



## Omfattende udbrud af hvalpesyge i danske mink (Neovison vison) og vilde rovdyr

Trebbien, Ramona; Chriél, Mariann; Struve, Tina; Hjulsager, Charlotte Kristiane; Larsen, Gitte; Larsen, Lars Erik

*Published in:*  
Faglig Årsberetning 2013

*Publication date:*  
2013

*Document Version*  
Også kaldet Forlagets PDF

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Trebbien, R., Chriél, M., Struve, T., Hjulsager, C. K., Larsen, G., & Larsen, L. E. (2013). Omfattende udbrud af hvalpesyge i danske mink (Neovison vison) og vilde rovdyr. I *Faglig Årsberetning 2013: Kopenhagen Fur* (s. 171-178). Kopenhagen Fur. [http://issuu.com/kopenhagenfur/docs/faglig\\_\\_\\_\\_rsberetning](http://issuu.com/kopenhagenfur/docs/faglig____rsberetning)

---

### 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.

## Omfattende udbrud af hvalpesyge i danske mink (*Neovison vison*) og vilde rovdyr

Ramona Trebbien<sup>1</sup>, Mariann Chriél<sup>1</sup>, Tina Struve<sup>2</sup>, Charlotte Kristiane Hjulsager<sup>1</sup>, Gitte Larsen<sup>1</sup> & Lars Erik Larsen<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Bülowsvej 27, 1870 Frederiksberg C, Danmark.

<sup>2</sup>København Diagnostik, Langagervej 60, 2600 Glostrup, Danmark.

### Sammendrag

Et omfattende udbrud af hvalpesyge i danske farmede mink (*Neovison vison*) startede i sensommeren 2012. Sideløbende hermed blev der observeret et stort antal syge/selvdøde ræve og mårhunde. For at afdække oprindelsen af smitten blev virusgenet (H) fuldlængde sekventeret. I alt blev der undersøgt 26 prøver fra mink og 7 prøver fra vilde ræve, 2 fra mårhunde og 1 fra ilder. Analyserne viste, at virus, der cirkulerer i minkfarme og i den vilde fauna, var 99,45% til 100% identiske på nukleotidniveau. Sekvenserne kan grupperes efter enkelte nukleotid polymorfier kombineret med geografisk fordeling af minkfarme og vild fauna. Udbrudsvirus grupperer sig fylogenetisk med virus fra vilde ræve fra Tyskland og Ungarn (hhv. 99,29% og 99,62 %). Undersøgelse af lopper (*Ceratophyllus sciurorum*) fundet på en syg mink, indeholdt hvalpesygevirus. Den undersøgte ilder var drægtig, og fostrene indeholdt virus som indikation på, at virus kan overføres til fostrene. Undersøgelsen dokumenterer, at vilde rovdyr kan spille en vigtig rolle i smittespredningen af hvalpesygevirus mellem minkfarme og viser, at den vilde fauna kan fungere som reservoir for viruset mellem udbrud.

Trebbien, R., Chriél, M., Struve, T., Hjulsager, C.H., Larsen, G. & Larsen, L.E. 2014. Omfattende udbrud af hvalpesyge i danske mink (*Neovison vison*) og vilde rovdyr. Faglig Årsberetning 2013, 171-178. København Forskning, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Danmark.

### Abstract

A major outbreak of canine distemper virus (CDV) in Danish farmed mink (*Neovison vison*) started in the late summer period of 2012. At the same time, a high number of diseased and dead wildlife species such as foxes, raccoon dogs, and ferrets were observed. To track the origin of the outbreak virus full-length sequencing of the receptor binding surface protein hemagglutinin (H) was performed on 26 viruses collected from mink and 10 viruses collected from wildlife species. Subsequent phylogenetic analyses showed that the virus circulating in the mink farms and wildlife were highly identical with an identity at the nucleotide level from 99.45 % to 100 %. The sequences could be grouped by single nucleotide polymorphisms according to geographical distribution of mink farms and wildlife. The outbreak viruses clustered phylogenetically in the European lineage and were highly identical to wildlife viruses from Germany and Hungary (respectively 99.29% and 99.62%). The study documented for the first time that fleas (*Ceratophyllus sciurorum*) contained CDV and that vertical transmission of CDV occurred in a wild ferret. The study provides evidence that wildlife species, including foxes, play an important role in the transmission of CDV to farmed mink and that the virus may be maintained in the wild animal reservoir between outbreaks.

