

Prevalens av subkliniskt smittade katter med vingelsjuka i Göteborg jämfört med Uppsala

Jonas Eriksson

Handledare: Mikael Berg

Inst. för biomedicin och veterinärmedicinsk folkhälsovetenskap, avdelningen för parasitologi och virologi

**Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap**

**Examensarbete 2005:10
ISSN 1652-8697
Uppsala 2005**

INNEHÅLL

Summary	4
Sammanfattning	5
Inledning	6
<i>Historisk bakgrund av Bornavirus</i>	<i>6</i>
<i>Borna disease virus – biologi</i>	<i>7</i>
<i>BDV på katt – vingelsjuka</i>	<i>7</i>
Material och metoder	8
<i>Djur</i>	<i>8</i>
<i>PCR</i>	<i>8</i>
<i>ELISA</i>	<i>9</i>
Resultat	9
<i>PCR</i>	<i>9</i>
<i>ELISA</i>	<i>11</i>
Diskussion	11
Litteraturförteckning	13

SUMMARY

Borna disease virus (BDV) is a virus with capability to cause neurological disease in several species of mammals and of ostriches. Also humans are suspected to be susceptible to the virus, as the viral RNA and antibodies against BDV have been found in some humans with psychiatric diseases, like schizophrenia and depression. In Sweden there is a disease called staggering disease in cats, associated to BDV-infection. This disease often has a fatal progress. Definite diagnosis is reached by histo-pathological and immunohistochemical examination of the central nervous system. In these cats, a nonsuppurative meningoencephalomyelitis is induced by the virus. The disease gives rise to signs like ataxia of the hind limbs, changes in behavior, inability to withdraw the claws, mostly in the hind limbs and to pain from the lumbosacral spine. In Sweden, apart from cats there have also been reported Borna-infection in horses and lynx. The way of infection is not clearly understood, but there are theories that rodents and some birds may work as naturally reservoirs of BDV. In Sweden there is evidence that staggering disease in cats occurs in the region of Mälardalen. There is however no larger studies made for the rest of Sweden. Blood samples were collected in Gothenburg and Uppsala to study the prevalence of antibodies against BDV in healthy, outdoor cats that were more than one year of age. Realtime-PCR and ELISA-studies were performed. More studies are needed to make the diagnostics to work and to be able to study the prevalence of BDV in cats outside the region of Mälardalen.

