



## **Forskellige virusstammer var årsag til udbrud af plasmacytose i danske mink (Neovison vison) i 2015**

**Ryt-Hansen, Pia; Hjulsager, Charlotte Kristiane; Hagberg, Emma Elisabeth; Chriél, Mariann; Struve, Tina; Pedersen, Anders Gorm; Larsen, Lars Erik**

*Published in:*

Faglig årsberetning 2016 : Kopenhagen Fur

*Publication date:*

2017

*Document Version*

Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*

Ryt-Hansen, P., Hjulsager, C. K., Hagberg, E. E., Chriél, M., Struve, T., Pedersen, A. G., & Larsen, L. E. (2017). Forskellige virusstammer var årsag til udbrud af plasmacytose i danske mink (Neovison vison) i 2015. I *Faglig årsberetning 2016 : Kopenhagen Fur* (s. 163-167). Aarhus N: Kopenhagen Fur.

---

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

## Forskellige virusstammer var årsag til udbrud af plasmacytose i danske mink (*Neovison vison*) i 2015

Pia Ryt-Hansen<sup>1</sup>, Charlotte Hjulsager<sup>1</sup>, Emma Hagberg<sup>2</sup>, Mariann Chriél<sup>1</sup>, Tina Struve<sup>2</sup>, Anders Pedersen<sup>3</sup> & Lars Larsen<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Bülowsvej 27, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark.

<sup>2</sup>Kopenhagen Fur, Langagervej 60, DK-2600 Glostrup, Denmark.

<sup>3</sup>Center for Biological Sequence Analysis, Technical University of Denmark, Kemitorvet Building 208, DK-2800 Lyngby, Denmark.

### Sammendrag

Bekæmpelse af plasmacytose i danske mink blev påbegyndt i 1976 og har primært været diagnosticeret i Nordjylland i det seneste årti. I 2015 blev der imidlertid konstateret plasmacytose på farme i næsten hele landet. Kilderne til udbruddene var ukendt. Ved brug af fylogenetiske analyser af partielle NS1 gensekvenser, kunne man konstatere, at udbruddene var forårsaget af to forskellige stammer af plasmacytosevirus, "Holstebro-stammen" og "Sjællandsstammen", der var forskellige fra den nordjyske "Sæbystamme". Variationen inden for stammerne var bemærkelsesværdig lav. Det sjællandske udbrud var epidemiologisk associeret gennem brug af fælles faciliteter og personale. Den anden gruppe af udbrud var spredt ud over hele Jylland og Fyn. Fælles for disse udbrud var, at de modtog foder fra samme fodercentraler, omend sekundær spredning af virus mellem farme ikke kan udelukkes.

**Ryt-Hansen, P., Hjulsager, C.K., Hagberg, E.E., Chriél, M., Struve, T., Pedersen, A. & Larsen, L.E., 2017.** Forskellige virusstammer var årsag til udbrud af plasmacytose i danske mink (*Neovison vison*) i 2015. Faglig Årsberetning 2016, 163-167. Kopenhagen Forskning, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Danmark.

### Abstract

Systematic eradication of Aleutian Mink Disease Virus (AMDV) from Danish mink farms was initiated in 1976 and in the last decades the disease was mainly restricted to Northern Jutland. However, in 2015 multiple outbreaks of AMDV occurred in farms throughout Denmark with unknown source. Phylogenetic analyses of partial NS1 gene sequences concluded that the outbreaks were caused by two new different clusters of viruses - clearly different from the strain found in Northern Jutland. The variation within the clusters was remarkably low. The outbreaks on Zealand were epidemiologically linked through shared farm and pelting facilities as well as personnel. The other outbreak cluster was located throughout Jutland and Funen. Only identified link was through the feed producers. However, the possibility of secondary transmissions between farms in the same geographical area cannot be excluded.

**Ryt-Hansen, P., Hjulsager, C.K., Hagberg, E.E., Chriél, M., Struve, T., Pedersen, A. & Larsen, L.E., 2017.** Different strains of plasmacytosis virus were responsible for outbreaks of plasmacytosis in Danish mink (*Neovison vison*) in 2015. Annual Report 2016, 163-167. Kopenhagen Research, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Denmark.