Trebbien, R., Chriél, M., Struve, T., Hjulsager, C.H., Larsen, G. & Larsen, L.E. 2014. Extensive outbreak of canine distemper in Danish farmed mink (*Neovison vison*) and wild carnivores. Annual Report 2013, 171-178. København Research, Agro Food Park 15, DK-8200 Aarhus N, Denmark.

**Keywords:** Canine distemper, virus, outbreak, farmed mink, wildlife

### Indledning

Hvalpesygevirus (CDV) forårsager en af de mest udbredte sygdomme i vilde og tamme rovdyr. Dette virus kan smitte en bred vifte af dyr, der tilhører familierne *Canidae* (hund, ræv, ulv, m.m.) og *Mustelidae* (fritter, mink, grævling, m.m.) (Appel and Summers, 1995). Virus findes i hele verden

og kan forårsage sygdom med høj sygelighed og dødelighed i immunologisk naive bestande (Appel and Summers, 1995). CDV tilhører slægten *Morbillivirus* under virus familien *Paramyxoviridae*. Viruspartiklen har kappe og er 150-300 nm i diameter. Virusgenomet består af enkeltstrenget RNA, der koder for en række virusprotei-

ner. H-proteinet er et overfladeglycoprotein, som er ansvarlig for binding til værtscellen og er et vigtigt mål for neutraliserende antistoffer (von Messling *et al*, 2001). H-proteinet er det mest variable protein og bruges derfor ofte til at undersøge den genetiske variabilitet af CDV (Sekulin *et al*, 2011; Martella *et al*, 2006).

Udbrud af hvalpesyge i danske minkfarme er almindelige, men i perioden 2008-2010 var der ingen hvalpesygeudbrud i Danmark. I 2011 blev der konstateret hvalpesyge i tre minkfarme, mens der i sensommeren og efteråret 2012 blev diagnosticeret 57 jyske minkfarme med hvalpesyge. Udbruddet fortsatte ind i 2013. Den vilde fauna i de samme områder var også ramt et stort antal syge og døde ræve.

Formålet med den foreliggende undersøgelse var at afdække oprindelsen af virus ved hjælp af en molekylær-epidemiologiske undersøgelse af virus isoleret fra mink og vilde dyr i forbindelse med og forud for udbruddet.

## Materiale og metoder

### Prøver

Lungevæv fra dyr, der var diagnosticeret smittet med hvalpesygevirus, enten ved specifik immunfluorescens histopatologi eller RT-PCR i rutinediagnostikken på Veterinærinstituttet, blev inkluderet i undersøgelsen. I alt 26 mink (*Neovison vison*) fra 25 uvaccinerede farme blev inkluderet, da en farm indsendte positive mink med 2,5 måneders interval. Fra den vilde fauna blev 7 smittede røde, vilde ræve (*Vulpes vulpes*), 2 mårhunde (*Nyctereutes procyonoides*) og én ilder (*Mustela putorius*) undersøgt. Derudover blev lopper (*Ceratophyllus sciuro-rum*) fra en smittet mink samt fostre fra den vilde ilder undersøgt. Desuden blev prøver fra ældre udbrud på minkfarme fra årene 2004 (n=1), 2007 (n=3) og 2011 (n=1) inkluderet i analysen. Information om den

geografiske placering af minkfarme og vilde fauna samt tidspunktet for diagnosen blev hentet fra Veterinærinstituttets laboratedatabase. Tidsforløbet af udbruddet er illustreret i figur 1.

### Isolering af virus genomet

Lungevæv, lopper, og fostre blev homogeniseret i en buffer, inden virus genomet blev isoleret fra materialet ved hjælp af RNeasy Mini Kit (Qiagen, GmbH, Germany) i henhold til firmaets forskrift.

### Fuld længde sekventering af H-genet

Ved hjælp af en specifik RT-PCR blev H-genet amplificeret, ved hjælp af et specialiseret enzymsystem beregnet til præcis kopiering af gener (SuperScript III OneStep RT-PCR System with Platinum Taq High Fidelity (Invitrogen Carlsbad, CA, USA)). H-genet blev efterfølgende sekventeret hos LGC Genomics (GmbH, Germany).

