steen <MTRS@ssi.dk>
Emne: SV: Spm vedr. mutation/ny variant

Kære Mathilde
Nu haster spørgsmålet om sekventering mest – hvornår forventer I at kunne svare på det?
VH. Ida

Fra: Ida Krems

Sendt: 3. november 2020 13:02

Til: 'Mathilde Winkel Madsen' <MAWM@ssi.dk>

Cc: 'serum@ssi.dk' <serum@ssi.dk>; Katrine Kaldahl <kka@sum.dk>; Mette Trads Steen <MTRS@ssi.dk>

Emne: Spm vedr. mutation/ny variant

Kære Mathilde

Vi skal også bede om svar på (listen over kommuner haster mere end denne – ministersekretærene rykker os):

- Er der tegn på andet særligt ved den nye virusvariant/mutation – bliver mennesker mere syge, smitter den mere el. lign.?
- Hvor hurtigt kan prøver fra mennesker sekventeres mhp. at vurdere, om de er smittet med den nye variant/mutation? (dvs. antal prøver pr. relevant tidsenhed)

Der opstår sikkert flere spm som vi sender løbende. Der er ikke brug for, I skriver notater med svar – svar på mail til Katrine og mig er fint.

Sig til, hvis der er flere, jeg skal sætte på cc for at lette processerne?

Tak,

VH. Ida

Med venlig hilsen

Ida Krems

Specialkonsulent, Lægemidler og Internationale Forhold

Direkte tlf. 23484611

Mail: ikr@sum.dk

Sundheds- og Ældreministeriet • Holbergsgade 6 •
1057 København K • Tlf. 7226 9000 • Fax 7226 9001 • www.sum.dk



SUNDHEDS-
ÆLDREMINISTERIET



4. november 2020

Hvor mange smittede, og hvor mange blev WGS-typet pr region?

- Der er konstateret ca. 50.000 smittede med covid-19?
Hvor mange i Nordjylland?
- Hvor mange af de 10.000 sekventerede var borgere fra Nordjylland?

Hele pandemien. SSI har WGS-resultater (whole genome sequencing) fra 6.844 personer, svarende til 13,8% af alle positive prøver. Fra Region Nordjylland er der sekventeret prøver fra 691 personer, svarende til 16,7% af alle positive prøver (tabel 1.a).

Fra første minkfarm blev smittet. SSI har WGS-resultater fra 5.103 personer, svarende til 13,5% af alle positive prøver. Fra Region Nordjylland er der sekventeret prøver fra 535 personer, svarende til 14,5% af alle positive prøver (tabel 1.b) i perioden fra uge 24, hvor første farm blev konstateret smittet og frem.

Tabel 1.a: Hele pandemi-perioden. Oversigt over antal positive personer i alt og fra de forskellige regioner, fordelt på antal sekventerede prøver, samt opdelt i "Minkvariant" og "Ikke minkvariant".

Region	Ikke minkvariant	Minkvariant	Total antal sekventerede	Total antal positive	Andel af prøver, der er sekventeret
(tom)	73	1	74	583	12,7
Hovedstaden	2960	3	2963	23872	12,4
Midtjylland	1088	8	1096	9142	12,0
Nordjylland	491	200	691	4139	16,7
Sjælland	857	2	859	5867	14,6
Syddanmark	1161	0	1161	5991	19,4
Total	6630	214	6844	49594	13,8

Tabel 1.b: Fra og med uge 24, hvor første farm blev konstateret smittet. Oversigt over antal positive personer i alt og fra de forskellige regioner, fordelt på antal sekventerede prøver, samt opdelt i "Minkvariant" og "Ikke minkvariant".

Region	Ikke minkvariant	Minkvariant	Total antal sekventerede	Total antal positive	Andel af prøver, der er sekventeret
(tom)	58	1	59	444	13,3
Hovedstaden	2050	3	2053	17191	11,9
Midtjylland	949	8	957	7554	12,7
Nordjylland	335	200	535	3702	14,5
Sjælland	542	2	544	3987	13,6
Syddanmark	955	0	955	4989	19,1
Total	4889	214	5103	37867	13,5



Hvor stor en andel af de smittede har minkvarianten i regionerne
Hvor mange af de 10.000 sekventerede var smittet med en mink-variant.
Dette spørgsmål bør besvares pr måned, da der er ret varierende forekomst over tid (tabel 2, figur 1).

