Mund- og klovesyge - et

Mund- og klovesyge (MKS) forekommer stadig i mange lande på verdensplan. Effektiv kontrol kræver derfor kendskab til de cirkulerende MKS-virus stammer. For nylig er der beskrevet en metode, som gør det muligt at inaktivere virus og præservere virus RNA genomet i forbindelse med udtagning af prøver for derefter at »gendanne« infektiøst virus fra disse prøver og foretage en detaljeret analyse i laboratoriet

Sammendrag
Mund- og klovesyge (MKS) forekommer stadig i mange lande på verdensplan. I lande som normalt er fri for sygdommen, er der således stadig en ikke ubetydelig risiko for introduktion af sygdommen, hvilket vil resultere i blandt andet tab af eksport samt meget store udgifter til sygdomsbekæmpelse. Effektiv kontrol af sygdommen kræver kendskab til de cirkulerende MKS virusstammer. For nylig er der beskrevet en metode, som gør det muligt at inaktivere virus og præservere virus RNA genomet i forbindelse med udtagning af prøver for derefter at »gendanne« infektiøst virus fra disse prøver og foretage en detaljeret analyse i laboratoriet. Denne procedure gør det lettere at sende prøver fra for eksempel Pakistan eller Afrika, hvor MKS er almindeligt forekommende, til højt kvalificerede laboratorier i f.eks. England eller Danmark og gør det derved muligt, at samle mere information om de virusstammer som cirkulerer, hvilket er afgørende for kontrol af sygdommen.

ANETTE BØTNER[1] & GRAHAM J. BELSHAM[2]
[1]SEKTIONSLEDER • DYRLÆGE • PH.D.
[2]PROFESSOR • PH.D. • D.SC.
DTU VETERINÆRINSTITUTTET • LINDHOLM

Mund- og klovesyge (MKS) er fortsat en af verdens økonomisk mest betydende sygdomme hos husdyr (kvæg, grise, får og geder). MKS skyldes infektion med MKS-virus (MKSV), der for mere end 100 år siden blev identificeret, som det første virus fra dyr. Det har i flere områder i verden vist sig muligt at kontrollere MKS. Således blev MKS i anden halvdel af det 20. århundrede udryddet fra Vesteuropa ved en kombination af vaccination og stringente kontrolforanstaltninger - inklusive nedslagning af inficerede besætninger.

Vaccination mod MKS er ikke tilladt i EU undtagen i forbindelse med udbrud af sygdommen. Af og til forekommer der udbrud af MKS i lande, som normalt er fri for sygdommen. Fx var der i 2000 udbrud af MKS i Japan for første gang i mange år og derefter endnu et udbrud i 2010. Tilsvarende, har der været udbrud af MKS i Storbritannien i både 2001 og 2007.

Spredning til Europa

Selvom Europa nu normalt er fri for MKS, er der en konstant risiko for introduktion fra både nærliggende lande (fx har Tyrkiet mange tilfælde af sygdommen) og fra fjernere liggende lande. Introduktionen af MKS til Storbritannien i 2001 kom fra en ukendt kilde og uden forekomst af MKS i andre lande i Europa på tidspunktet for introduktionen. Sygdommen spredte sig imidlertid fra Storbritannien til Irland, Frankrig og Holland ved transport af dyr, før sygdommen blev diagnosticeret i England. Udbruddet i Storbritannien er vurderet til at have kostet omkring 8.000.000.000 US$, hvilket inkluderer både direkte udgifter samt indirekte udgifter i forbindelse med kontrol af sygdommen, inklusive slagtning af flere millioner husdyr, tab af handel med dyr og kød samt tab af indtægter fra turisme på grund af begrænsninger i adgangen til landbrugs-/naturområder. Yderligere udbrud af sygdommen forekom i Storbritannien i 2007 som resultat af udslip af virus fra »Pirbright«, der er et fælles laboratorieområde for forskningsinstitutionen »Institute for Animal Health« og Merial's MKS vacciproduktionsenhed. Begge faciliteter arbejdede med den specifikke MKSV stamme, som slap ud.

