

Technical University of Denmark



## Morfologisk og molekylær karakterisering af en eimeriaart fra danske mink

**Petersen, Heidi Huus; Chriél, Mariann; Hansen, Mette Sif; Yang, Rongchang ; Ryan, Una M.**

*Published in:*  
Faglig Årsberetning

*Publication date:*  
2017

*Document Version*  
Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link back to DTU Orbit](#)

*Citation (APA):*  
Petersen, H. H., Chriél, M., Hansen, M. S., Yang, R., & Ryan, U. M. (2017). Morfologisk og molekylær karakterisering af en eimeriaart fra danske mink. Faglig Årsberetning, 2017, 99-101.

## DTU Library

Technical Information Center of Denmark

---

### 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.



## Sundhed

# MORFOLOGISK OG MOLEKYLÆR KARAKTERISERING AF EN EIMERIA-ART FRA DANSKE MINK

Af Heidi Huus Petersen, Mariann Chriel & Mette Sif Hansen, Sektion for Diagnostik og Rådgivning, Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet, Kemitorvet, 2800 Kgs. Lyngby, Danmark. Rongchang Yang & Una M. Ryan, School of Veterinary and Life Sciences, Murdoch University, Murdoch, Western Australia, 6150, Australia

### Sammendrag

I perioden april til oktober 2016, blev fæces fra mink (*Neovison vison*) på 30 danske minkgårde undersøgt med henblik på at fastlægge forekomsten og arterne af *Eimeria* hos danske mink (*Neovison vison*). På basis af morfologisk undersøgelse af sporulerede oocyster, blev oocyster som lignede tidligere beskrevet art, kaldet *E. vison* identificeret. Den fundne art var dog en smule mindre end *E. vison*. Efterfølgende blev oocysterne forsøgt identificeret molekylært og sammenlignet med sekvenser i Genbank. Desværre var der ikke tilgængelige mink sekvenser i GenBank, og den nyligt fundne *Eimeria* art kaldes derfor for *Eimeria vison*-like. I alt fandtes 2,6% (108/4.141) af de undersøgte fæcesprøver positive for *E. vison*-like oocyster ved mikroskopi, svarende til at 23,9% (78 mink) af minkene udskilte *E. vison*-like oocyster mindst én gang i undersøgelsesperioden.

**Petersen, H. H., Yang, R., Chriel, M., Hansen, M.S., Ryan, U.M., 2018**

Morfologisk og molekylær karakterisering af en *Eimeria*-art i danske mink. Faglig årsberetning 2017, 99-101. København Forskning, Agro Food Park 15, DK-8200, Aarhus N, Danmark

### Abstract

A survey was conducted on 30 Danish mink farms to determine the prevalence and species of *Eimeria* in Danish farmed mink (*Neovison vison*) from April to October 2016. Morphological analysis of sporulated oocysts revealed that they resemble the species *Eimeria vison*. However, the newly identified specie is a bit smaller than *E. vison*. Afterwards, the new oocyst where molecularly analysed, and compared with sequences available in Genbank. Unfortunately, mink-derived sequences were not available from GenBank and the novel identified species is named *E. vison*-like. A total of 2.6% mink samples (108/4,141) were positive for *E. vison*-like oocysts by microscopy, equalling 78 (23.9%) mink excreting oocysts at least once during the study period.

**Petersen, H. H., Yang, R., Chriel, M., Hansen, M.S., Ryan, U.M., 2018**

Morphological and molecular characterization of an *Eimeria*-species isolates from Danish mink. Faglig års-

beretning Annual report 2017, 99-101. Copenhagen Research, Agro Food Park 15, DK-8200, Aarhus N, Denmark

**Keywords:** Mink; *Neovison vison*; *Eimeria* 18S rRNA; Morfologi; Genetisk karakterisering; Cytochrome c oxidase subunit I (COI) gen; Fylogoni

### Indledning

*Eimeria* (Coccidia: Eimeriidae) er en encellet parasit som overføres mellem dyr via fækal-oral ruten. Infektion kan medføre tarmlidelsen coccidiose, både hos mink samt mange andre dyrearter (Tenter et al. 2002). Kliniske tegn på coccidiose hos mårfamilien (*Mustelidae*) omfatter diarré, dehydrering, svaghed, sløvhed og vægttab. Endvidere er høj sygelighed og dødelighed rapporteret i forbindelse med coccidiose (Sledge et al. 2011). Dog er information om konsekvensen af *Eimeria*-infektioner i farmede mink mangelfuld, selvom forekomsten på danske minkgårde er forholdsvis høj (Petersen et al. Ikke offentliggjort).