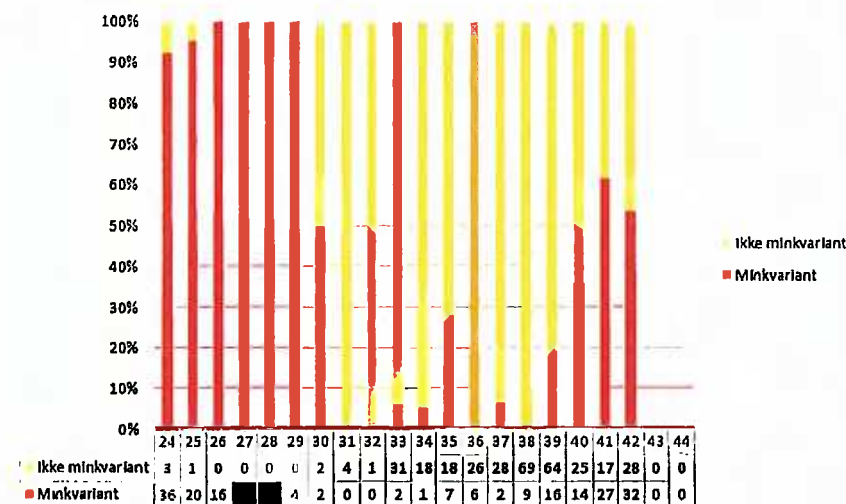
Tabel 2: Procentvis fordeling af minkvariant og andre typer i Region Nordjylland, samt sikkerheds interval fordelt på måned.

Periode	Ikke minkvariant		Minkvariant		Antal sekventerede prøver
	Antal	Andel (95% CI)	Antal	Andel (95% CI)	
1.6-30.6 2020	4	5 (1-13)	74	95 (87-99)	78
1.7-31.7 2020	4	29 (8-58)	10	71 (42-92)	14
1.8-31.8 2020	72	88 (79-94)	10	12 (6-21)	82
1.9-30.9 2020	199	82 (77-87)	43	18 (13-23)	242
1.10-31.10 2020	56	47 (38-56)	63	53 (44-62)	119
1.8-31.10 2020	335	62 (58-67)	200	37 (33-42)	535

Vigtige forudsætninger, som bør undersøges. Der er nogle vigtige forudsætninger skal være på plads, før vi kan gange op, og lave et estimat på typesammensætningen for alle positive prøver.

Forskellige teststeder kan have forskellig praksis for indsendelse af prøver til sekventering, hvilket kan have indflydelse på resultatet af fordeling af sekvenstyper. Først og fremmest bør man lave en sådan opgørelse regionsvist, fordi der kan være forskel på, hvor stor en del af de positive prøver, der modtages, og hvor mange af disse, der har en kvalitet, som kan give et brugbart WGS-resultat. Det er blevet oplyst, at der ikke foretages nogen form for selektion af de modtagne prøver. Derfor antager vi, at forholdet mellem minkvariant og andre sekvenstyper er repræsentativt. Og da foreløbige ugeopgørelser og senere opfølgende ugeopgørelser hidtil har stemt godt over ens, betragtes sekvensresultaterne, med ovenstående forbehold, som repræsentative i opgørelserne.

Af de sekventerede prøver fra Region Nordjylland siden minkudbruddet startede i juni tilhørte 37% (95% CI 33-42) minkvarianten. I oktober udgjorde minkvarianten ca. 53% af alle sekventerede tilfælde i Nordjylland (95% CI 44-62%) (tabel 2).



Figur 1: Fordeling af de sekventerede prøver på minkvariant (rød) og andre SARS-CoV-2-varianter (gul) pr. uge i Region Nordjylland.



Ugevis opgørelse for Region Nordjylland over fordeling på minkvariant og andre typer kan ses i figur 1. Minkvarianten er meget sjældent forekommende i resten af Danmark (ca. 0,03%).

Hvor mange af de sekventerede er smittet med en mink-variant var fra Nordjylland?

