



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

Institutionen för biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap

# **Myxomavirus hos kaniner**

## Interaktion med immunsystemet

*Amanda Trolin*

*Uppsala  
2017*

*Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen*

*Delnummer i serien: 2017:79*



# Myxomavirus hos kaniner Interaktion med immunsystemet

## Myxoma virus in rabbits Interaction with the immune system

*Amanda Trolin*

**Handledare:** Magnus Åbrink och Caroline Fossum, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Examinator:** Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Omfattning:** 15 hp

**Nivå och fördjupning:** Grundnivå, G2E

**Kurstitel:** Självständigt arbete i veterinärmedicin

**Kurskod:** EX0700

**Program:** Veterinärprogrammet

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2017

**Serienamn:** Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen

**Delnummer i serie:** 2017:79

**Elektronisk publicering:** <http://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Myxomavirus, myxomatos, kanin, immunsystem

**Key words:** Myxoma virus, myxomatosis, rabbit, immune system

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning .....	1
Summary .....	2
Inledning.....	3
Material och metoder .....	3
Litteraturoversikt.....	4
Bakgrund till myxomaviruset .....	4
Myxomaviruset .....	4
Myxomatos .....	4
Historia och samevolution med värden.....	5
Smittspridning och patogenes .....	5
Kliniska symtom och diagnostisering.....	6
Interaktion med kaninens immunsystem .....	7
Antiviralt svar .....	7
Immunmodulerande proteiner.....	8
Interaktioner med immunsystemet.....	8
Resistens och immunitet.....	10
Utveckling av resistens hos europeiska kaninpopulationer .....	10
Utveckling av immunitet efter infektion.....	11
Diskussion .....	12
Slutsats.....	13
Litteraturförteckning .....	14



## SAMMANFATTNING

Myxomaviruset är ett poxvirus, vars genom utgörs av ett dubbelsträngat DNA och replikation sker i cytoplasman hos infekterade celler. Viruset infekterar framför allt kaniner, men det finns indikationer på att även celler från andra arter kan infekteras *in vitro*. Hos sina naturliga värdar, de amerikanska kaninerna, orsakar viruset en mild sjukdom. Den europeiska kaninen drabbas istället av myxomatos, vilket är en allvarlig sjukdom med systemisk spridning och hög mortalitetsgrad.

Med anledning av den höga mortalitetsgraden introducerades myxomaviruset i Australien och Europa under 1950-talet i syfte att kontrollera den vilda europeiska kaninpopulationen. Efter några år utvecklades en naturlig selektion för attenuerade virusstammar, vilken i sin tur medförde en naturlig selektion för genetiskt resistent kaninstammar. Samevolutionen med värden har resulterat i att myxomaviruset idag är en enzooti hos nuvarande kaninpopulationer. Syftet med den här litteraturstudien är att undersöka hur myxomaviruset interagerar med kaninens immunsystem och hur det undviker värdens immunsvaret vid infektion.

Smittspridning av myxomaviruset sker via direktkontakt och med bitande artropoder. Vid infektion av den europeiska kaninen sker initial replikation lokalt i huden innan spridning till dränerande lymfknutor. Där infekteras leukocyter, vilka sprider viruset till distala vävnader såsom hud och konjunktiva. Kliniska symtom ses främst i form av svullnader och lesioner på hud, konjunktiva och anogenitala organ. Kaninen dör efter 10-12 dagar och orsaken är ännu inte utredd. Hos de amerikanska kaninerna ses enbart ett kutant fibrom av benign karaktär.

Myxomaviruset uttrycker immunmodulerande proteiner som har stor betydelse för virusets framgång vid infektion av kaninen. Utvecklingen av dessa proteiner inträffade troligen i de amerikanska kaninerna, men analyser av proteinerna har främst gjorts i den europeiska kaninen. De virala proteinerna har förmåga att interagera med olika komponenter av värdens immunsystem och kan bland annat inhibera produktion av proinflammatoriska cytokiner, igenkänning av immunförsvaret och inducerad apoptos av infekterade celler. Andra proteiner kan binda kemokiner och reglera specifika signalvägar. Som resultat lyckas myxomaviruset manipulera den intracellulära och extracellulära miljön hos värden och underlättar därigenom sin egen replikation, spridning och överföring. Resistens kan idag ses hos framför allt vilda europeiska kaninpopulationer och tycks verka dämpande på sjukdomsutvecklingen snarare än på själva infektionen. Den genetiska bakgrunden är inte klarlagd, men ett ökat medfött immunsvaret tros kunna ha en betydande roll. Genomgången infektion betraktas resultera i en immunitet mot återinfektion.

Sammantaget har myxomaviruset utvecklat en mängd immunmodulerande proteiner som förklarar den framgångsrika infektionen av den europeiska kaninen, men interaktionen med den naturliga värden verkar vara ett relativt ostuderat område. Effekten av de virala proteinerna indikerar att ett cellmedierat immunsvaret troligen är det mest optimala mot infektionen. Mer forskning och jämförelser mellan olika kaninarter vore intressant och skulle kunna bidra till en ökad förståelse för myxomavirusets framtid inom olika kaninpopulationer.

## SUMMARY

The myxoma virus is a poxvirus, which contains a double-stranded DNA and replicates in the cytoplasm of the infected cells. The virus mainly infects rabbits, but is also able to replicate in cultured cells from other species. Infection of the natural hosts, rabbits from America, only causes a mild disease. The European rabbit, however, develops a serious disease called myxomatosis, which is characterised by systemic spread and a high mortality rate.

The effective infection of European rabbits led to the introduction of myxoma virus in Australia and Europe in the 1950s. The aim was to control the wild European rabbit population. Within a few years a selection for attenuated virus strains developed, which in turn caused a selection for rabbit strains with genetic resistance. This coevolution between the host and the virus has resulted in myxoma virus becoming enzootic in current rabbit populations. This literature study aims to investigate how the myxoma virus interacts with the immune system and how it avoids the immune response at the infection of rabbits.