Hos mårfamilien er 16 *Eimeria*-arter identificeret og registreret i coccidian-databasen (Duszynski et al. 2000), hvoraf fire arter er isoleret fra mink; *E. furonis* (Hoare 1927), *E. hiepei* (Gräfnér et al. 1967), *E. mustelae* (Kingscote 1934) og *E. vison* (McTaggart 1960; Hindsbo et al. 1995). *Eimeria furonis* (Abe et al. 2008) er som den eneste til dato blevet molekylært karakteriseret fra både ilder og mink, mens de resterende tre *Eimeria*-arter kun er identificeret baseret på oocyst (det infektiøse stadium, udskilt med fæces) morfologi. I den foreliggende undersøgelse rapporterer vi den morfologiske og molekylære karakterisering af en *Eimeria* art fundet i danske mink.

### Materialer og metode

#### Prøveudtagning og undersøgelse

Forekomsten og karakteriseringen af coccidie-oocyster i danske mink, blev undersøgt på 30 danske minkgårde hver 7.-30. dag fra april til oktober 2016. Fra hver gård blev der indsamlet prøver fra de samme 5 tilfældigt udvalgte hunner og en pool fra hvalpe fra hver hun (n = 335 mink), i alt 4.141 fæcesprøver. De 30 gårde blev udvalgt ud fra hvor de modtog minkfoder fra: 10 gårde fra Sydjylland (gård A-J), 10 fra Sjælland (gård K-T) og 10 fra Vestjylland (gård U-AB). Alle fæcesprøver blev scoret efter konsi-



stens (1: hård; 2: blød og fugtig, fast form; 3: blød og fugtig, med tekstur uden fast form; 4: blød med tekstur uden fast stof 5: vandig, uden tekstur) efter Hansen et al. (2016). Alle prøver blev herefter undersøgt for tilstedeværelsen og mængden af u-sporulerede oocyster ved modificeret McMaster-teknik (Roepstorff og Nansen, 1998). Tre prøver med høj oocyst-udskillelse blev benyttet til molekylær- og morfologisk karakterisering af oocysterne.

### Morfologisk karakterisering

Fæces blev anbragt i 2% (w/v) kaliumdichromatopløsning ( $K_2Cr_2O_7$ ) og opbevaret ved stuetemperatur i mørke for at fremprovokere sporulering af oocysterne. Oocysterne blev undersøgt for sporulering hver 2. dag. De sporulerede oocyster blev identificeret med et Leica DMR lysmikroskop, og billeder blev taget ved anvendelse af differential-interferenskontrast (DIC) -mikroskopi med et 100 x immersion.

FIGUR 1 NOMARSKI INTERFERENS-KONTRAST FOTOMIKROGRAFI AF EIMERIA VISON-LIKE OOCYSTER. SKALA: 20  $\mu$ M



Sporocyst residuum var til stede, sammensat af talrige granuler i en ovoid masse. Morfologisk ligner denne identificerede *Eimeria* isolat den tidligere beskrevne *E. vison* (Levine, 1948), som oprindeligt blev identificeret fra færmink (*Neovison vison*).

Fra 18S rRNA locus blev en sekvens på 1,221 bp isoleret og sammenlignet med sekvenser i Genbank. Fra COI blev en sekvens på 718 bp isoleret og ligeledes sammenlignet med sekvenser i Genbank. Desværre var der ingen sekvenser fra hverken 18S eller COI locus fra *E. vison* i Genbank til sammenligning.