Indtil uge 42, hvor de seneste WGS-resultater stammer fra, fandtes 93,5% af alle minkvarianter i Region Nordjylland (93,5%, tabel 1.a og 1.b), og primært i kommuner med smittede minkfarme. Med stigende forekomst af SARS-CoV-2 i minkfarme er der også set stigende forekomst i lokalområdet (opgjort pr kommune. Der henvises til Bilag 1 i notat sendt d. 03. november 2020 "Risikovurdering af human sundhed ved fortsat minkavl").

Forekomst af SARS-CoV-2 Minkvariant, cluster 5

Er det korrekt forstået:

Af de 10.000 sekventerede var 12 smittet med den mink-variant, som vaccinerne ikke giver optimal beskyttelse mod?

Nej!

Vi kan ikke sige noget om hvor mange af de 5.103 prøver, der er sekventeret siden udbruddets start i juni, der tilhører minkvariant, Cluster 5. Cluster 5 er formentlig opstået i august måned i den første farm, der blev fundet med denne type i Hirtshals. Siden midten af august, hvor den første farm med cluster 5 formentlig blev smittet, og efterfølgende mistænkt og sat under offentligt tilsyn d. 28. august, er 11 prøver med cluster 5 ud af af 116 prøver med minkvariant fra Nordjylland blevet sekventeret, svarende til 9,5%.

Det tolvte tilfælde med cluster 5 blev fundet på Sjælland, og det er uafklaret om der findes et smittelink til Nordjylland.

Giver det mening at igangsætte et detektivarbejde ift. smittekæderne i Nordjylland og resten af DK for at sikre at vi har fuldt overblik over særligt den mink-variant, som vaccinerne ikke giver optimal beskyttelse mod? Nej, slet ikke. For kun en lille del af alle positive prøver sekventeres, og endvidere er det nok heller ikke alle positive, der testes. Så det er sandsynligt, at over 80% af personer med minkvariant, cluster 5 aldrig har fået sekventeret deres prøver. Der er endvidere en forsinkelse på op til tre uger fra testdatoen til resultatet af WGS-analyserne foreligger, så disse smittekæder vil være umulige at spore.

Skal vi nu gensekventere alle positive test i hele Danmark – eller kun stikprøver?

Der er ikke et enkelt svar på dette. Stikprøver kan ikke finde sjældne, men potentielt betydningsfulde typer. Men det kommer an på strategi og valg af formål. I øjeblikket er strategien, at man ikke selekterer prøver til sekventering. Denne strategi har en stor fordel, når man skal opgøre f.eks. andel af minkvariant eller andre undergrupper af virus.

Skal vi gensekventere de "gamle" prøver, så vi kan se om der er mere end 12?

Der er med overvejende sandsynlighed mere end 12, da kun 12-15% af alle positive prøver sekventeres, og man må formode, at ikke alle testes. Det er vigtigt at pointere, at man ikke kan bruge antal sekvens-bestemte prøver som et tal for hvor mange, der findes i alt. De sekventerede prøver er en lille stikprøve af den samlede mængde smittede. Hvis gamle prøver skal prioriteres nu, vil det betyde, at færre nye prøver kan analyseres.

Og så et lidt andet spørgsmål:

Hvorfor kun i Nordjylland og ikke andre områder med mink. Og hvorfor netop disse nordjyske kommuner? Indtil uge 42, hvor de seneste WGS-resultater er fra, var der stort set kun smittede minkfarme i Nordjylland. Der er meget stort sammenfald mellem forekomst af **smittede** minkfarme og SARS-CoV-2 Minkvariant hos mennesker. Vi så endda, at i den periode henover sommeren, hvor der ikke var positive farme, fandtes kun meget få tilfælde med minkvarianten i mennesker.

Hvis der kommer flere tilfælde i Vestjylland eller andre minktætte områder forventes de SARS-CoV-2-typer, der smitter mink i dette område at udvise en lignende stigning blandt mennesker. Men i områder med store byer, hvor andre mekanismer driver epidemien, vil minksmitten selvfølgelig fylde mindre. Dette mønster kan