Transmission of the myxoma virus occurs via direct contact and biting arthropods. In the European rabbit, the virus infects and replicates initially in the skin before spread to the draining lymph node. After infection of leukocytes it spreads to distal tissues such as skin and conjunctiva. Clinical signs consist of swellings and lesions in skin, conjunctiva and anogenital organs. The rabbit dies 10-12 days post infection, but the exact cause is still not known. In the American rabbits only a benign cutaneous fibroma is seen.

The expression of viral immunomodulatory proteins is of great importance when it comes to the successful infection of myxoma virus in the rabbit. The development of these proteins is likely to have occurred in the natural rabbit hosts, but analyses of the proteins have mainly been done in European rabbits. The viral proteins have the ability to interact with parts of the immune system and can for example inhibit production of pro-inflammatory cytokines, recognition of the immune defence and induced apoptosis of infected cells. Other proteins can bind chemokines and regulate specific signalling pathways. As a result the virus facilitates its own replication, dissemination and transmission by manipulating the intracellular and extracellular environment. Resistance can be seen in current wild European rabbit populations which seems to moderate the disease rather than preventing infection. The genetic origin is uncertain, but an increased innate immunity may be of importance. Recovery from infection is usually considered inducing a protective immunity in the rabbits.

In conclusion it is clear that the immunomodulatory proteins produced by the myxoma virus are an important feature at the infection of European rabbits. However, the interaction with the natural rabbit hosts seems to be a rather unknown area. The effect of the proteins indicates that a cell-mediated immune response is likely to be optimal against infection. Further research with comparisons of different rabbit species would be interesting and probably give an insight to the future of myxoma virus in rabbit populations.



## INLEDNING

Myxomaviruset tillhör familjen poxviridae och infekterar framför allt kaniner (Barrett *et al.*, 2009). Hos sina naturliga värddar, amerikanska kaniner av genus *Sylvilagus*, orsakar viruset en mild sjukdom karakteriserad av ett kutant fibrom. Den europeiska kaninen, av genus *Oryctolagus*, drabbas istället av myxomatos (Jeklova *et al.*, 2008). Myxomatos, även kallad kaninpest (Sveriges veterinärmedicinska anstalt, 2016), är en allvarlig sjukdom karakteriserad av systemisk spridning, sekundära kutana lesioner (Best *et al.*, 2000) och en mortalitetsgrad nära 100 % (Jeklova *et al.*, 2008).

Introduktionen av viruset i Australien och Europa under 1950-talet resulterade i att den vilda kaninpopulationen reducerades kraftigt. Med tiden utvecklades en naturlig selektion för attenuerade virusstammar och genetiskt resistent kaninstammar. Idag är myxomavirusets samevolution med värden ett välstuderat fenomen. Virusets etablering i den europeiska kaninpopulationen demonstrerar hur en från början artspecifik patogen kan överföras till en ny tillgänglig värd, vilket sammanfattas i översiktsartikeln av Kerr *et al.* (2015). Många studier har utförts i syfte att undersöka hur interaktionen med värden går till och vad det är som gör viruset så framgångsrikt vid infektion av den europeiska kaninen. Syftet med den här litteraturstudien är att undersöka hur myxomaviruset interagerar med kaninens immunsystem och hur det undviker värdens immunsvaret vid infektion. En stor del av uppsatsen beskriver infektionen hos den europeiska kaninen, med anledning av att den refererade litteraturen främst har fokuserat på den kaninarten.

## MATERIAL OCH METODER

Den här litteraturstudien har huvudsakligen baserats på vetenskapliga artiklar som erhållits genom sökningar i databaserna Web of Science och Pubmed. Vid sökning har följande sökord använts: (rabbit\* OR lagomorph\* OR "Oryctolagus cuniculus" OR "European rabbit") AND ("immune system" OR immunity OR immunolog\* OR "immune defence") AND ("myxoma virus" OR myxomatosis OR poxvirus). Referenslistan från flera artiklar har även använts för att hitta fler relevanta artiklar till uppsatsen. Ett flertal översiktsartiklar har använts till uppsatsen i syfte att ge en bakgrund till ämnet. Flera stycken under rubriken "Interaktion med kaninens immunsystem" har till stor del skrivits med hjälp av boken Veterinary Immunology (Tizard, 2013).

## LITTERATURÖVERSIKT

### Bakgrund till myxomaviruset

#### **Myxomaviruset**

Myxomaviruset tillhör genus *Leporipoxvirus* och underfamiljen *Chordopoxvirinae*, som ingår i familjen *Poxviridae*. Viruset är stort med ett 161,8 kilobaspar långt genom som utgörs av ett dubbelsträngat DNA. Genomet innehåller 12 gener inom terminal inverted repeats (TIRs) (Cameron *et al.*, 1999). TIRs finns på båda ändarna av genomet, vilket innebär att generna på de båda ändarna speglar varandra, enligt beskrivning av Seet *et al.* (2003). Virusreplikationen sker i infekterade cellers cytoplasma, där det uttrycks ett flertal immunmodulerande proteiner som på olika sätt interagerar med värden (Zhang *et al.*, 2009). Viruset infekterar framför allt kaniner (Barrett *et al.*, 2009) och tros vara apatogent hos andra arter. Enligt översiktsartikeln av Spiesschaert *et al.* (2011) har studier däremot visat en förmåga hos viruset att replikera i odlade celler från många arter, inklusive människa.

Viruset kan delas in i två undergrupper: sydamerikanska stammar, där naturliga värden är skogskaninen (*Sylvilagus brasiliensis*), och kaliforniska stammar, där naturliga värden är buskkaninen (*Sylvilagus bachmani*) (Best *et al.*, 2000). Hos de naturliga värdarna orsakar viruset vanligen ett kutant fibrom av benign karaktär (Jeklova *et al.*, 2008). Den europeiska kaninen (*Oryctolagus cuniculus*) drabbas istället av myxomatos. Myxomatos är en allvarlig sjukdom karakteriserad av bland annat sekundära kutana lesioner (Best *et al.*, 2000), svullnad i anogenitala regionen och inflammation i ögonlock och konjunktiva. Sjukdomen har systemisk spridning och nära 100 % mortalitetsgrad (Stanford *et al.*, 2007; Jeklova *et al.*, 2008).