Sekvenserne blev analyseret i programmet CLC main Workbench 6.6.2 (CLC bio A/S, Aarhus, Denmark). Et fylogenetisk træ blev konstrueret med en afstandsbaseeret metode og ved brug af "Neighbor joining" algoritmen med "Bootstrap" analyse med 1000 replikater.

## Resultater

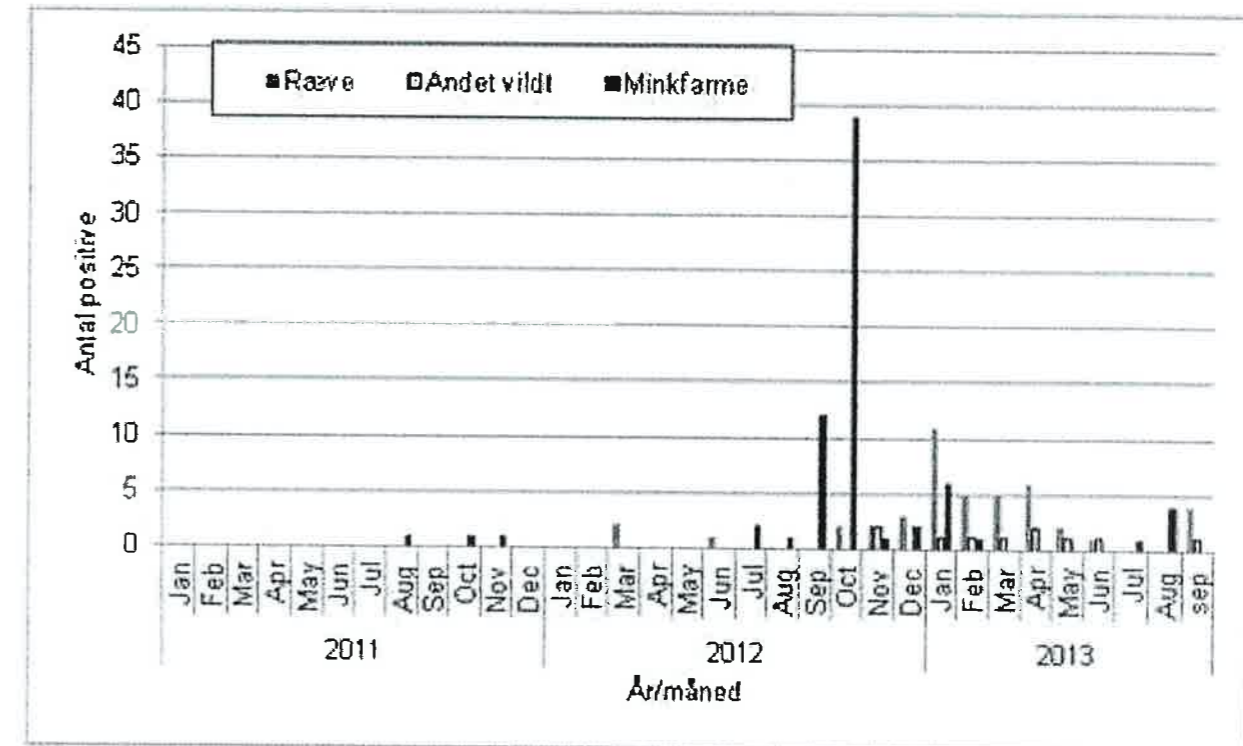
### Identiske virus H-gen sekvenser

Nukleotidsekvenserne af H-genet i virus fra smittede mink, ræve, mårhund og ilder indsamlet i 2012/2013 var 99,45% til 100% identiske, mens der kun var 91% identitet mellem de danske udbrudsvirus og vaccinstammerne Onderstepoort og Covac. Virus sekventeret fra den farm, der indsendte prøver to gange, med 2,5 måneder interval, var 100% identisk.