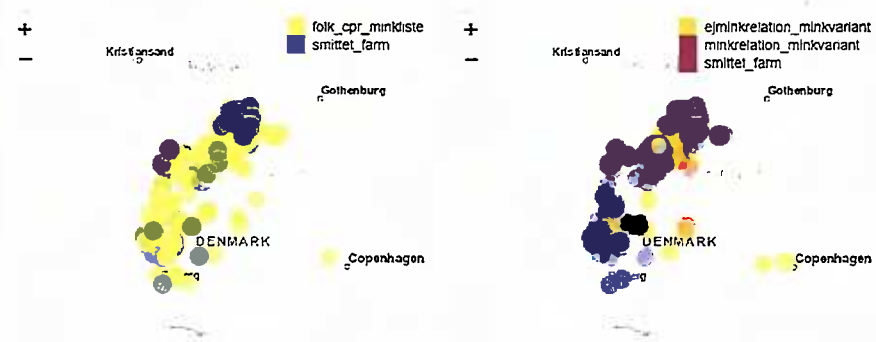


også ses ved opgørelse på kommune niveau i Nordjylland. Det vil sige, at minkvariant hos mennesker hænger nært sammen med, at minkfarme er smittet med samme variant. Andre steder forekommer minkvarianten ikke. Med nye typer i minkfarme i andre områder vil vi forvente at disse nye typer bliver årsag til smitte af mennesker i de pågældende områder.

Mink farms and COVID19 infections:

Overview (Aug - Oct, 2020)
Opdatering 06 november, 2020

COVID19 affected farms and COVID19+ individuals on the CPR_MINK list (left);
and COVID19+ individuals with WGS confirmed mink-variant (right)
August to October, 2020



COVID19 affected farms and COVID19+ Individuals with WGS confirmed mink-variant
Weekly occurrences from August to October, 2020

Uge: 37



1 Preliminary rapport on SARS-CoV-2 spike mutations arising in Danish mink,
2 their spread to humans and neutralization data.

3

4 SARS-CoV-2 spike mutations arising in Danish mink and their spread to
5 humans

6 Statens Serum Institut, 5 Artillerivej, DK-2300 Copenhagen S, DENMARK

7

8 Background

9 Despite control measures, SARS-CoV-2 continued to spread among mink farms across northern
10 Denmark, with more than 200 farms infected by November 2020. SARS-CoV-2 genome sequences
11 obtained from infected mink and humans living on the farms provided evidence of SARS-CoV-2 spread
12 between mink and human in zoonotic events. This study investigates the amino acid changes in the
13 spike surface glycoprotein that appeared during this outbreak and their effect on the antigenicity of
14 the SARS-CoV-2 virus.

15 Spike mutations

16 Within the infected mink, the SARS-CoV-2 virus mutated, giving rise to several amino acid changes in
17 the spike protein. The first was a tyrosine to phenylalanine at amino acid 453 (Y453F), a mutation that
18 also appeared during the Dutch mink farm outbreaks. It is a conservative amino acid substitution in
19 the receptor binding domain that directly contacts the host ACE2 receptor at amino acid 34 (Wang et
20 al). This ACE2 contact position differs between human and mink (histidine [34H] in humans and
21 tyrosine [34Y] in mink and other mustelids (Damas et al)), which suggests that Y453F is an adaptation
22 mutation to mink ACE2. Importantly, 453F increases affinity for human ACE2, which may explain its
23 successful introduction and establishment in humans.

24 Following the appearance of 453F, additional spike mutations were observed in minks and the humans
25 epidemiologically linked to the infected mink farms (Fig. 1). These include: i) 69-70deltaHV - a deletion
26 of a histidine and valine at amino acid positions 69 and 70 in the N-terminal domain of the S1 subunit;
27 ii) I692V – a conservative substitution at position 692 that is located seven amino acids downstream
28 of the furin cleavage site; iii) S1147L – a non-conservative substitution at position 1147 in the S2
29 subunit; and iv) M1229I – a conservative substitution located within the transmembrane domain.