Af de 4.141 undersøgte fæcesprøver var 108 positive (2,6%, 2,1-3,1% 95 Ci) for *E. vison*-lignende oocyster. Ud af de 335 undersøgte mink, havde 78 (23,9%) mink mindst én positive prøve. Der var ingen forskel i antal positive hunner og hvalpe (Hvalpe = 26,8%, hunner = 21,4%). Antallet af *E. vison*-lignende positive prøver per gård varierede fra 0 til 11,6% positive prøver (tabel 1). På de Sjællandske gårde var (gård K-T) prævalensen af *E. vison*-lignende positive prøver (5,68%) signifikant ( $p < 0,0001$ ) højere end på gårde beliggende i Sydjylland (1,75%) (gård A-J) og Vestjylland (0,46%) (gård U-AB), hvorimod prævalensen af *E. vison*-lignende positive prøver på gårde fra Vest- og Sydjylland ( $p = 0,111$ ) var sammenlignelige.

### Molekylær karakterisering af Eimeria oocysterne

DNA blev ekstraheret fra oocysterne via Power Soil DNA Kit (Mo Bio Laboratories, Carlsbad, Californien) og et partielt 18S fragment og cytokrom c-oxidase subunit I (COI) gensekvenser blev genereret (Yang et al. 2016). Alle PCR-produkter blev sekventeret og sammenlignet med sekvenser i Genbank.

### Resultater

#### Prævalens og morfologisk analyse

De fundne oocyster sporulerede på 5-6 dage og kun en morfotype af de sporulerede oocyster blev identificeret. De sporulerede oocyster var ellipsoformet med en glat og tyk to-lags oocystvæg på 1,4  $\mu$ m (1,3-1,6  $\mu$ m). Oocysterne målte 21,0 x 13,8  $\mu$ m (19,9-22,9  $\mu$ m x 13,0-14,4  $\mu$ m) med et længde/bredde (L/W) på 1,5. Oocyst-mikropyle og residuum var fraværende, mens polære granula var til stede. Oocysterne indeholdt to ovoide sporocyster, der målte 8,3 x 6,4  $\mu$ m (6,6-9,9  $\mu$ m x 5,5-6,9  $\mu$ m) med et sporocyst L/W-forhold på 1,3 (1,0-1,6). Hver sporocyst indeholdt 2 sporozitter (Figur 1).

### Diskussion og konklusion

Dette er den første rapport om den morfologiske og molekylære karakterisering af en *Eimeria*-art i opdrættede danske mink (*Neovison vison*). Den *Eimeria* art vi karakteriserer i denne undersøgelse minder om *E. vison* (Levine, 1948), dog er den lidt mindre end den tidligere beskrevne *E. vison* (Levine, 1948). Da *E. vison* ikke er blevet molekylær karakteriseret kan vi ikke sammenligne isolaterne fundet i 2016 fra dansk mink med tidligere beskrevet *E. vison*. Dog er de tre andre tidligere beskrevne *Eimeria* arter fra mink, morfologisk forskellige fra *E. vison*-lignende og kan derfor udelukkes. *Eimeria* arten fundet i dette studie vil fremadrettet blive kaldt for *E. vison*-like.

I denne undersøgelse blev *E. vison*-like oocyster påvist i 2,6% (varierede fra 0,0-11,6%) af 4.141 fæcesprøver indsamlet fra i alt 335 mink på 30 danske minkgårde. Prævalensen var ikke sammenfaldende med minkens alder (voksen vs hvalp), hvorimod gårdens placering har betydning for prævalensen; Mink på de Sjællandske gårde havde signifikant ( $p < 0,0001$ ) højere prævalens end mink på gårde i Jylland, mens gårde i Syd- og Vestjylland havde sammenlignelig forekomst ( $p = 0,111$ ). Kun få tidligere studier har undersøgt forekomsten af *Eimeria* sp. i danske mink (Hindsbo et al. 1995; Hammer et al. 2004; Chriél et al. 2013) og umiddelbart er det kun Hindsbo et al. (1995) der har rapporteret forekomsten (6,4%) af *E. vison* i danske mink.

Yderligere karakterisering af *Eimeria*-arter fra mink er nødvendig med anvendelse af en kombination af morfologiske, biologiske og molekylære teknikker.