Sammenligning af virussekvenser, der er fundet i resten af verden, og offentliggjort i Genbank, viste, at det danske virus havde den højeste grad af identitet med CDV fundet i vilde dyr i Tyskland og Ungarn. Den

højeste identitet (99,29 - 99,62%) var fra en rød ræv i Tyskland nedlagt i 2008. Prøven fra 2011-udbruddet viste også en høj grad af identitet med de inkluderede prøver fra 2012/2013 (99,62 - 99,95% identitet). Fostre fra den drægtige vilde ilder indeholdt

en identisk virus med den fundet i lungen på dyret. Ydermere var gensekvensen fra lopperne 100% identisk med gensekvensen fra virus fundet i lungen af den loppeangrebne mink.



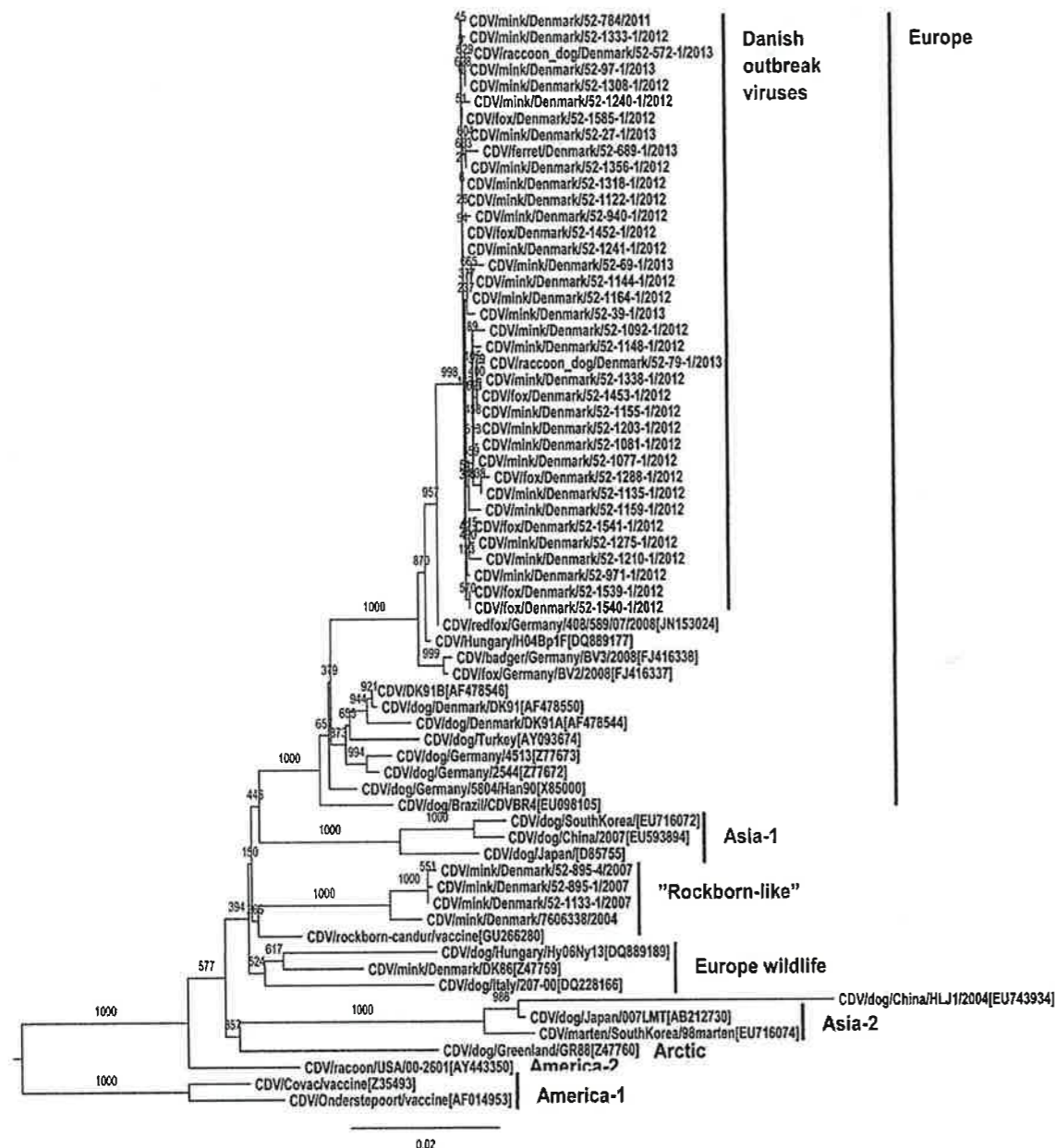
Figur 1. Tidsskala for hvalpesygeudbrud i Danmark 2011-2013

Diagrammet viser hvalpesygeudbrud baseret på antallet af positive prøver undersøgt på Veterinærinstituttet (DTU) i perioden 2011-2013. Opgjort pr måned og opdelt i mink, ræv og andre vilde dyr prøver.