I 2011 har der været et nyt udbrud af MKS i Europa, denne gang i Bulgarien. Det første tilfælde blev konstateret i et vildsvin, som var blevet skudt nær ved grænsen til Tyrkiet. Efterfølgende blev der konstateret 11 udbrud i husdyr (kvæg, får, geder og bøfler) i området. Der er endvidere ved efterfølgende serologisk overvågning blevet påvist antistoffer mod MKSV i enkelte vildsvin og rådyr i området.

Serotyper

MKS er endemisk forekommende i mange lande i Afrika, Mellemøsten, Asien og i dele af Sydamerika. Der kendes i alt syv forskellige serotyper af MKSV (A, O, C, SAT1, SAT2, SAT3 og Asia-1), og infektion eller vaccination med én serotype giver ikke beskyttelse mod de andre serotyper. Sero-

fælles globalt problem

type O er globalt set den hyppigst forekommende, og serotype A er også vidt udbredt.

Serotype C har ikke været rapporteret fra nogen steder i verden i de senere år. SAT (Southern African Territories) serotyperne påvises normalt kun i Afrika, og som det kan forventes, påvises Asia -1 normalt kun i Asien, men denne serotype er desuden påvist så langt vestpå som i Grækenland. MKSV ændrer sig hurtigt. Omkring 0,5-1,0 % af virus nukleotidsekvensen ændres hvert år, og dette kan forårsage en væsentlig diversitet mellem de vira, der cirkulerer i et område. Da nogle virusstammer, selv af samme serotype, således kan matche dårligt med en given vaccine, er det vigtigt at være i stand til at identificere den specifikke virusstamme, som forårsager et sygdomsudbrud. I nogle lande, som fx Pakistan og Uganda, vides det, at flere serotyper af MKSV cirkulerer.

Hurtig aktion

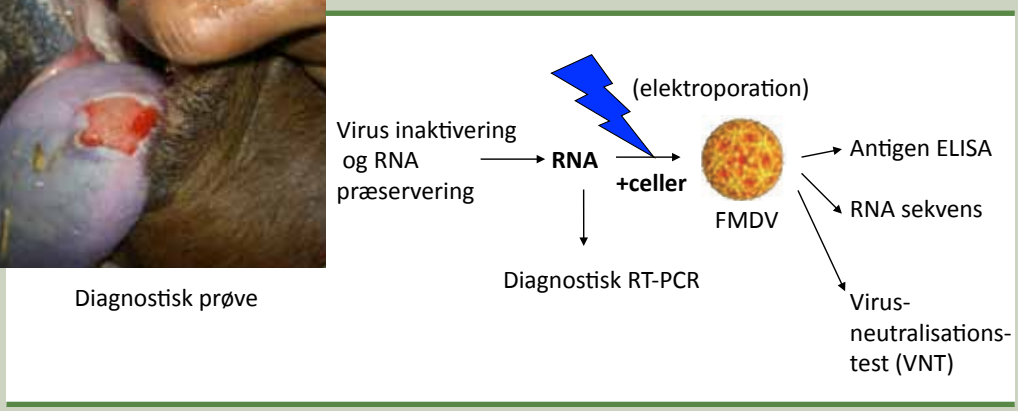
For effektivt at kontrollere sygdommen er det vigtigt hurtigt at identificere udbrud af sygdommen og at bestemme, hvilken serotype (og stamme) der er involveret med henblik på at anvende den korrekte vaccine. Imidlertid kan denne grad af laboratoriediagnostik være en udfordring, når der er ringe infrastruktur i de sygdomsramte områder. Diagnostiske prøver kan sendes til fx World Reference Laboratory (Pirbright, England) for at blive analyseret, men forsendelse af prøver, som indeholder infektiøst MKSV, er meget dyr og kræver omhyggelig behandling, opbevaring og indpakning af materialet. For at omgå dette problem, har vi inden for de seneste år udviklet et system, som muliggør præservering af virusprøver i en inaktiveret form. På den måde kan prøverne relativt enkelt sendes sikkert til et laboratorium, hvor følsomme og specialiserede diagnostiske undersøgelser kan udføres.