Förutom naturligt förekommande stammar av myxomaviruset finns främst tre stammar som används i laboratorier: SLS (standard laboratory strain), Lausanne-stammen och Uriarra-stammen. SLS och Lausanne-stammen härstammar från Sydamerika och är mycket virulenta (Spiesschaert *et al.*, 2011). Uriarra-stammen härstammar från SLS-stammen och är en attenuerad stam som vanligen inte orsakar letal sjukdom hos försökskaniner (Best & Kerr, 2000).

#### **Myxomatos**

Sjukdomen myxomatos beskrevs första gången år 1896 hos importerade europeiska försökskaniner i Uruguay. Kaninerna hölls i utomhusmiljö, där de kom i kontakt med bitande artropoder och snabbt insjuknade i en smittsam, dödlig sjukdom. Sjukdomen karakteriserades av flera lesioner och tumörer på hud och konjunktiva. Myxomaviruset kunde senare genom isolering identifieras som infektiöst agens (Spiesschaert *et al.*, 2011).

Myxomatos är en systemisk och letal sjukdom som drabbar den europeiska kaninen (Jeklova *et al.*, 2008). Vid infektion med sydamerikanska virusstammar kan sjukdomen bli mycket allvarlig, medan infektion med kaliforniska stammar kan resultera i en mer diskret sjukdom. Båda virusstammarna kan vid infektion innebära en mortalitetsgrad nära 100 %, enligt översiktsartikeln av Bertagnoli och Marchandeu (2015).

En annan typ av myxomatos är atypisk myxomatos, vilken karaktäriseras av kliniska symtom främst lokaliserade till respirationsvägarna (Jeklova *et al.*, 2008). Denna sjukdom förekommer mindre frekvent och överföringen tros ske via direktkontakt snarare än via vektorer (Spiesschaert *et al.*, 2011).

### **Historia och samevolution med värden**

Utvecklingen av den europeiska kaninen, från vilken nutida domesticerade kaninarter härstammar, inträffade troligen på Iberiska halvön och i södra Frankrike (Kerr *et al.*, 2015). Under koloniseringen av nya territorier bidrog människan till spridning av arten, då kaninen ofta togs med för sportjakt eller för köttets skull. Under koloniseringen i Australien år 1860 fick den vilda kaninpopulationen fäste och fram till 1930 växte den enormt med en spridning över hela kontinenten (Spiesschaert *et al.*, 2011). Med anledning av den höga mortalitetsgraden föreslogs redan år 1918 användning av myxomaviruset, i syfte att kontrollera den vilda populationen. Först under 1930-talet påbörjades experimentella försök och den stam som användes var SLS. När fältförsöken inleddes släpptes viruset ut i främst torrt klimat, där det visade sig ha begränsad spridning inom kaninpopulationen (Kerr *et al.*, 2015). Kerr (2012) beskriver i sin översiktsartikel att delar av Australien drabbades av översvämning år 1950, samtidigt som fältförsöken pågick. Det medförde att artropoder kunde spridas och fungera som vektorer för viruset. Inom kort hade viruset spridit sig över stora ytor och resulterat i en kraftig reducering av den vilda kaninpopulationen.

Avsaknaden av en naturlig reservoar för myxomaviruset i Australien medförde att viruset var begränsat till kaninen som enda värddjur. I syfte att öka replikationen och spridningen av viruset utvecklades en naturlig selektion för mindre virulenta stammar som ökade överlevnadstiden hos värden (Spiesschaert *et al.*, 2011). Det ökade selektionstrycket på viruset medförde även en naturlig selektion inom kaninpopulationen för genetiskt resistent stammar. Som resultat ökade överlevnadsgraden hos kaninerna markant redan några år efter den första epidemin av myxomatos i Australien (Best & Kerr, 2000). Trots att kaninpopulationen återhämtade sig något uppskattades i början av 1990-talet att populationen totalt sett hade reducerats med 75-95 % (Kerr *et al.*, 2015). När Lausanne-stammen introducerades i Europa år 1952 i syfte att kontrollera den vilda kaninpopulationen inträffade ett liknande händelseförlopp mellan värden och viruset (Best & Kerr, 2000). Idag betraktas myxomaviruset vara en enzooti hos nuvarande kaninpopulationer (Bertagnoli & Marchandeu, 2015). Virusets reducering av den europeiska kaninpopulationen är dessutom en anledning till att flera rovdjur idag är utsatta, då kaninen är en viktig födokälla (Spiesschaert *et al.*, 2011).

### **Smittspridning och patogenes**

#### *Smittspridning*

Myxomaviruset sprids genom direktkontakt eller med bitande artropoder. Direktkontakt kan uppstå vid exempelvis sociala interaktioner eller slagsmål och för överföring krävs kontakt med kroppsdelar som utsöndrar virus. Virusutsöndring sker från bland annat konjunktiva, nasala passager och rodnade kutana lesioner (Kerr *et al.*, 2015). Artropoder som kan sprida smittan vidare är exempelvis myggor och flugor, vilka måste bita i en kutan lesion för att

viruset ska överföras. Överföringen av viruset sker passivt hos artropoderna, vilket innebär att det inte sker någon replikation hos dem. Detta medför att smittspridningen med artropoder varierar i effektivitet, mycket beroende på hur hög viruskoncentrationen är i kutana lesioner (Best *et al.*, 2000; Bertagnoli & Marchandeu, 2015). Artropoderna har dock en betydande roll för effektiv epizootisk spridning (Kerr *et al.*, 2015).

#### *Patogenes hos den europeiska kaninen*

Vid intradermal inokulation av virulent stam av myxomaviruset sker replikation initialt i huden omkring inokulationsplatsen (Best *et al.*, 2000). Viruset infekterar celler positiva för major histocompatibility complex class II (MHC-II) vid gränssytan mellan dermis och epidermis och sprids därefter till dränerande lymfknutar. Där befinner sig viruset till en början i cellerna tillhörande subkapsulära sinus och infekterar sedan lymfocyter i T-cellszonen av lymfknutan (Kerr *et al.*, 2015). Via leukocyter tar sig viruset till distala vävnader, såsom lungor, testiklar, mjälte, hud och konjunktiva (Best *et al.*, 2000). I distala vävnader sker vidare replikation av viruset. Infektionen av leukocyter och spridningen via dem tros vara en viktig anledning till virusets framgång vid infektion av europeiska kaniner. Virusmängden i blodet är mycket liten eller obefintlig (Kerr *et al.*, 2015).