Formålet med at kunne identificere de forskellige *Eimeria* arter hos mink er at kende den enkelte arts patogeniteten. Hos alle andre dyrearter, har nogle *Eimeria* arter stor betydning og medfører symptomer som diarré, mens andre arter kan forekomme i stort antal uden eller med få symptomer og derfor ikke er behandlingskrævende. Ved at kunne skelne mellem patogene og ubetydelige arter, kan vi være med til at nedsætte medicinforbruget hos mink.

### Tak

Dette projekt blev finansieret af Pelsdyrafgiftsfonden 2016 ([www.pelsdyrafgiftsfonden.dk/media/167031/vedt\\_20-04-12.pdf](http://www.pelsdyrafgiftsfonden.dk/media/167031/vedt_20-04-12.pdf)).

Vi takker de deltagende minkgårde for deres støtte og trofaste indsamling og indsendelse af fæcesprøver. Stor tak til laboranterne Boi Tien Thi Pharm og Aleksandra Tofteby for dygtig teknisk assistance med at analysere fæcesprøverne.

### Referencer

- Abe N, Tanoue T, Ohta G, Iseki M (2008) First record of *Eimeria furonis* infection in a ferret, Japan, with notes on the usefulness of partial small subunit ribosomal RNA gene sequencing analysis for discriminating among *Eimeria* species. *Parasitol Res* 103:967-970. doi: 10.1007/s00436-008-1037-x
- Chriél M, Hansen MS, Holm E, et al (2013) Rystemink. Faglig årsberetning by København Fur 117-120.
- Duszynski DW, Couch L, Upton SJ (2000) Coccidia of the world. <http://www.k-state.edu/parasitology/worldcoccidia/CARNIV2/> Accessed 19 Sep 2017
- Gräfner G, Graubmann HD, Dobbriner W (1967) Hepatic coccidiosis in minks (*Lutreola vison* Schreb.) caused by a newly identified species of coccidia (*Eimeria hiepei* n. sp.). *Monatsh Veterinarmed* 22:696-700.
- Hammer AS, Andersen TH, Dietz HH (2004) Forekomsten af coccidier i danske farm mink indsendt til diagnostiske undersøgelser. *København Fur, Faglig årsberetning* 223-228.

Hansen S, Krarup LI, Hammer AS (2016) Er det diarré? *Dansk Veterinærtidsskrift* 10:33-35.

Hindsbo O, Andreassen J, Nielsen F, Lodal J (1995) Occurrence of the coccidia *Isospora laidlawi* and *Eimeria vison* in Danish farm mink, 1987-1993; age related resistance to the infection. *Scientifur* 19:231-237.

Hoare CA (1927) On the Coccidia of the Ferret. *Ann Trop Med Parasitol* 21:313-320. doi: 10.1080/00034983.1927.11684540

Kingscote AA (1934) *Eimeria mustelae*, n. sp. from *Mustela vison*. *J Parasitol* 20:252-253.

Levine ND (1948) *Eimeria* and *Isospora* of the mink (*Mustela vison*). *J Parasitol* 34:486-492.

McTaggart HS (1960) Coccidia from Mink in Britain. *J Parasitol* 46:201-205. doi: 10.2307/3275170

Roepstorff A, Nansen P (1998) Epidemiology, diagnosis and control of helminth parasites of swine. *FAO animal health manual*, Rome

Sledge DG, Bolin SR, Lim A, et al (2011) Outbreaks of severe enteric disease associated with *Eimeria furonis* infection in ferrets (*Mustela putorius furo*) of 3 densely populated groups. *J Am Vet Med Assoc* 239:1584-1588. doi: 10.2460/javma.239.12.1584

Tenter AM, Barta JR, Beveridge I, et al (2002) The conceptual basis for a new classification of the coccidia. *Int J Parasitol* 32:595-616. doi: 10.1016/S0020-7519(02)00021-8

Yang R, Brice B, Ryan U (2016) Morphological and molecular characterization of *Eimeria purpleicephali* n. sp. (*Apicomplexa: Eimeriidae*) in a red-capped parrot (*Purpureicephalus spurius*, Kuhl, 1820) in Western Australia. *Int J Parasitol Parasites Wildl* 5:34-39. doi: 10.1016/J.IJP-PAW.2016.01.003. \*