Når MKSV RNA genom påvises i en prøve har det nemlig vist sig muligt at »gendanne« (rescue) infektiøst MKSV fra den præserverede prøve, og virus kan dermed karakteriseres i detaljer. I en nylig publikation (Belsham et al., 2011) har vi beskrevet, hvorledes prøver, som er indsamlet og præserveret i Pakistan er undersøgt på Veterinærinstituttet (DTU-Vet) på Lindholm. Disse prøver blev ved hjælp af reverse transcription (RT)-PCR test vist at indeholde MKSV RNA-genom.

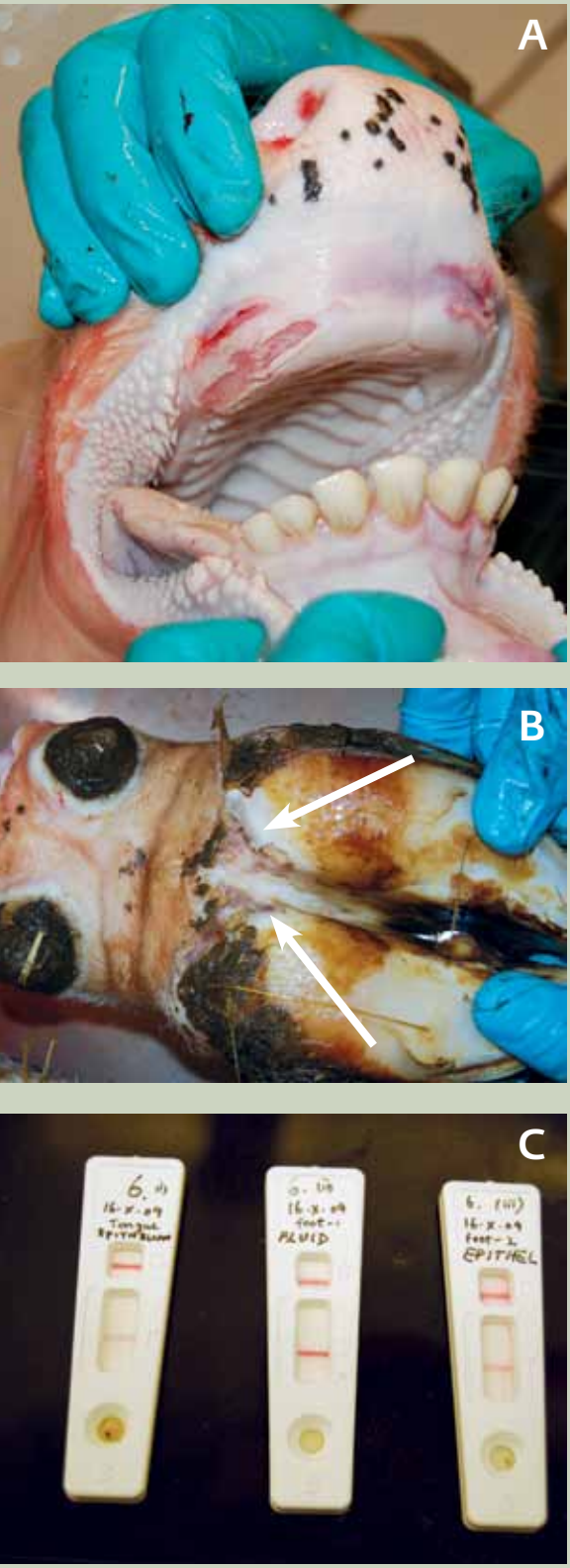
RNA fra disse prøver blev efterfølgende introduceret til celler, som er modtagelige for MKSV-infektion, og infektiøst virus blev »gendannet«. Virus af tre forskellige serotyper blev »gendannet« ved denne procedure. Disse virus er blevet karakteriseret på forskellig måde for at bestemme genomsekvenser samt de antigene egenskaber. Derudover har to af de »gendannede» vira været brugt til eksperimentelle infektioner i kvæg, og begge vira har vist sig at være højpatogene for dansk kvæg samt at være i stand til at spredes effektivt til kontaktdyr.