Vid inokulationsplatsen infekterar viruset även epidermala celler, hos vilka de inducerar cellulär hyperplasi och hypertrofi. I samband med infektionen av dessa celler utvecklas upphöjda primära lesioner i huden. Virusmängden kan vara mycket hög i sekundära kutana lesioner, såsom svullna ögonlock och svullen vävnad på öronbasen. En anledning till den höga virusmängden tros vara att dessa platser är viktiga för överföring till artropoder (Kerr *et al.*, 2015). Sekundära bakteriella infektioner kan uppkomma i de övre luftvägarna och konjunktiva vid ett senare stadie av infektionen (Best & Kerr, 2000).

#### **Kliniska symtom och diagnostisering**

##### *Kliniska symtom hos den europeiska kaninen*

De första kliniska symtomen för sjukdomen myxomatos uppkommer två till fyra dagar efter infektion med myxomaviruset. Symtomen karaktäriseras av en röd svullen lesion vid infektionsplatsen. Vid dag sex till åtta inträffar även svullnad av ögonlocken och anogenitala regionen. Detta följs eventuellt av flöde från nos och ögon som till en början är muköst och senare purulent. Som resultat kan näsborrarna täppas igen, vilket i sin tur kan orsaka andnöd och att ögonen stängs igen. Ett annat symtom kan vara att öronen svullnar upp och blir ödematösa, för att sedan hamna i hängande ställning, enligt översiktsartikeln av Kerr och McFadden (2002). Skrotum och testiklar hos hanar blir mycket ödematösa (Kerr, 2012). Sekundära kutana lesioner kan uppkomma vid denna tidpunkt. De framträder framför allt på ögonlock och nedre delen av öronen, men kan även ses över hela kroppen. Kaninen dör vanligen 10-12 dagar efter infektionen (Kerr & McFadden, 2002).

Anledningen till att kaninerna dör är inte fastställd, men generellt brukar immunsuppression med sekundära bakteriella infektioner anges som orsak (Best & Kerr, 2000; Kerr & McFadden, 2002). Det förekommer däremot fall där kaniner dör i akut infektion utan tecken på sekundära infektioner (Best & Kerr, 2000). Studier har även visat att eventuell sekundär infektion har varit lokaliserad till de övre luftvägarna utan inverkan på lungorna. Samtidigt

finns det studier som visar att sekundära bakteriella infektioner har orsakat allvarliga lunglesioner. Asfyxi på grund av nasal obstruktion har även föreslagits som orsak till död. Inget av dessa förslag lyckas dock förklara varför död inträffar vid akut infektion. Hos försökskaniner har pulmonärt ödem varit en betydande faktor till död (Kerr & McFadden, 2002).

#### *Kliniska symtom hos skogskaninen*

Skogskaninen, *Sylvilagus brasiliensis*, är den naturliga värden för det sydamerikanska myxomaviruset (Best *et al.*, 2000). Vid infektion orsakas ett kutant fibrom som persisterar i några veckor innan det tillbakabildas. Emellanåt orsakar viruset en mer generaliserad sjukdom. Fibromet innehåller virus som kan överföras till artropoder. Vid experimentella försök har kaniner kunnat infekteras genom direktkontakt eller inokulation av konjunktiva. Flugor och myggor är framför allt viktiga för virusöverföring vid naturlig infektion. Det är ännu inte känt hur lång immunitet skogskaninen har mot återinfektion (Kerr *et al.*, 2015).

#### *Kliniska symtom hos buskkaninen*

Buskkaninen, *Sylvilagus bachmani*, är naturlig värd för det kaliforniska myxomaviruset (Best *et al.*, 2000). Vid infektion orsakas ett kutant fibrom, från vilket viruset kan överföras till artropoder. Vid experimentell infektion av kaniner har de flesta fibromen inom fyra veckor bildat en sårskorpa, vilket försvårar överföring till artropoder. Hos några kaniner persisterade fibromen dock en längre tid och viruset kunde då överföras till artropoder under två till tre månaders tid (Kerr *et al.*, 2015).

#### *Diagnostisering*

Sjukdomen diagnostiseras genom observation av epidemiologisk bakgrund och kliniska symtom. Vid atypisk myxomatos eller infektion av attenuerade virusstammar kan det även vara nödvändigt att utföra en laboratorieanalys, med anledning av de diskreta kliniska symtomen. Myxomavirusets genom kan identifieras genom polymerase chain reaction (PCR) (Bertagnoli & Marchandeu, 2015).

## **Interaktion med kaninens immunsystem**

### ***Antiviralt svar***

Cellmedierad immunitet och neutraliserande antikroppar är troligen viktiga för bekämpning av viruset och utveckling av immunitet mot återinfektion (Kerr, 2012). T-hjälparceller (Th-celler) tillhör det förvärvade immunsvaret och kan, beroende på stimulering, inducera antingen ett cell- eller antikroppsmedierat immunsvaret. Th1-celler stimuleras framför allt av interleukin-12 (IL-12) från antigenpresenterade celler och utsöndrar interferon- $\gamma$ , tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), TNF- $\beta$  och IL-2. Ett Th2-svar främjas av utebliven stimulering av IL-12 och leder till utsöndring av IL-4, IL-5, IL-10 och IL-13.

Th2-svaret styr framför allt till ett antikroppsvar och har betydelse vid bland annat parasitinfektioner. Ett Th1-svar främjar ofta cellmedierade immunsvaret och eftersträvas därmed vid intracellulära infektioner, såsom virusinfektioner. Antikroppar har en skyddande roll mot extracellulära virus och kan neutralisera dem genom att hindra dem från att binda till

och infektera celler. Den cellmedierade immuniteten har däremot en viktigare roll avseende kontroll av virusinfektionen.