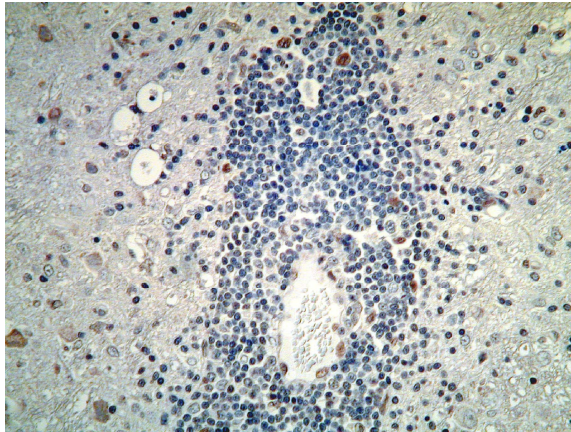
SAMMANFATTNING

Bornavirus (Borna disease virus, BDV) är ett virus som kan orsaka en neurologisk sjukdom hos flera arter av däggdjur samt hos struts. Även människa misstänks kunna drabbas av viruset, då viralt RNA samt antikroppar mot BDV har kunnat påvisas hos en del människor med psykiatriska sjukdomar, såsom schizofreni och depression. I Sverige förekommer en hos katt neurologisk sjukdom, som kallas vingelsjuka. Denna sjukdom har ofta dödlig utgång. Definitiv diagnos fås efter histopatologisk och immunohistokemisk undersökning av hjärna och ryggmärg. Viruset ger upphov till en icke-purulent meningoencefalit hos katt. Sjukdomen ger symptom i form av vinglig gång i bakbenen, beteendeförändringar, oförmåga att dra in klorna, framförallt på bakbenen samt genom smärta från kors- och ländrygg. Vingelsjuka orsakas av BDV och förutom hos katter har bornavirusinfektion även rapporterats hos hästar och lodjur i Sverige. Smittvägen är inte helt klarlagd, men misstanke finns att gnagare och vissa fåglar fungerar som naturliga reservoarer för BDV. I Sverige är det klarlagt att det finns vingelsjuka på katt i Mälarenregionen. Dock är inga större undersökningar gjorda för övriga Sverige. Blodprover togs i Göteborg och Uppsala för att kunna undersökas för prevalens av antikroppar mot BDV hos friska utekatter mer än ett år gamla. Realtids-PCR och ELISA-undersökning utfördes, dock utan att få fram hållbara resultat. Fler studier behövs för att diagnostiken skall fungera och för att kunna undersöka förekomst av BDV hos katter utanför Mälarenregionen.

INLEDNING

Borna disease virus (BDV) är ett enkelsträngat RNA-virus som ger upphov till en neurologisk sjukdom hos flera djurarter, bl.a. häst, katt och får. På katt kallas sjukdomen för vingelsjuka (staggering disease). Även människa verkar kunna drabbas av viruset. Viruset ger upphov till en icke-purulent meningoencefalit i framförallt limbiska systemet och hjärnbarken (figur 1). Serologiska studier har påvisat att klinisk sjukdom är relativt ovanlig och att en stor andel av djuren är subkliniskt infekterade (Nishino et al., 1999). Fåglar antas kunna vara en i Sverige naturlig reservoar för viruset (Berg et al., 2001).

Diagnos av sjukdom kan ställas via histopatologisk och immunohistokemisk undersökning efter obduktion. Analys av serum-antikroppar med hjälp av ELISA är något osäker, då både falska positiva och falska negativa resultat kan erhållas (Nakamura et al., 1996, Nishino et al., 1999). Dock är detta den enda diagnostiska metoden som finns att tillgå för levande djur. En PCR-metod är emellertid under utveckling.



Figur 1. Histopatologisk bild av hjärnsnitt (mesencefalon) på katt med vingelsjuka.

I Sverige verkar vingelsjuka vara centrerat till framförallt Mälardalen. Dock är det inte utfört några utförliga studier för resten av landet. Målet med denna studie är att undersöka huruvida BDV finns subkliniskt på katt i Göteborgsområdet. Detta genomförs med hjälp av serologiska undersökningar (ELISA) på blodprover tagna på friska utekatter över ett års ålder. Prevalensen av positiva katter i Göteborgsområdet jämförs med prevalensen av positiva katter i Uppsala-området, ett konfirmerat vingelsjukesområde. Detta för att få en relativ jämförelse, som hjälp för att avgöra om man bör misstänka att BDV-infektion förekommer hos katt även i Göteborgsområdet.

Historisk bakgrund för Bornavirus

Bornasjuka har varit känt i över tvåhundra år. Viruset (BDV) orsakar en neurologisk störning och de första uppmärksammade fallen var bland hästar i Tyskland. Namnet på sjukdomen kommer ifrån ett utbrott i slutet på 1800-talet i staden Borna i Tyskland, nära Leipzig. I slutet av 1800-talet trodde man att

sjukdomen orsakades av en bakterie och det dröjde till 1920-talet innan man kunde påvisa den virologiska etiologin (Dürwald och Ludwig, 1997).

Under en lång tid trodde man att bornasjuka endast drabbade hästar och får och att sjukdomen endast fanns i vissa delar av Europa. Nu har man dock kunnat påvisa både viralt RNA och antikroppar över hela världen. Ett flertal arter, såsom häst, får, kanin, katt, hund, struts, lodjur och rävar, kan drabbas av naturlig infektion av viruset. Även människa tros kunna drabbas av viruset. Antikroppar och framförallt viralt RNA har påvisats hos humana patienter med psykiatriska störningar, såsom schizofreni och depression. Dock är det inte klarlagt vilken roll dessa fynd på humansidan har (Dürwald och Ludwig, 1997).