30 Clinical isolates

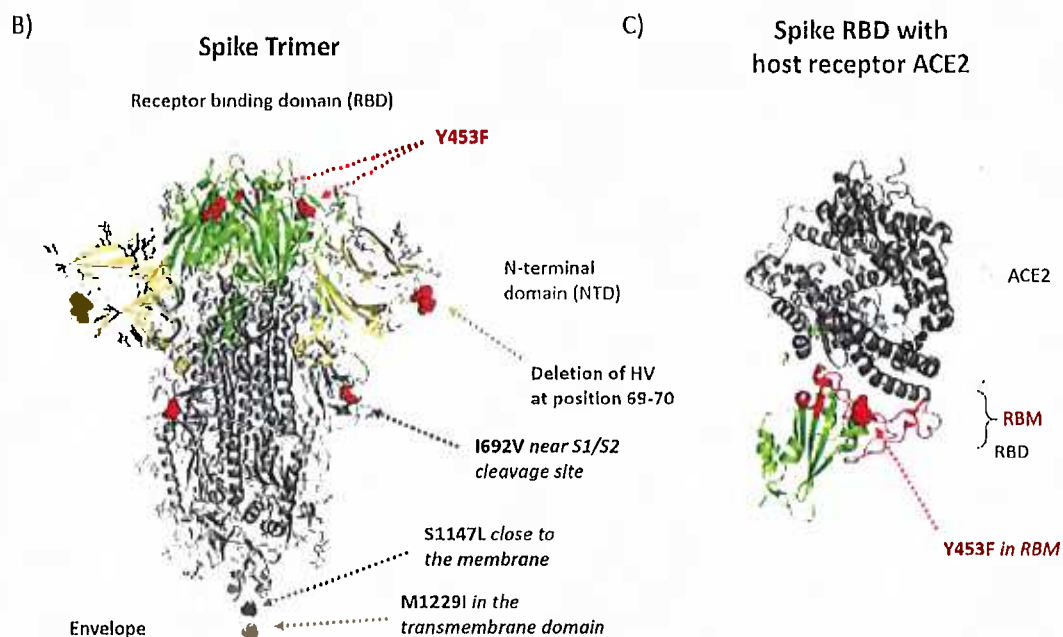
31 Efforts are underway to isolate each mink-associated SARS-CoV-2 spike mutant strain that occurs in
32 people residing in Denmark. To date, Statens Serum Institut in Denmark has isolated two strains of
33 mink-associated SARS-CoV-2 viruses. These include an isolate with the 453F spike mutation (F-spike)
34 from cluster 1 and an isolate with a 69-70deltaHV, 453F, 692V, and 1229I mutation combination from
35 Cluster 5 (hereafter referred to as Δ FVI-spike). To ensure that subculturing of SARS-CoV-2 clinical
36 isolates on VeroE6 cells did not induce additional spike mutations, each isolate was sequenced. The
37 spike protein of the cultured virus was identical to that of the SARS-CoV-2 virus in the original clinical
38 sample.

A)

Spike mutation combinations*	Abbreviation	Number of positive clinical samples**
453F	F	N = 142
69-70delHV, 453F	Δ F	N = 162
69-70delHV, 453F, 1147L	Δ FL	N = 18
69-70delHV, 453F, 692V, 1229I	Δ FVI	N = 12

* All SARS-CoV-2 mink-associated sequences also contained the D614G

** For sequenced samples up until 31 October 2020. May include duplicate samples taken from the same person and is therefore not necessarily representative of the number of infected persons.



39

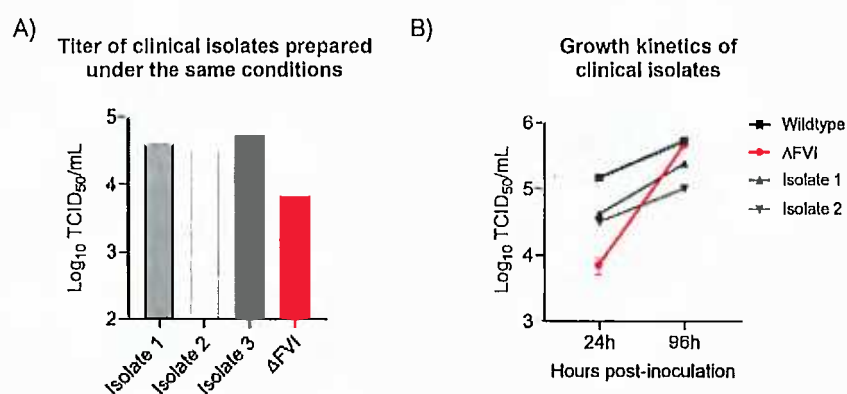
40 Figure 1. The mink-associated mutations in the SARS-CoV-2 spike protein. A) The combination and frequency
 41 of mink-associated spike mutations detected in SARS-CoV-2 infected humans B) The crystal structure of a closed
 42 prefusion spike trimer [PDB: 6ZGE] with the position of the Y453F variant in the receptor binding motif, the
 43 position of two amino acids deleted in the N-terminal domain, and the position of the I692V variant. The regions
 44 encompassing the S1147L and M1229I mutations are not within the crystal structure; however, their relative
 45 positions are indicated. C) The position the Y453F variant in a receptor binding domain complexed with a host
 46 ACE2 receptor [PBD: 6LZG].