### Fylogenetisk analyse

Den fylogenetiske analyse viste, at virus fra det danske udbrud ligner den europæiske hvalpesygevirus (figur 2), og undersøgelsen bekræftede også, at virus fra de indsamlede ræve, mårhunde og ilder var identisk med udbrudsvirus fra danske mink. Et interessant fund var, at hvalpesygevirus fra

mink i 2011 også var næsten identisk med 2012/13 viruset. I modsætning hertil var virus isoleret fra udbruddene i 2004 og 2007 grupperet for sig selv sammen med Rockborn stamme, som er en vaccine-stamme (Hoechst Roussel Vet GmbH).



Figur 2. Fylogenetisk træ for H-genet af hvalpesygevirus. Fylogenetisk træ baseret på nukleotidsekvenserne af H-genet (position 1-1824) fra udbruds hvalpesygevirus og referencevirus repræsenterende de forskellige geografiske stammer af hvalpesygevirus.

**Diskussion**

Efter år med få eller ingen tilfælde af hvalpesyge i danske minkfarme var der tre CDV tilfælde i efteråret 2011, hvilket var forløber for et større udbrud med start i sensommeren 2012, og som fortsatte ind i 2013. I og mellem udbruddet i 2011 og

2012 har minkavlere og jægere observeret talrige syge og døde ræve i de samme geografiske områder, hvilket tyder på, at virusset har været vedligeholdt i den vilde fauna.

**Molekylær epidemiologisk analyse.**

Denne undersøgelse anvendte en molekylær epidemiologisk fremgangsmåde med henblik på at afsløre oprindelsen og epidemiologien af det omfattende hvalpesygeudbrud. Dette blev gjort ved sekventering af det gen, der koder for overfladeprotein hægglutinin (H). H-generne fra de smittede minkfarme var næsten identiske, hvilket indikerer, at det var samme virusstamme der var ansvarlig for udbruddene i de forskellige minkfarme.

Yderligere viste det sig, at H-gensekvenserne fra de undersøgte vilde dyr var identisk med fundene i mink. Resultaterne indikerer, at det var samme virus, der spredtes til minkfarme og mellem opdrættede mink og den vilde fauna og vice versa. Det var ikke muligt at afgøre, om en given farm fik smitten direkte fra vilde dyr eller gennem indkøb af subklinisk inficerede dyr, men da flytning af dyr mellem farme var sjældne, var det mest sandsynligt, at den vilde fauna var ansvarlig for de fleste af udbruddene (figur 3).

Tidligere undersøgelser har vist anvendeligheden af denne molekylære epidemiologiske tilgang med sekventering af H-genet til at vurdere spredningen af hvalpesyge (Cha *et al*, 2012; Guo *et al*, 2013; Tan *et al*, 2011). Fylogenetiske analyser af H-genet har afsløret tilstedeværelsen af 8 store geografiske genotyper: Europa, Europa vilde fauna, Amerika -1 (vaccine), Amerika-2, Arktis, Asien-1 og Asien-2 (Zhao *et al*, 2010; Frölich *et al*, 2000; Martella *et al*, 2006). Alle de danske isolater fra mink, ræve og mårhund tilhører den europæiske genotype.