### *Pattern recognition receptors (PRRs)*

PRRs är viktiga för att känna igen en virusinfektion och aktivera värdens immunförsvar. Receptorerna finns på cellmembran, i cytoplasman eller i endosomer hos vaktpostceller och känner igen DAMPs (damage-associated molecular patterns) och PAMPs (pathogen-associated molecular patterns). PAMPs från virus förekommer framför allt i form av viral nukleinsyra. Stimulering av de flesta PRRs leder till aktivering av intracellulära signalkaskader. Dessa signalkaskader kan vidare stimulera bland annat uttryck av interferoner och aktivering av proinflammatoriska cytokiner. Interferoner och cytokiner kan i sin tur stimulera ett antiviralt svar och har stor betydelse för vidare utveckling av ett förvärvat immunsvär.

En studie har undersökt evolutionen hos RIG-I-lik receptorn (RLR) hos genus *Sylvilagus*, *Lepus* och *Oryctolagus* (Lemos de Matos *et al.*, 2014). Familjen med RLRs utgör en av klasserna av PRR som kan känna igen viralt RNA i cytoplasman hos infekterade celler. När RLRs stimuleras kan de aktivera caspaser och stimulera signalvägar, vilket leder till produktion av interferoner. Studien har visat att aminosyrasekvensen för RIG-I skiljer sig åt mellan den europeiska kaninen och buskkaninen i en speciell region för igenkänning och bindning av RNA. Det är möjligt att denna skillnad har en betydande roll för hur myxomaviruset upptäcks i värden (Lemos de Matos *et al.*, 2014)

### **Immunmodulerande proteiner**

Uttryck av virala immunmodulerande proteiner är en viktig anledning till myxomavirusets stora framgång vid infektion av kaniner. Några av dessa proteiner är specifika för kaninen, men det finns även proteiner med förmåga att känna igen delar av immunsystemet hos andra värdar, inklusive människan. För många av dessa proteiner har funktionen kunnat studeras *in vitro* och/eller *in vivo*. Hos ett flertal proteiner har enbart en hypotetisk funktion beskrivits efter jämförelse med andra likartade gener från eukaryota celler eller från andra virus (Spiesschaert *et al.*, 2011). För flera av dessa proteiner finns det dessutom fler än en funktion beskrivna (Kerr & McFadden, 2002).

Utvecklingen av myxomavirusets immunmodulerande gener inträffade troligen i de amerikanska kaninerna. Trots detta har analyser av dessa gener främst gjorts i den europeiska kaninen. Identifierade gener har prefigerats med M. Numreringen har gjorts från vänstra änden av genomet och L (left) eller R (right) betecknar vilken riktning transkriptionen har. Gener som betecknats med L/R befinner sig inom TIRs (Kerr *et al.*, 2015).

### **Interaktioner med immunsystemet**

Myxomaviruset underlättar sin egen replikation, spridning och överföring genom att manipulera den intracellulära och extracellulära miljön hos värden. De proteiner som viruset uttrycker har bland annat förmåga att inuti en cell inhibera produktionen av interferoner och proinflammatoriska cytokiner. De kan även inhibera apoptos och förhindra att infekterade celler känns igen av medfödda och förvärvade immunsvaret. Utanför cellen kan virala

proteiner bland annat binda interferoner, TNF och kemokiner och inhibera inflammatoriska kaskader. Det uttrycks även virala proteiner på cellytan av den infekterade cellen i syfte att inhibera aktivering av T-celler och makrofager (Kerr, 2012). Nedan följer en beskrivning av hur myxomaviruset interagerar med några av komponenterna i värdens immunsystem.

#### *Inaktivering av makrofager och T-celler*

Makrofager ingår i det tidiga försvaret och utgör den viktigaste gruppen av vaktpostceller. De svarar snabbt på stimuli via PRRs och kan påverka omkringliggande vävnad genom att utsöndra olika signalmolekyler. Som resultat kan de stimulera inflammation och initiera det förvärvade immunsvaret. T-celler finns bland annat i lymfknutor och får antigen presenterat för sig på ytan av dendritiska celler. Vid infektion kan de migrera till infektionsplatsen och inducera ett cellmedierat immunsvaret. Genom att producera virala proteinhomologer till värdfaktorer som är viktiga för leukocytaktiveringen kan myxomaviruset reglera aktivering av dessa celler (Cameron *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2009).

#### *Inhiberad signalering via nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) och inflammasomen*

NF- $\kappa$ B är en transkriptionsfaktor som finns i cytoplasman. Aktivering sker genom proinflammatoriskt stimuli och följs av en migration av transkriptionsfaktorn till kärnan. Där stimuleras ett ökat uttryck av en mängd gener viktiga för inflammation, apoptos och immunitet. Bland annat uttrycks cytokiner, såsom IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-18, TNF- $\alpha$  och IL-4. Myxomavirusets proteiner tros binda till och inhibera signalering via NF- $\kappa$ B (Rahman *et al.*, 2009). Inflammasomen är ett komplex av multipla proteiner och bildas som en del av det medfödda immunsvaret efter stimuli av PRR. De aktiverar proinflammatoriska caspaser, vilka i sin tur reglerar aktivering och utsöndring av proinflammatoriska cytokiner. Virala proteiner motverkar aktivering av dessa cytokiner genom att inhibera aktivering av inflammasomen (Rahman *et al.*, 2009).

#### *Inhiberad aktivitet av cytokiner och kemokiner*

Aktiverade vaktpostceller stimulerar olika signalvägar, vilket kan resultera i aktivering av gener som kodar för cytokiner. TNF- $\alpha$  är en proinflammatorisk cytokin som stimulerar immun- och inflammationssvar och kan verka cytotoxiskt. Myxomaviruset uttrycker proteinhomologer till receptorfamiljen för TNF, vilket resulterar i inhiberad aktivitet av TNF (Schreiber *et al.*, 1997). Interferoner är en annan grupp av cytokiner som har stor betydelse vid virusinfektioner och utvecklingen av ett antiviralt Th1-svar. Även här uttrycker viruset proteinhomologer till receptorn och effekten blir inhiberad aktivitet av interferoner (Lalani *et al.*, 1997). Kemokiner produceras av vaktpostceller och har en viktig roll i värdens tidiga inflammationssvar mot viral infektion. De är små proteiner och har bland annat till uppgift att attrahera och aktivera leukocyter. Myxomaviruset har utvecklat proteiner som binder till och inhiberar aktiviteten hos kemokinerna. Effekten blir minskad kemotaxi och aktivering av inflammatoriska celler (Lalani *et al.*, 1999).