Borna disease virus – biologi

Borna disease virus är ett höljeformigt, negativt, icke-segmenterat, enkelsträngt RNA-virus. Det tillhör släktet *Mononegavirales* och familjen *Bornaviridae* (Briese et al. 1992).

Genomet för BDV består av ca 8900 nukleotider och innehåller sex stycken öppna läsramar. Dessa kodar för sex stycken polypeptider: p40, p23, p10, p16, p56 och p180. Namnen på respektive polypeptid kommer av deras respektive molekylvikt i kilodalton. p40 motsvarar det virala nukleoproteinet, p23 fosfoproteinet och p16 virusets matrixprotein. p56 tros motsvara ett yt-glykoprotein och p180 ett L-polymerasprotein. p10:s funktion är okänd (Tomonaga, Kobayashi, & Ikuta 2002).

BDV verkar vara ett konserverat virus, då de olika virusvarianterna funna över världen uppvisar liten genetisk variation. Såväl mellan djurarter, som de varianter av viruset som påvisats hos människa uppvisar liten variation. Man har dock rapporterat om nya fynd av virus, som skiljer sig genetiskt från de tidigare. Bland annat har man hittat ett virus, kallat No/98, hos häst. Denna subtyp av viruset skiljer sig med mer än 15 % och det är svårt att påvisa viruset med standard PCR-metod för BDV (Nowotny et al. 2000).

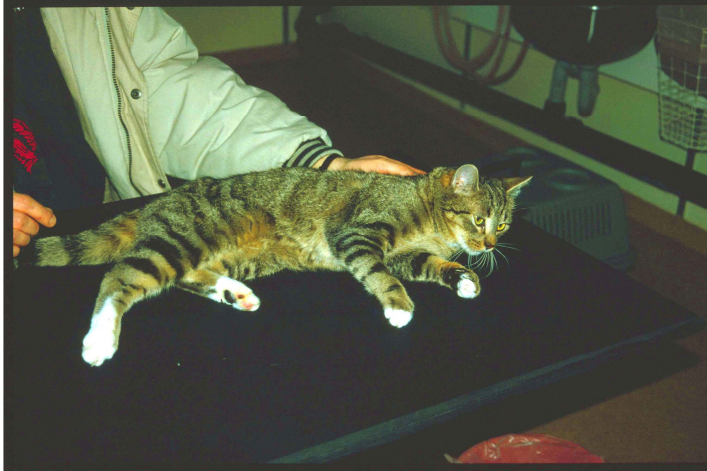
Smittovägen för BDV är inte helt klarlagt. En trolig väg är att viruset infekterar via olfaktoriska receptorceller i det olfaktoriska epitelet. Därifrån sker en axonal transport till olfaktoriska bulben för vidare infektion av hjärnan via dendriter och synapser. I det persistent infekterade djuret kan viruset påvisas i nästan alla organ och även i urinen (Morales et al. 1988).

BDV på katt – vingelsjuka

Vingelsjuka på katt har i Sverige varit känt sedan 1970-talet (Kronevi et al., 1974). Enligt en tidigare undersökning verkar sjukdomen vara mer vanligt på landsbygden och fler hankatter än honkatter verkar drabbas. Dessutom verkar katter som jagar möss ha större predisposition för att utveckla sjukdomen än vad icke-jagande katter har. Detta antyder att gnagare skulle kunna vara en naturlig smittkälla för katter (Berg et al., 1998).

Vingelsjuka karakteriseras av en icke-purulent meningoencefalit. Symptomen hos katt är initialt feber och slöhet. Därpå följer neurologiska symptom i form av ataxi

i bakbenen, stel gång, svårt att dra in klorna samt ett ändrat beteende, såsom ökad tillgivenhet eller aggressivitet (figur 2). Symptomen brukar komma inom en period av tre till fyra veckor. Ofta är sjukdomen fatal. Behandling med kortison kan ibland ge en viss symtomlindring. I sällsynta fall kan de akuta symptomen gå över utan behandling (Lundgren & Berg, 1997).