**Sammenhæng med tidligere udbrud.**

Prøverne fra 2004 og 2007 havde meget identiske H-gener, men var klart forskellige fra 2011 og 2012 udbruddet. Isolaterne fra

2004 og 2007 lignede Rockborn stammen – en vaccinevirusstamme, der tidligere har vist sig at være i stand til at fremkalde klinisk sygdom (Martella *et al*, 2011). Et tidligere studium fra 2011 har vist, at selvom den oprindelige vaccine blev trukket tilbage fra markedet i 1990'erne, indeholder nyere vacciner en Rockborn-lignende virus (Martella *et al*, 2011). Ingen af disse vacciner har været godkendt i Danmark, men det er uklart, om virus fra 2004 og 2007 var vildtype virus eller vaccinevirus der havde spredt sig fra Tyskland eller andre nabolande.

**Oprindelse af virus**

Virus fra 2011 lignede 2012 virusstammen med kun ét nukleotid til forskel. Dette antyder kraftigt en sammenhæng mellem udbrud i 2011 og 2012/2013.

Virus kan overleve i et reservoir i den vilde fauna, i miljøet eller eventuelt i subkliniske inficerede dyr. En minkfarm havde hvalpesygesmitte 2 gange med et interval på 2,5 måneder med identiske virus, hvilket kunne tyde på mulig overlevelse i miljøet eller subklinisk infektion.

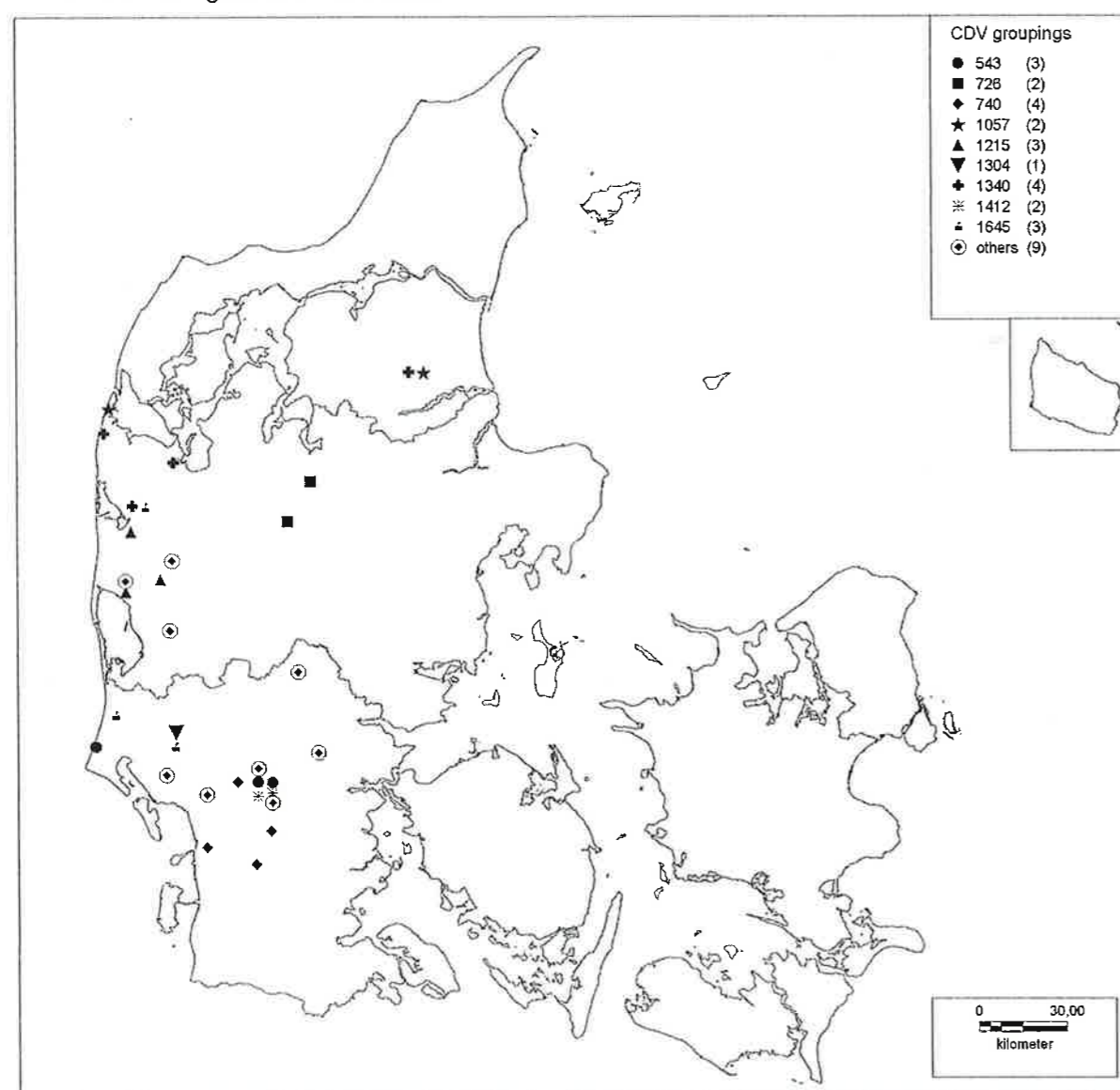
Den mest plausible forklaring, baseret på sekvensdata, er imidlertid hypotesen om et reservoir i den vilde fauna. Således blev den første hvalpesygesmittede ræv fundet død i marts 2012, hvilket var fire måneder før, det første mink tilfælde blev diagnosticeret i juli. Dette understøttes yderligere af den konstatering, at ræv- og minkvirus var næsten identiske.