#### *Inhiberad apoptos av infekterade lymfocyter*

Programmerad celldöd är en medfödd försvarsmekanism som används av multicellulära organismer i syfte att avlägsna celler som utgör ett hot mot resten av organismen. Virusinfekterade celler är ett exempel på celler som utgör ett hot. Eftersom apoptos motverkar

viral replikation och spridning har myxomaviruset, liksom många andra virus, utvecklat flera strategier för att reglera apoptos. Det uttrycks bland annat proteiner som kan inhibera proapoptotiska molekyler, såsom TNF och cytokrom c (Spiesschaert *et al.*, 2011).

#### *Nedreglering av värdens cellytereceptorer*

Myxomaviruset uttrycker proteiner med förmåga att nedreglera uttryck av CD4, CD95 och MHC-I på cellytan (Guerin *et al.*, 2002; Mansouri *et al.*, 2003). Minskat uttryck av CD4 tros kunna vara involverat i virusets inhiberande effekt på T-hjälparceller och dendritiska celler (Kerr & McFadden, 2002). Nedreglering av CD95 tros kunna leda till inhiberad celldöd via denna receptor (Kerr, 2012). MHC-I har en viktig roll för presentation av virala peptider och initiering av ett cellulärt immunsvaret. Ett minskat uttryck av denna receptor tros kunna försvåra de cytotoxiska T-lymfocyternas igenkänning av virusinfekterade celler (Guerin *et al.*, 2002). Det minskade uttrycket av MHC-I skulle även kunna leda till igenkänning av NK-celler, men det är möjligt att myxomaviruset har hittat sätt att inhibera dem (Kerr & McFadden, 2002).

#### *Produktion av antikroppar*

Vid infektion med myxomaviruset producerar kaninen antikroppar. Två studier med europeiska försökskaniner har visat att immunoglobulin (Ig) M och G kan detekteras i serum från sex dagar efter infektion med SLS eller Lausanne-stammen. Att IgG har detekterats kan ses som en indikation på att T-hjälparceller har aktiverats och att det har skett en Ig-klass switch. Infektionen hos försökskaninerna indikerade en utveckling av ett Th2-svar snarare än ett antiviralt Th1-svar. Denna slutsats drogs med anledning av en reducerad cellmedierad aktivitet och tidig produktion och Ig-klass switch av antikroppar. Hos kaninerna i samma studier visade sig antikropparna inte kunna skydda mot död vid infektion med virulent myxomavirus (Best & Kerr, 2000; Jeklova *et al.*, 2008). En möjlig anledning kan vara att det viktigaste immunsvaret mot viruset troligen är cellmedierat (Jeklova *et al.*, 2008). I en av de två studierna ingick även försök med resistent vilda europeiska kaniner, vilka till skillnad från försökskaninerna överlevde infektionen. Även de resistent kaninerna producerade antikroppar och det föreslogs att dessa kaniner istället utvecklade ett antiviralt Th1-svar (Best & Kerr, 2000).

Enligt Best och Kerr (2000) skulle det utifrån en musmodell gå att avgöra om det är ett Th1- eller Th2-svar som dominerar i de olika immunsvaren genom att titta på subklasser av IgG. Ett Th1-svar ska enligt modellen leda till produktion av IgG2a och IgG3, medan ett Th2-svar ska resultera i produktion av IgG1. Dessvärre har kaninen enbart en gen för C- $\gamma$  tung kedja och kan därmed inte producera olika subklasser av IgG, vilket försvårar sådana tester.

## **Resistens och immunitet**

### ***Utveckling av resistens hos europeiska kaninpopulationer***

Den naturliga selektionen för attenuerade virusstammar medförde en högre överlevnadsgrad hos infekterade vilda europeiska kaninpopulationer. Med tiden ökade antalet individer som överlevde myxomatosen och utvecklingen av en resistent kaninpopulation tog form (Kerr *et al.*, 2015). Resistensen kan reducera mortalitetsgraden och dämpa kliniska symtomen vid



infektion (Bertagnoli & Marchandeu, 2015), snarare än motverka infektion. Infektion med mer virulent virus eller förmåga att motverka Th1-svaret hos värden kan däremot övervinna resistensen (Kerr *et al.*, 2015). Den genetiska bakgrunden till utvecklingen av resistens är fortfarande inte klarlagd (Bertagnoli & Marchandeu, 2015), men ett ökat medfött immunsvaret tros kunna ha en betydande roll i sammanhanget. En ökning av det medfödda immunsvaret leder till kontrollerad virusreplikation i distala vävnader, vilket i sin tur reducerar virusets virulensgrad. Som följd kan även ett förvärvat immunsvaret utvecklas och så småningom bekämpa infektionen (Kerr *et al.*, 2015).

### ***Utveckling av immunitet efter infektion***

Generellt brukar kaniner som genomgått och överlevt infektion med myxomavirus betraktas som immuna mot återinfektion. Studier med europeiska kaniner som återhämtat sig och sedan infekterats igen visade däremot att kaninerna kunde få en reaktion vid inokulationsplatsen som var snarlik den reaktion som sågs vid första infektionen. Både utvecklingen och tillbakagången av dessa reaktioner verkar däremot ske mycket snabbare än vid första infektionen. Andra studier visar att kaniner som tillfrisknat efter infektion och sedan genomgått immunsuppression har utvecklat kliniska symtom som förknippas med myxomatos. Några experiment på dessa kaniner har stundvis resulterat i en överföring av viruset från kaninernas ögonlock, medan en annan rapport talar för att isolering av viruset ibland kan ske från testiklarna (Kerr & McFadden, 2002).