»Gendannelse« af infektiøst MKSV

MKSV har ligesom andre picornavirus et RNA genom, som består af ca. 8.500 nukleotider. Viruspartiklen består af en enkelt kopi af dette RNA-genom, som er indesluttet i en proteinskal (kapsid), som består af 60 kopier af fire forskellige strukturelle proteiner (VP1, VP2, VP3 and VP4). Kapsidet beskytter RNA-genomet, når det befinder sig uden for celler (fx ved spredning fra dyr til dyr), og derudover er det kapsidet, som binder sig til specifikke receptorer på overfladen af celler, hvilket muliggør, at virus kan komme ind i celler. Når virus er kommet ind i cellen, opløses kapsidet, og virus-RNA frigøres i cellens cytoplasma. RNA skal herefter translateres til protein, som er nødvendigt for at virusgenomet kan repliceres, og for at nye viruspartikler kan dannes. Denne translationsproces anvender cellens proteinsyntesemaskineri og er således ikke afhængig af >



Figur 1. Oversigt over »gendannelse« af virus ud fra RNA, der er oprenset fra diagnostiske prøver.



Figur 2.
A og B: Læsioner i mund og på klove af kalve efter eksperimentel infektion med »gendannet« MKS virus.
C: Påvisning af MKS-virus i epithel og vesikelvæske ved anvendelse af »Penside« test. Det øverste bånd er en positiv kontrol, mens det nederste bånd indikerer tilstedeværelse af MKS-virusantigen.

nogen MKSV proteiner. MKSV RNA-genomet er altså tilstrækkeligt til alene at igangsætte infektionscyklus. Dette betyder, at hvis virus-RNA introduceres ind i cytoplasmaet af modtagelige celler, vil virus' livscyklus begynde, og nye infektiøse viruspartikler vil blive dannet.

Med denne viden kunne det forventes, at præparationer af RNA fra epitelprøver udtaget fra MKSV-inficerede dyr skulle være i stand til at igangsætte infektion, når det bliver introduceret ind i modtagelige celler.

For at eftervise denne teori blev RNA oprenset fra en suspension af tungeepitel udtaget fra en kalv, som udviste kliniske symptomer forenelige med MKS efter eksperimentel podning med O-UKG/2001 MKSV (MKSV-isolat fra udbruddet i Storbritannien i 2001) under kontrollerede forhold i isolationsstaldene på Lindholm. Ved anvendelse af standarddiagnostiske tests viste det oprensede RNA sig at indeholde store mængder af MKSV-RNA. Dette materiale blev introduceret ind i baby hamster kidney (BHK) celler ved hjælp af elektroporation (i princippet en procedure, hvor cellerne gives et elektrisk chok for at skabe midlertidige huller i cellemembranen, hvorigennem det tilsatte RNA kan komme ind i cellerne). Disse celler blev efterfølgende sat til primære kalvethyroideaceller, som er meget modtagelige for MKSV og dermed anses for at være de bedste til isolation af MKSV, og disse celler blev inkuberet sammen.

Udvikling af cytopatogen effekt i cellerne indikerede succesfuld »virusgendannelse«. For at konfirmere dette blev cellerne testet for tilstedeværelse af MKSV-antigen/protein ved hjælp af serotypespecifik antigen-ELISA. Det blev vist, at cellerne indeholdt serotype O-MKSV, som formodet. Dette bekræftede at »virusgendannelse« havde fundet sted, idet ingen virusproteiner var blevet tilsat cellerne, men det var dannet gennem infektionsforløbet igangsat af MKSV-RNA.