**Keywords:** Mink, AMDV, clustering

### Indledning

Plasmacytosevirus, også kaldet Aleutian Mink Disease Virus (AMDV), er et enkeltstregnet DNA-virus, der tilhører Amdoparvovirus slægten i Parvoviridae familien. AMDV genomet er 4,8 kilobaser langt og koder for to strukturelle proteiner (VP1 og VP2) og tre ikke-strukturelle proteiner (NS1, NS2 og NS3). NS1 genot spiller en vigtig rolle i virus-replikationen og udviser en stor genetisk variabilitet mellem forskellige stammer (Best *et al.*,

2003; Gottschalck *et al.*, 1994; Huang, 2014).

Plasmacytose skyldes infektion med AMDV og manifesterer sig med forskellige kliniske sygdomstegn, herunder lungebetændelse og øget dødelighed. Sygdommen er en immunmedieret sygdom og skyldes aflejring af immunkomplekser i forskellige organer. Mink er ofte subklinisk inficerede med ingen eller kun mindre produktionstab,

men i enkelte tilfælde forårsager sygdommen alvorlig sygdom og produktionstab.

Bekæmpelse af plasmacytose i Danmark blev igangsat med et frivilligt testprogram for plasmacytose og udryddelsespolitik i 1976, der i 1999 blev fulgt op med en bekendtgørelse, der pålagde test i alle minkfarme for at få status fastlagt (Anonym, 1999). Forekomsten af plasmacytose har siden 2002 været begrænset til Nordjylland og sjældne sporadiske fund i det øvrige Jylland. I 2015 blev der imidlertid diagnosticeret plasmacytose ved statusundersøgelserne for antistoffer i mange farme beliggende i Jylland og på Fyn. Samtidig blev der påvist plasmacytosevirus på Sjællandske farme med klinisk syge dyr. Kilde til re-infektionerne var ukendt.

Formålet med denne undersøgelse var at undersøge slægtskabet mellem virus fra udbruddene på basis af partiel sekventering af NS1 genet og fylogenetisk analyse af sekvenserne.

### **Materiale og metoder**

Vævs materiale og/eller blod fra 137 mink fra 73 forskellige farme blev analyseret. Hovedparten af prøverne var fra 2015, men enkelte arkiverede prøver af ældre dato blev også undersøgt. For hver prøve blev information om postnummer og fodercentral registreret.