Hos vilda europeiska kaniner har fluktuationer av antikropps-nivåer kunnat mätas i serum, vilket har tolkats som avtagande immunitet. Det skulle kunna medföra nya utbrott av viruset som i sin tur medför ökande nivåer av antikroppar i syfte att kontrollera återinfektionen. Dock är bevisen för dessa utbrott begränsade och en studie med naturligt infekterade vilda kaniner har kunnat detektera en relativt konstant nivå av antikroppar under minst två års tid efter genomgången infektion. Hos de flesta kaniner betraktas därmed genomgången infektion resultera i livslång immunitet mot återinfektion (Kerr & McFadden, 2002).

## DISKUSSION

Myxomavirusets interaktion med kaninens immunsystem är ett spännande område med stort utrymme för forskning. Många studier har utförts i syfte att undersöka virusets immunmodulerande effekter och fastställa vad det är som gör viruset så framgångsrikt vid infektion av framför allt den europeiska kaninen. Virusets kanske mest effektiva mekanismer för att undvika och reglera värdens immunförsvar sker i samband med uttryck av virala immunmodulerande proteiner. Många av dessa proteiner har studerats *in vitro* och/eller *in vivo*, vilket har åskådliggjort en mängd olika funktioner genom vilka proteinerna reglerar många komponenter av värdens immunförsvar. Förutom att ge en förklaring till myxomavirusets framgång hos den europeiska kaninen väcker dessa virala proteiner även en nyfikenhet för hur interaktionen med den naturliga värden ser ut.

Patogenesen för myxomaviruset skiljer sig mellan den amerikanska och europeiska kaninen, men enligt Pinheiro *et al.* (2016) är bakgrunden till denna skillnad ännu inte utredd. Troligen har myxomaviruset anpassat sig till sina naturliga värdar och hittat sätt att undvika värdens immunsvär utan att orsaka allvarlig sjukdom. Utvecklingen av ett lokalt kutant fibrom föreslår att viruset har väl fungerande virulensfaktorer för att infektera cellerna i huden. Detta stöds av resultatet från studien av Best och Kerr (2000), där försökskaniner som infekterats med en attenuerad virusstam visade sig ha lika stor virusmängd vid inokulationsplatsen jämfört med försökskaniner som infekterats med en virulent virusstam. Med tanke på att sjukdomen sällan är systemisk är det dock troligt att den naturliga värden har utvecklat ett effektivt immunsvär som förhindrar vidare spridning från huden.

Enligt Kerr *et al.* (2015) har experiment med de naturliga värdarna och virulenta virusstammar visat att virusöverföringen kan vara begränsad mellan de naturliga värdarna. När buskkaninen infekterades med den sydamerikanska virusstammen utvecklades kutana fibrom, men virusöverföringen via myggor begränsades av för låg viruskoncentration i fibromen. Hos skogskaninen orsakades ingen synlig infektion när den kaliforniska virusstammen överfördes till kaninen via myggor. Denna begränsade överföring av viruset lyfter frågan huruvida det finns arts specifika egenskaper som påverkar virusets interaktion med värdens immunsystem och därmed begränsar virusets framfart.

Utifrån den refererade litteraturen till den här uppsatsen verkar interaktionen med den naturliga värden inte vara väl studerad, då den enbart diskuteras översiktligt i ett fåtal vetenskapliga artiklar. En förklaring till den uteblivna litteraturen skulle kunna vara att analyser av de immunmodulerande proteinerna främst verkar ha gjorts i den europeiska kaninen. Detta trots att utvecklingen av proteinerna troligen inträffade hos den amerikanska kaninen (Kerr *et al.*, 2015). Det faktum att virusinteraktionen kan skilja sig så pass mycket mellan olika kaninarter är intressant. Med tanke på den pågående utvecklingen av resistent kaninpopulationer kan det diskuteras huruvida myxomaviruset i framtiden kommer att ha anpassat sig till den europeiska kaninen, liksom myxomaviruset idag har anpassat sig till sina naturliga värdar. Vidare forskning om virusinteraktionen med andra kaninarter och fler jämförelser med de resistent kaninpopulationerna skulle behövas för att kunna dra slutsatser om hur myxomavirusets samevolution med den europeiska kaninen kan komma att sluta.

Ett cellmedierat immunsvaret är troligen det mest optimala mot infektion med myxomaviruset (Jeklova *et al.*, 2008; Kerr, 2012). Immunsvaret hos kaniner som infekterats med viruset finns inte väl beskrivet, men utifrån funktionerna hos de virala immunmodulerande proteinerna går det ändå att diskutera vilket immunsvaret som eftersträvas. Effekten av de virala proteinerna indikerar att ett Th1-svar kan ha betydelse för hur virusinfektionen utspelar sig hos värden. Den nuvarande uppfattningen av immunsvaret hos den europeiska kaninen är baserad på bland annat jämförelser mellan försökskaniner och resistent kaniner. Resultatet från en studie visade att kaninen producerar antikropparna IgM och IgG vid virusinfektion, oavsett om den har genetisk resistens eller inte. Antikroppsproduktionen hos försökskaninerna sågs som en indikation på att ett Th2-svar hade inducerats, medan de resistent kaninerna tros ha utvecklat ett Th1-svar (Best & Kerr, 2000). Ett uteblivet Th1-svar hos de mottagliga kaninerna skulle kunna förklara varför de inte lyckas kontrollera virusinfektionen och istället insjuknar i myxomatosis. Antikropparnas roll verkar ännu inte vara beskriven, men det är troligt att de produceras i syfte att utveckla en immunitet hos värden mot återinfektion. Med tanke på att de flesta kaninerna dör vid virusinfektionen har antikropparna troligen störst betydelse hos resistent kaniner, vilka oftare överlever infektionen.

### **Slutsats**

De analyser som hittills har gjorts avseende de virala proteiner som myxomaviruset uttrycker har utförts i den europeiska kaninen. Här skulle mer forskning i andra kaninarter behövas, för att undersöka varför infektion med myxomaviruset ser olika ut hos olika värdar. Fler jämförelser mellan olika kaninarter skulle även kunna bidra till diskussionen om hur interaktionen mellan myxomaviruset och den europeiska kaninen kan komma att se ut i framtiden. Många av de virala proteinerna har kunnat identifieras och fått en fastställd funktion. För andra proteiner är funktionen enbart hypotetisk. Framtida forskning om de virala proteinerna och deras funktion kommer troligen leda till upptäckten av fler immunmodulerande proteiner och ge en ökad förståelse för hur myxomaviruset interagerar med kaninens immunsystem.