For at undersøge om systemet kunne bruges til at analysere prøver indsamlet i lande, hvor MKS er endemisk forekommende, blev der foretaget analyse af prøver indsamlet i Pakistan og Afghanistan. Epitelprøver blev indsamlet fra tilfælde med mistanke om MKS, og prøverne blev præserveret i et kommercielt tilgængeligt reagens, som denaturer protein og dermed inaktiverer virus, men bibeholder integriteten af RNA-genom. Dette reagens muliggør forsendelse af prøver uden hensyntagen til omgivelsernes temperatur. Ved prøvernes ankomst til DTU-Vet på Lindholm, blev RNA oprenset fra prøverne og undersøgt for forekomst af MKSV-RNA ved kvantitativ RT-PCR test. Positive prøver blev yderligere undersøgt ved supplerende RT-PCR assays og PCR-produkterne blev efterfølgende analyseret ved nukleotid sekvensering. Disse resultater identificerede tilstedeværelsen af 3 forskellige serotyper af MKSV (O, A and Asia-1) i en samling af prøver fra disse lande. Udvalgte prøver blev introduceret ind i celler ved hjælp af elektroporation som beskrevet ovenfor. Infektiøst virus viste sig ved RT-PCR, og sekvensering at være »gendannet« fra ca. seks ud af 20 prøver og disse inkluderede repræsentanter for hver af de tre serotyper, som tidligere var identificeret ved sekvensanalysen. For at konfirmere tilstedeværelsen af forskellige serotyper af MKSV blev det »gendannede« virus analyseret i serotype specifikke antigen ELISA'er og disse identificerede prøverne som O, A eller Asia-1 i overensstemmelse med sekvensresultaterne (se Figur 1). Tilgængeligheden af levende virus øger markant muligheden for, og gør det væsentligt enklere at fuld-længde sekvensere genomet. Derudover gør tilgængelighed af levende virus det muligt at karakterisere de antigene egenskaber samt at foretage virus-neutralisationstest med anvendelse af definerede antisera rejst overfor specifikke vacciner Dette er en vigtig parameter når man skal bestemme anvendeligheden af tilgængelige vacciner i forbindelse med kontrol af en specifik virusstamme.

Patogenicitet af »gendannet« MKS-virus i kvæg

For at undersøge om det »gendannede« virus bevarede egenskaben til at inducere klinisk MKS, blev to af virus prøverne (O og Asia 1) podet på tyrekalve opstaldet i »high containment« isolationsstalde på Lindholm. Virus forårsagede tydelige kli-

niske symptomer på MKS i de podede dyr inklusive feber, savlen og udvikling af vesikler omkring mule, i næse, mund og på klove (Figur 2). Derudover spredte sygdommen sig hurtigt til kontaktkalve, hvilket indikerer, at det »gendannede« virus er højpatogent. Store mængder af virus kunne påvises i blodet få dage efter podning, men forsvandt i forbindelse med, at anti-MKSV-antistofferne kunne påvises.

I forbindelse med det eksperimentelle dyreforsøg afprøvede vi kommercielt tilgængelige hurtigtests (»penside« test, Svanova) til påvisning af MKSV (Figur 2c). Tydeligt positivt resultat blev opnået, når optimalt materiale som vesikelepitel eller vesikelvæske var tilgængeligt og udtaget under optimale betingelser. »Penside« tests anses ikke for velegnede til primær diagnostik af MKS, men kan eventuelt anvendes som en hurtig vurdering af suspekte tilfælde i risikobesætninger i forbindelse med allerede erkærede udbrud.

Konklusion

Den her beskrevne procedure viste sig at være nyttig til effektiv indsamling og præservering af MKSV-diagnostiske prøver med henblik på at foretage omfattende og detaljerede laboratorieanalyser. De udførte undersøgelser viste, at infektiøst virus kunne gendannes ud fra RNA, som var oprenset fra prøver indsamlet fra MKSV-inficerede dyr i Pakistan og Afghanistan, og at dette virus stadig var højpatogent for kvæg. Proceduren forventes at få betydning for karakterisering af cirkulerende virusstammer i endemisk inficerede områder, og dermed at være værdifuld for bestræbelserne på at kontrollere sygdommen.

Metoden kan således bidrage til at kontrollere MKS i lande, hvor sygdommen forekommer endemisk, ved at gøre det muligt i større omfang at analysere cirkulerende virusstammer, og dermed kunne optimere valget af den korrekte vaccine. Forhåbentlig kan dette bidrage til at bekæmpe MKS i disse lande og således bidrage til en fremadskridende proces for OIE/FAOs globale MKS bekæmpelsesprogram »Progressive Control Pathway«.

References

Belsham, GJ, Jamal, SM, Tjørnehøj, K & Bøtner, A. (2011) Rescue of foot-and-mouth disease viruses that are pathogenic for cattle from preserved viral RNA samples. PLoS ONE 6(1): e14621. doi:10.1371/journal.pone.0014621 ■