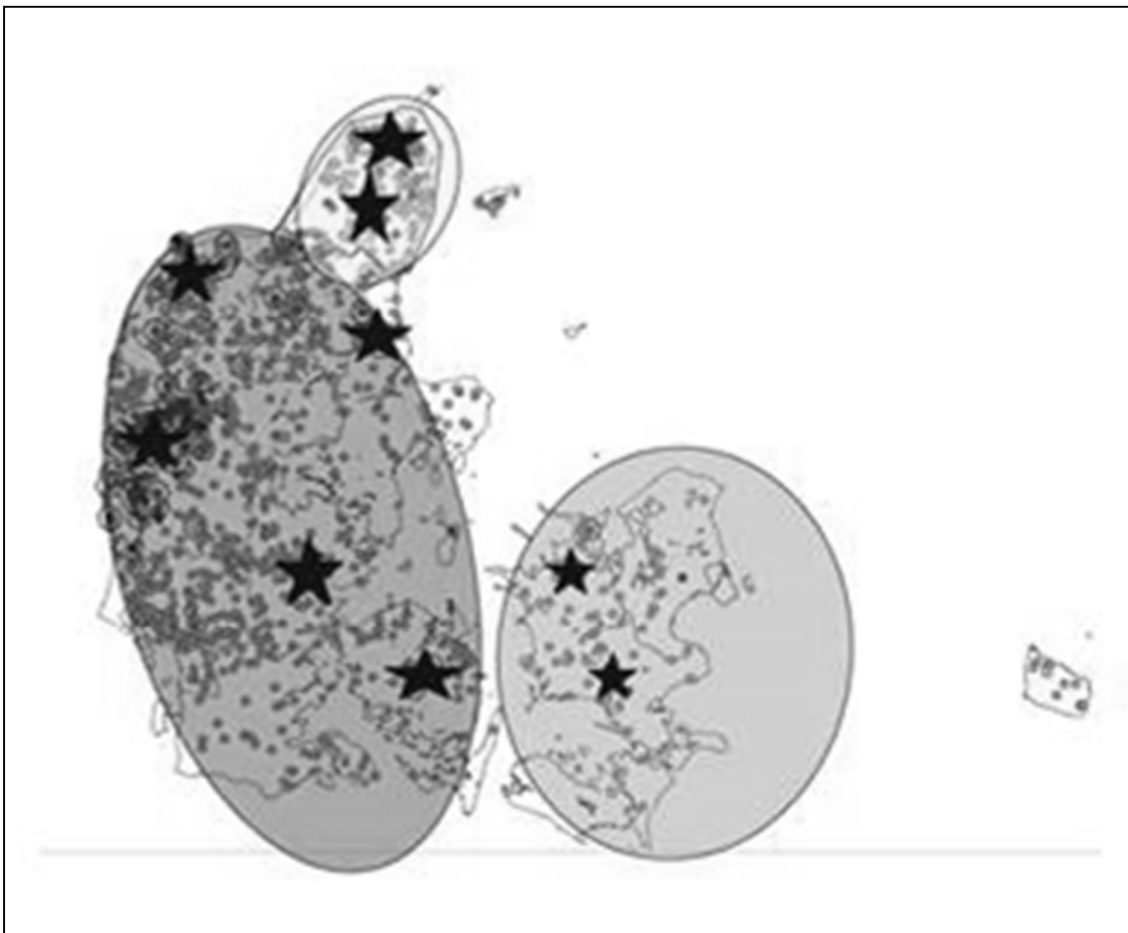
DNA ekstraheret fra prøverne blev testet med PCR med primerne AMDV-F-7-H-PN1 og AMDV-R-7-HPN2 (Jensen *et al.*, 2011). Primerne gav et amplicon på 328 basepar svarende til ca. 7 % af AMDV genomet. Et isolat af AMDV-G-stammen blev anvendt som positiv kontrol både ved DNA ekstraktion og til PCR. PCR-produkterne blev sekventeret med PCR primerne. Sekvenserne blev analyseret

med CLC software (QIAGEN, Århus, Danmark) og sammenlignet med tilgængelige sekvenser i NCBI GenBank.

### **Resultater**

Analyse af de partielle NS1-gensekvenser fra prøverne fra 2015 viste, at de grupperede sig i 3 grupper baseret på deres sekvens, og at der indenfor grupperne var sammenfald med prøvernes geografiske oprindelse (Figur 1). Alle AMDV positive prøver fra Nordjylland, 2015, var tæt beslægtede med den Sæby-stamme, der har forårsaget udbrud i Nordjylland i de seneste fire årtier (Christensen *et al.*, 2011) og udgjorde en gruppe. Sekvenser fra prøver udtaget på farme fra det øvrige Jylland og fra Fyn i 2015 var tæt beslægtede med hinanden og udgjorde en anden gruppe kaldet "Holstebro-stammen". De lignede hverken de øvrige danske virussekvenser fra denne undersøgelse eller de danske og udenlandske sekvenser, der var tilgængelige i GenBank. På tilsvarende vis var alle AMDV positive prøver fra de sjællandske mink kun tæt beslægtede med hinanden og udgjorde en separat gruppe kaldet "Sjællandsstammen". Der var dog enkelte undtagelser for sammenhængen mellem virusstamme og den geografiske oprindelse af prøverne, idet prøver fra to midtjyske farme havde virus af "Sæbystamme".

Fem forskellige fodercentraler havde leveret foder til de inficerede farme. Alle farme på Sjælland modtog foder fra samme producent. Farme, der var smittet med "Holstebro-stammen", fik leveret foder fra fire forskellige fodercentraler. Fodercentralerne leverede også foder til farme, der ikke fik påvist smitte med plasmacytosevirus.



Figur 1. Sammenhængen mellem fund af forskellige virusstammer og geografisk lokalisering af smittede farme. Gul (dækker Vendsyssel), sæbystammen; Rød (dækker Fyn og Jylland), Holstebro-stammen; blå (dækker Sjælland), Sjællandsstammen. Stjerne angiver de første fund af virus i 2015. Grønne prikker angiver plasmacytose-frie farme

## Diskussion

Denne undersøgelse har vist, at partiel NS1 sekventering kan anvendes til gruppering af sekvenser fra udbruddene af plasmacytose i 2015. Metoden kan imidlertid ikke bruges til smitteopsporing mellem farmene, da der er for lidt sekvensinformation i det partielle NS1-gensegment.