## LITTERATURFÖRTECKNING

- Barrett, J.W., Werden, S.J., Wang, F., McKillop, W.M., Jimenez, J., Villeneuve, D., McFadden, G. & Dekaban, G.A. (2009). Myxoma virus M130R is a novel virulence factor required for lethal myxomatosis in rabbits. *Virus Research*, 144: 258-265.
- Bertagnoli, S. & Marchandeu, S. (2015). Myxomatosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 34: 549–556, 539–547.
- Best, S.M. & Kerr, P.J. (2000). Coevolution of host and virus: the pathogenesis of virulent and attenuated strains of myxoma virus in resistant and susceptible European rabbits. *Virology*, 267: 36–48.
- Best, S.M., Collins, S.V. & Kerr, P.J. (2000). Coevolution of host and virus: cellular localization of virus in myxoma virus infection of resistant and susceptible European rabbits. *Virology*, 277: 76–91.
- Cameron, C.M., Barrett, J.W., Mann, M., Lucas, A. & McFadden, G. (2005). Myxoma virus M128L is expressed as a cell surface CD47-like virulence factor that contributes to the downregulation of macrophage activation in vivo. *Virology*, 337: 55–67.
- Cameron, C., Hota-Mitchell, S., Chen, L., Barrett, J., Cao, J.X., Macaulay, C., Willer, D., Evans, D. & McFadden, G. (1999). The complete DNA sequence of myxoma virus. *Virology*, 264: 298–318.
- Guerin, J.-L., Gelfi, J., Boullier, S., Delverdier, M., Bellanger, F.-A., Bertagnoli, S., Drexler, I., Sutter, G. & Messud-Petit, F. (2002). Myxoma virus leukemia-associated protein is responsible for major histocompatibility complex class I and Fas-CD95 downregulation and defines scrapins, a new group of surface cellular receptor abductor proteins. *Journal of Virology*, 76: 2912-2923.
- Jeklova, E., Leva, L., Matiasovic, J., Kovarcik, K., Kudlackova, H., Nevorankova, Z., Psikal, I. & Faldyna, M. (2008). Characterisation of immunosuppression in rabbits after infection with myxoma virus. *Veterinary Microbiology*, 129: 117–130.
- Kerr, P.J. (2012). Myxomatosis in Australia and Europe: a model for emerging infectious diseases. *Antiviral Research*, 93: 387–415.
- Kerr, P. & McFadden, G. (2002). Immune responses to myxoma virus. *Viral Immunology*, 15: 229–246.
- Kerr, P.J., Liu, J., Cattadori, I., Ghedin, E., Read, A.F. & Holmes, E.C. (2015). Myxoma virus and the Leporipoxviruses: an evolutionary paradigm. *Viruses*, 7: 1020–1061.
- Lalani, A.S., Masters, J., Graham, K., Liu, L., Lucas, A. & McFadden, G. (1999). Role of the myxoma virus soluble CC-chemokine inhibitor glycoprotein, M-T1, during myxoma virus pathogenesis. *Virology*, 256: 233–245.
- Lalani, A.S., Graham, K., Mossman, K., Rajarathnam, K., Clark-Lewis, I., Kelvin, D. & McFadden, G. (1997). The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines. *Journal of Virology*, 71: 4356-4363.
- Lemos de Matos, A., McFadden, G. & Esteves, P.J. (2014). Evolution of viral sensing RIG-I-like receptor genes in Leporidae genera *Oryctolagus*, *Sylvilagus*, and *Lepus*. *Immunogenetics*, 66: 43-52.
- Mansouri, M., Bartee, E., Gouveia, K., Hovey Nerenberg, B.T., Barrett, J., Thomas, L., Thomas, G., McFadden, G. & Früh, K. (2003). The PHD/LAP-domain protein M153R of myxomavirus is a

- ubiquitin ligase that induces the rapid internalization and lysosomal destruction of CD4. *Journal of Virology*, 77: 1427-1440.
- Pinheiro, A., Neves, F., Lemos de Matos, A., Abrantes, J., van der Loo, W., Mage, R. & Esteves, P.J. (2016). An overview of the lagomorph immune system and its genetic diversity. *Immunogenetics*, 68: 83–107.
- Rahman, M.M., Mohamed, M.R., Kim, M., Smallwood, S. & McFadden, G. (2009). Co-regulation of NF-kappaB and inflammasome-mediated inflammatory responses by myxoma virus pyrin domain-containing protein M013. *PLoS Pathogens*, 5: e1000635.
- Schreiber, M., Sedger, L. & McFadden, G. (1997). Distinct domains of M-T2, the myxoma virus tumor necrosis factor (TNF) receptor homolog, mediate extracellular TNF binding and intracellular apoptosis inhibition. *Journal of Virology*, 71: 2171–2181.
- Seet, B.T., Johnston, J.B., Brunetti, C.R., Barrett, J.W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S.H., Lucas, A. & McFadden, G. (2003). Poxviruses and immune evasion. *Annual Review of Immunology*, 21: 377–423.
- Spiesschaert, B., McFadden, G., Hermans, K., Nauwynck, H. & Van de Walle, G.R. (2011). The current status and future directions of myxoma virus, a master in immune evasion. *Veterinary Research*. 42: 76.
- Stanford, M.M., Werden, S.J. & McFadden, G. (2007). Myxoma virus in the European rabbit: interactions between the virus and its susceptible host. *Veterinary Research*, 38: 299–318.
- Sveriges veterinärmedicinska anstalt (2016-09-07). *Kaninpest*. <http://www.sva.se/djurhalsa/vilda-djur/viltsjukdomar/kaninpest-vilda-djur> [2017-04-03]
- Tizard, I.R. (2013). *Veterinary Immunology*. 9. uppl. Saint Louis, Missouri: Elsevier.
- Zhang, L., Stanford, M., Liu, J., Barrett, C., Jiang, L., Barclay, A.N. & McFadden, G. (2009). Inhibition of macrophage activation by the myxoma virus M141 protein (vCD200). *Journal of Virology*, 83: 9602–9607.