Det har i Tyskland tidligere været påvist, at hvalpesygevirus cirkulerer i bestanden af røde ræve i delstaten Sachsen-Anhalt, og beregninger viste, at hvalpesyge findes i 30,5% af rævene (Denzin *et al*, 2013). Denne undersøgelse af materiale fra 2011 - 2013 bekræftede, at virus var 99,62 -

99,95% identisk med en virus, isoleret fra en rød ræv i Tyskland i 2008. Således kan denne virusstamme have cirkuleret ubemærket i den vilde fauna i Tyskland og/eller Danmark siden 2008, før den blev isoleret fra en dansk minkfarm i 2011. Minkavlere beretter at have observeret vilde ræve fou-ragere på farmområdet efter at have passeret hegnet. Andre dyrearter kan også forcere hegnet, hvorfor disse ikke kan udelukkes som mulige reservoirtværter.

#### Geografisk sammenhæng.

De få nukleotid forskelle i de analyserede isolater viste, at der er en geografisk sammenhæng mellem udbruddene, og at det skyldes en enkelt nyintroduktion i Danmark. Dette understøtter teorien om, at der findes et reservoir i den vilde fauna, da dyr inden for samme område vil have tæt kontakt og lever i et begrænset geografisk område.



Figur 3. Geografisk spredning af nukleotidsekvenserne grupperet på basis af H-genet. Kort over Jylland med geografisk placering af hvalpesyge-grupper baseret på nukleotidsekvensen af H-genet.

#### Overførsel af smitte til fostre.

Fostre fra en ilder var smittet med hvalpesygevirus og viser, at virus kan overføres direkte fra moder til fostre. Overførsel til fostre er tidligere vist hos hunde (Krakowka *et al*, 1977, Krakowka *et al*, 1974), men har ikke tidligere været rapporteret hos vilde dyr. Betydningen af dette for vedligeholdelse af virus i en population er ukendt.

#### Hvalpesygevirus i lopper.

Fund af hvalpesygevirus i lopper eller andre insekter fra inficerede mink er ikke tidligere beskrevet. Det er uklart, om disse insekter spiller en aktiv rolle for overførsel af virus mellem mink under farmbetingelser, eller mellem mink og vilde dyr på minkfarme, men da lopper er kendt for at springe fra en art til en anden, er det en realistisk mulighed, som undersøges i kommende forskningsprojekter

#### Konklusion

Det massive udbrud af hvalpesyge på danske minkfarme i 2011, 2012 og 2103 var forårsaget af en virusstamme, som hører til den europæiske genotype. Det var samme virus, der blev påvist i mink som i ræv, mårhund og ilder. De omfattende molekylære studier kan ikke definitivt afgøre, om udbruddet startede i det vilde reservoir og derefter spredt sig til mink, eller om det var det modsatte. Undersøgelsen viste endvidere, at lopper kan være en mulig vektor for spredning af hvalpesygevirus. Resultaterne af undersøgelsen giver værdifuld ny indsigt i epidemiologien for denne betydningsfulde og tabsgivende virus og understreger vigtigheden af at opretholde en effektiv smittebeskyttelse af minkfarmen for at undgå introduktion af smitte.