To nye plasmacytose-stammer blev identificeret i Danmark: "Holstebro-stammen" og "Sjællandsstammen". Sekvenserne fra forskellige farme, der var inficeret med den samme stamme, var meget ens. Dette er også forventet, da farmene er re-inficeret med samme virusstamme eller fra samme smittekilde og prøverne er taget indenfor en kort tidsperiode.

Undersøgelsens resultater dokumenterer derfor, at udbruddene med henholdsvis "Holstebro-stammen" og "Sjællandsstammen", har hver deres smittekilde.

Gruppen af smittede sjællandske farme modtog alle foder fra samme foderleverandør, men disse farme havde tillige en epidemiologisk forbindelse, idet de delte farmfaciliteter og mandskab. Da plasmacytosevirus er meget modstandsdygtig i miljøet, kan det derfor let overføres med mandskab, tøj og redskaber, som deles mellem farmene (Eklund, 1968; Themudo *et al.*, 2012; Eterpi *et al.*, 2009; Hussain *et al.*, 2014).

Holstebro-stammen blev kun påvist i minkfarme beliggende på Fyn og i Jylland, hovedsagligt i den sydlige og midterste

region i Jylland. Ud over et mønster af geografisk oprindelse for farme smittet med "Holstebro-stammen", havde i alt fire fodercentraler leveret foder til farmene. Generelt blev der ikke konstateret smitte i nabofarmene til farme smittet med Holstebro-stammen, hvis de havde en anden foderleverandør, hvorfor horisontal transmission må være begrænset. Dette sandsynliggør, at foderet var årsag til introduktion af smitte til farmene. Ved kontaminering af foderet med plasmacytosevirus er det usandsynligt at det vil være homogent fordelt i en råvarebatch og dermed også i en foderbatch. Det er derfor usandsynligt at alle farme vil blive eksponeret for tilstrækkelige doser af virus til at smitte et dyr. Derfor vil ikke alle farme blive smittet, selvom de får foder fra en fodercentral, der sandsynligvis har haft virus i et parti råvarer. Det faktum, at sekvenserne i Holstebro-stammen er meget ens tyder på, at fodercentralerne har brugt samme forurenede råvare eller at flere råvarer er forurenede med samme plasmacytosevirus.

Ved et foderbåren udbrud i 2002 blev tilsvarende ensartethed mellem prøverne fra de enkelte farme observeret. Foderet blev leveret fra én fodercentral og 223 ud af 310 farme blev smittet (Willadsen, 2003).

Én fodercentral leverede foder til 8 farme med Holstebro-stammen, men også til hovedparten af farmene, der var inficeret med Sæbystammen. Det kan derfor ikke udelukkes, at enkelte af disse farme har en dobbelt infektion, selvom det kun var Sæby stamme der blev påvist.

De to farme inficeret med Sæbystammen, som er geografisk placeret i Midtjylland, formodes at være sket ved horisontal transmission. Introduktionen af smitten kendes ikke. Der har også i tidligere år været diagnosticeret få sporadiske tilfælde af plasmacytose uden for Nordjylland. Et nyt plasmacytose udbrud kan endvidere

skyldes smitte fra vilde mårdyr (Farid, 2013; Jensen *et al.*, 2012; Knuutila *et al.*, 2015), men denne risiko er dog marginal under danske forhold. Kun én vild mink, nedlagt i Jylland, blev fundet antistof-positiv ved overvågning af den vilde fauna ved Veterinærinstituttet og gensekvensen var meget forskellig fra i stammerne fundet i de danske farme.

### **Konklusion**

Denne undersøgelse har dokumenteret, at NS1-sekventering kunne bruges til at gruppere virus fra udbrud af plasmacytose på danske minkfarme i 2015. Der blev identificeret 2 nye plasmacytosevirus-stammer i Danmark: "Holstebro-stammen" og "Sjællandsstammen".