47

48 The clinical isolates bearing the Y453F spike mutation replicated as efficiently as the
 49 unmutated/wildtype SARS-CoV-2 virus that predominates in Denmark (data not shown). Conversely,
 50 the SARS-CoV-2 virus with four mutations grew slower than both the wildtype virus and other SARS-
 51 CoV-2 virus isolates (Fig. 2). The cytopathic effect (CPE) induced by the Δ FVI-spike mutant virus
 52 appeared later and was less pronounced and had an approximate 10-fold lower titer 24 hours post-
 53 inoculation compared to human SARS-CoV-2 isolates prepared under the same conditions (Fig. 2A). At
 54 96 hours post-inoculation the Δ FVI-spike mutant virus titer was comparable to that of the wildtype

55 virus and exceeded other SARS-CoV-2 viruses isolated and subcultured under the same conditions (Fig.
 56 2B). The Δ FVI-spike mutant virus titer increased 54.7-fold from 24 to 96 hours post-inoculation,
 57 compared to an average of 4-fold (range: 2.6 to 5.7-fold) over the same time for other SARS-CoV-2
 58 isolates. The ability to replicate to high viral titers is consistent with high levels of the Δ FVI-spike
 59 mutant virus detected in throat swab samples of infected persons, as indicated by an average qPCR
 60 assay (E-Sarbeco) cycle threshold of 24.7 (range: 20-35). Further evaluation of the SARS-CoV-2 Δ FVI-
 61 spike strain growth kinetics in other cells systems are warranted.

62



63

64 **Figure 2. Growth kinetics of the SARS-CoV-2 Δ FVI-spike mutant virus.** A) Virus titers 24h post-inoculation for
 65 SARS-CoV-2 viruses isolated from clinical samples under the exact same conditions. Isolate 1-3 each have
 66 different spike mutations unrelated to mink outbreaks, these include N439K (isolate 1), N439K+69-70delHV
 67 (isolate 2), and S477N (isolate 3). B) The growth kinetics of the Δ FVI-spike mutant virus relative to other clinical
 68 isolates, including the nonmutated virus (wildtype) that predominates in Denmark and spike mutant viruses
 69 (isolate 1 and 2 as for [A]).

70

71 Virus neutralization

72 The introduction of SARS-CoV-2 spike mutant viruses raises concerns about a potential reduced
 73 recognition of the protein by antibodies induced after SARS-CoV-2 infection or vaccination that may
 74 have implications for re-infections and vaccine efficacy, respectively. To evaluate the effect of the
 75 mink-associated SARS-CoV-2 spike mutant viruses on antigenicity, neutralizing activity of convalescent
 76 plasma from persons who recovered from a SARS-CoV-2 infection and sera from immunized rabbits
 77 were compared between the Δ FVI-spike mutant virus and an unmutated wildtype virus.

78 The neutralization activity was tested using a micro-neutralization assay that was adapted from the
 79 World Health Organization protocol for influenza virus neutralization. The assay was developed at
 80 Statens Serum Institut and validated on >300 convalescent plasma/serum samples as well as sera from
 81 vaccinated mice and rabbits. In brief, 2-fold serial dilutions of plasma/sera were pre-incubated with

82 SARS-CoV-2 virus for 1 hour before addition to a monolayer of VeroE6 cells prepared in 96-well plates.
83 After a 24 hour incubation, the cells were fixed to the plates and the level of virus determined using a
84 standard ELISA targeting the SARS-CoV-2 nucleocapsid protein. To determine the amount of virus to
85 add to the assay, clinical isolates are usually titrated at 24 hours and from these titers $100\times$ TCID₅₀
86 virus used in the neutralization assay. This equates to approximately $300\times$ TCID₅₀ from titers calculated
87 96 hours post-inoculation. Due to the difference in growth kinetics of the Δ FVI-spike mutant virus, the
88 TCID₅₀ titer calculated at 96 hours was deemed to reflect the amount of infectious particles in the virus
89 stock more accurately than that measured at 24 hours post-inoculation. Thus, each serum samples
90 were tested in duplicated with $300\times$ TCID₅₀ as calculated from 96 hours post-inoculation titers.