#### Anderkendelse

En stor tak skal lyde til Anne Bertelsen, København Diagnostik, for at lave oversigtskortet. Endvidere skal Naturstyrelsen

takkes for finansiering af faldvildtundersøgelserne i Danmark. København Diagnostik takkes for finansiering af denne undersøgelse.

For læsere med yderligere interesse for dette studie, skal der henvises til Trebbien, R., Chriel, M., Struve, T., Hjulsager, C.K., Larsen, G., Larsen, L.E., (2013) Wildlife reservoirs of canine distemper virus resulted in a major outbreak in Danish farmed mink (*Neovison vison*). PLOS ONE 10.1371/journal.pone.0085598

#### Referencer

Appel MJG, Summers BA 1995. Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. *Veterinary Microbiology* 44: 187-191.

Cha SY, Kim EJ, Kang M, Jang SH, Lee HB, Jang HK (2012) Epidemiology of canine distemper virus in wild raccoon dogs (*Nyctereutes procyonoides*) from South Korea. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 35: 497-504.

Denzin N, Herwig V, van der Grinten E (2013) Occurrence and geographical distribution of Canine Distemper Virus infection in red foxes (*Vulpes vulpes*) of Saxony-Anhalt, Germany. *Veterinary Microbiology* 162: 214-218.

Frölich K, Czupalla O, Haas L, Hentschke J, Dedek J, Fickel J+ (2000) Epizootiological investigations of canine distemper virus in free-ranging carnivores from Germany. *Veterinary Microbiology* 74: 283-292.

Guo L, Yang Sl, Wang Cd, Hou R, Chen Sj, Yang Xn, Liu J, Pan Hb, Hao Zx, Zhang Ml, Cao Sj, Yan Qg (2013) Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from giant panda and raccoon dogs in China. *Virology*

Journal 10: 109. 10.1186/1743-422X-10-109.

Krakowka S, Hoover EA, Koestner A, Ketring K (1977) Experimental and naturally occurring transplacental transmission of canine distemper virus. *Am J Vet Res* 38: 919-922.

Krakowka S, Confer A, Koestner A (1974) Evidence for transplacental transmission of canine distemper virus: two case reports. *Am J Vet Res* 35: 1251-1253.

Martella V, Cirone F, Elia G, Lorusso E, Decaro N, Campolo M, Desario C, Lucente MS, Bellacicco AL, Blixenkrone-Møller M, Carmichael LE, Buonavoglia C (2006) Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. *Veterinary Microbiology* 116: 301-309.

Martella V, Blixenkrone-Møller M, Elia G, Lucente MS, Cirone F, Decaro N, Nielsen L, Bányai K, Carmichael LE, Buonavoglia C (2011) Lights and shades on an historical vaccine canine distemper virus, the Rock-born strain. *Vaccine* 29: 1222-1227.

Von Messling V, Zimmer G, Herrler G, Haas L, Cattaneo R (2001) The Hemagglutinin of Canine Distemper Virus Determines Tropism and Cytopathogenicity. *Journal of Virology* 75: 6418-6427.

Sekulin K, Hafner-Marx A, Kolodziejek J, Janik D, Schmidt P, Nowotny N (2011) Emergence of canine distemper in Bavarian wildlife associated with a specific amino acid exchange in the haemagglutinin protein. *The Veterinary Journal* 187: 399-401.

Tan B, Wen YJ, Wang FX, Zhang SQ, Wang XD, Hu JX, Shi XC, Yang BC, Chen LZ, Cheng SP, Wu H (2011) Pathogenesis and phylogenetic analyses of canine distemper virus strain ZJ7 isolate from domestic dogs in China. *Virology Journal* 8: 520. 10.1186/1743-422X-8-520.

Zhao JJ, Yan XJ, Chai XL, Martella V, Luo GL, Zhang HL, Gao H, Liu YX, Bai X, Zhang L, Chen T, Xu L, Zhao CF, Wang FX, Shao XQ, Wu W, Cheng SP (2010) Phylogenetic analysis of the haemagglutinin gene of canine distemper virus strains detected from breeding foxes, raccoon dogs and minks in China. *Veterinary Microbiology* 140: 34-42.