Der blev sandsynliggjort et epidemiologisk link mellem de Sjællandske udbrud, i form af fælles brug af farmmateriale og mandskab. De udbrud, der blev diagnosticeret i Jylland, som ikke var "Sæbystammen", var alle sammenfaldende med bestemte fodercentraler. Den store lighed mellem de forskellige virus af "Holstebro-stammen" indikerer den samme oprindelse af virus eller flere introduktioner med den samme kilde, som blev spredt gennem kontamineret foder.

### **Anerkendelser**

Tak til laborant Nina Dam Grønnegaard for omhyggelig udførelse af laboratorieundersøgelserne. Denne undersøgelse blev finansieret af Kopenhagen Fur 2016.

### **Referencer**

Anonym, 1999. Bekendtgørelse om plasmacytose hos pelsdyr: BEK nr 312 af 19/05/1999

Best, S.M., Shelton, J.F., Pompey, J.M., Wolfenbarger, J.B., Bloom, M.E., 2003. Caspase Cleavage of the Nonstructural Protein NS1 Mediates Replication of Aleutian Mink Disease Parvovirus. *J. Virol.* 77, 5305–5312. doi:10.1128/JVI.77.9.5305-5312.2003

- Christensen, L.S., Gram-Hansen, L., Chriél, M., Jensen, T.H., 2011. Diversity and stability of Aleutian mink disease virus during bottleneck transitions resulting from eradication in domestic mink in Denmark. *Vet. Microbiol.* 149, 64–71. doi:10.1016/j.vetmic.2010.10.016
- Eklund, C.M., 1968. Aleutian disease of mink: properties of the etiologic agent and the host responses. *J. Infect. Dis.* 118.
- Eterpi, M., McDonnell, G., Thomas, V., 2009. Disinfection efficacy against parvoviruses compared with reference viruses. *J. Hosp. Infect.* 73, 64–70. doi:10.1016/j.jhin.2009.05.016
- Farid, A.H., 2013. Aleutian mink disease virus in furbearing mammals in Nova Scotia, Canada. *Acta Vet. Scand.* 55.
- Gottschalck, E., Alexandersen, S., Storgaard, T., Bloom, M.E., Aasted, B., 1994. Sequence comparison of the non-structural genes of four different types of Aleutian mink disease parvovirus indicates an unusual degree of variability. *Arch. Virol.* 138, 213–231. doi:10.1007/BF01379127
- Huang, Q., 2014. Molecular characterization of the small nonstructural proteins of parvovirus Aleutian mink disease virus (AMDV) during infection. *Virology* 452–453.
- Hussain, I., Price, G.W., Farid, A.H., 2014. Inactivation of Aleutian mink disease virus through high temperature exposure in vitro and under field-based composting conditions. *Vet. Microbiol.* 173, 50–8. doi:10.1016/j.vetmic.2014.07.014
- Jensen, T.H., Christensen, L.S., Chriél, M., Uttenthal, A., Hammer, A.S., 2011. Implementation and validation of a sensitive PCR detection method in the eradication campaign against Aleutian mink disease virus. *J. Virol. Methods* 171, 81–5. doi:10.1016/j.jviromet.2010.10.004
- Jensen, T.H., Christensen, L.S., Chriél, M., Harslund, J., Salomonsen, C.M., Hammer, A.S., 2012. High prevalence of Aleutian mink disease virus in free-ranging mink on a remote Danish island. *J. Wildl. Dis.* 48, 497–502. doi:10.7589/0090-3558-48.2.497
- Knuutila, A., Uzcátegui, N., Kankkonen, J., Vapalahti, O., Kinnunen, P., 2009. Molecular epidemiology of Aleutian mink disease virus in Finland. *Vet. Microbiol.* 133, 229–38. doi:10.1016/j.vetmic.2008.07.003
- Themudo, G., Houe, H., Agger, J.F., Ostergaard, J., Ersbøll, A.K., 2012. Identification of biosecurity measures and spatial variables as potential risk factors for Aleutian disease in Danish mink farms. *Prev. Vet. Med.* 107, 134–41. doi:10.1016/j.prevetmed.2012.05.009
- Willadsen, C.M., 2003. Rapport over forløbet af plasmacytose-epidemien blandt midt-/sydjyske- og fynske minkfarme i perioden 6. juni til 1. november 2002. Dansk Pelsdyr Laboratorium, Glostrup.