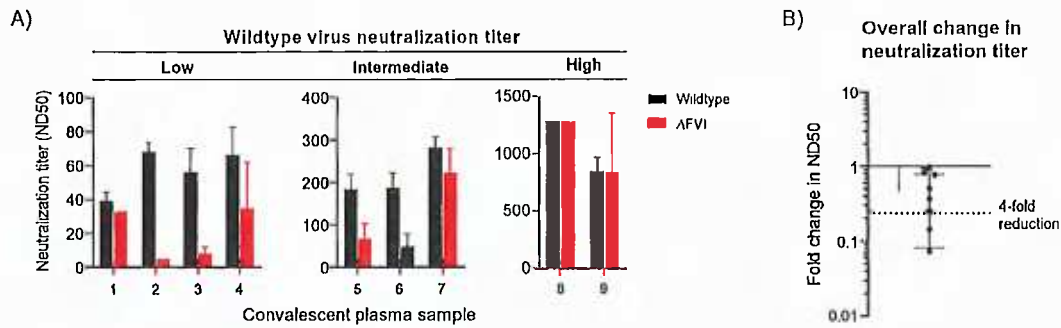
91 The convalescent plasma was selected from persons living in the South of Denmark, geographically
92 separated from the mink outbreaks in the North of Denmark, and had a documented SARS-CoV-2
93 infection at the beginning of the Danish epidemic before the mink outbreaks occurred. Since the effect
94 of the spike mutations on different levels of neutralizing antibodies is unknown, sera with known low
95 (N=4), intermediate (N=3) and high (N=2) neutralization titers were tested. Each plasma sample
96 represents a different donor and was tested in duplicate.

97 The different convalescent plasma were not equally affected by the Δ FVI-spike mutant virus. The two
98 plasma samples with high neutralization titers were largely unaffected, while plasma with low and
99 intermediate titers were more likely to experience a loss in neutralization activity (Fig. 3a). In these
100 preliminary data from 9 convalescent plasma, an average 3.58-fold (range: 0 to 13.5) reduction was
101 observed. Only two plasma samples had a greater than 4-fold reduction, a threshold set for
102 neutralization resistance by Li et al. who evaluated other spike mutants presented on pseudovirus
103 particles. It is important to note that the findings are preliminary and warrant further investigation in
104 other SARS-CoV-2 neutralization assays.

105

106

107



108

109 Figure 3. Neutralization of the SARS-CoV-2 Δ FVI-spike mutant virus relative to an unmutated SARS-CoV-2
110 virus. A) Convalescent plasma from nine individuals with known low, intermediate, or high neutralizing titers
111 were used to assess the effect of the spike mutations on neutralization activity of antibodies induced following
112 infection with an unmutated SARS-CoV-2 virus. The neutralization titer was determined as follows: a 50% cut-
113 off value was calculated using quadruplicate virus controls (prepared for each virus) and cell controls included
114 on each plate. The titer was calculated as the interpolation of a 5-parameter titration curve with the 50% cut-
115 off value. The reciprocal serum dilution is reported as the 50% neutralization antibody titre. B) The fold-change
116 in neutralization titer for the SARS-CoV-2 Δ FVI-spike mutant virus relative to an unmutated SARS-CoV-2 virus.
117 The horizontal dotted line indicates a 4-fold reduction. The bars represent the mean of duplicate measurements
118 with the standard deviation.

119

120

121

122 **PRELIMINARY References**

- 123 Wang et al (2020) Structural and Functional Basis of SARS-CoV-2 Entry by Using Human ACE2
- 124 Damas et al (2020) Broad host range of SARS-CoV-2 predicted by comparative and structural analysis
125 of ACE2 in vertebrates
- 126 Li et al (2020) The impact of mutations in SARS-CoV-2 spike on Viral Infectivity and Antigenicity. Cell
127 182, 1284-1294