Figur 2. Katt med vingelsjuka, paralyserad i bakbenen.

Många frågor kring vingelsjuka på katt är ännu obesvarade. Varken smittspridningsvägar eller prevalens är helt klarlagda ännu och hittills finns inget väl fungerande sätt att diagnostisera sjukdomen på levande djur. Denna studie är en början till att försöka få en insikt i huruvida BDV-infektion existerar bland kattpopulationen utanför Mälardalen och att dessutom få en inblick i hur väl diagnostiken fungerar.

MATERIAL OCH METODER

Djur

För att undersöka en eventuell förekomst av borna disease virus hos den normala kattpopulationen i Göteborg och Uppsala, användes utekatter som var friska, över ett år gamla och som hade befunnit sig hela, eller större delen av sitt liv i respektive område. Proverna togs på klinik från katter som kom in för icke sjukdomsrelaterade orsaker, såsom kastration och vaccination. Katter av båda könen ingick i studien. Blodprov togs från perifer ven och blodet samlades upp i EDTA-rör samt även i serum-rör.

PCR

Ett sätt att undersöka om katterna är infekterade med BDV är att med hjälp av PCR leta efter viruset i vita blodceller. Metoden går ut på att man extraherar RNA från viruset i provet, översätter detta till DNA och sedan mångfaldigar DNA:t. Detta körs sedan på en agarosgel och kan där detekteras med hjälp av UV-ljus.

Ett verktyg i diagnostiken är en realtids-PCR, som just nu är under utvecklande (Johansson, 2004). I denna studie kommer denna teknik att användas. Kortfattat går tekniken ut på att man låter två olika prover, specifika mot p24- respektive L-

genen, med var sin färgmarkör binda in till det DNA man vill undersöka. Så länge proberna inte binder in, så avger de inget ljus, då proberna också innehåller en del som hämmar markören att avge signal. Färgmarkörerna detekteras sedan med hjälp av olika våglängder av ljus.

ELISA

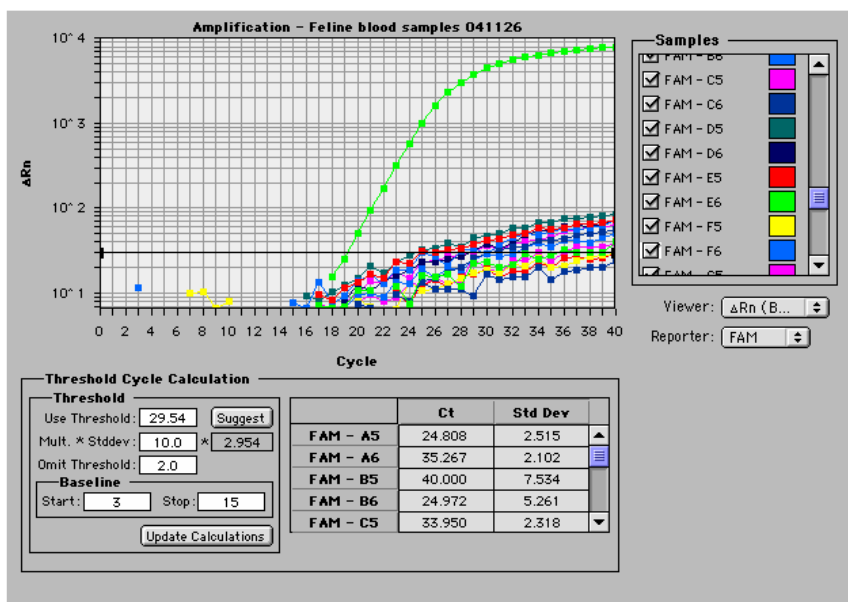
För att undersöka om antikroppar finns mot viruset används två typer av ELISA. Den första är en antikropps-ELISA (Johansson et al., 2002). Som antigen används proteinerna p23, p40 samt som negativ kontroll NP.

Den andra ELISA-metoden är en kombinerad metod för antikropps-, antigen- samt immunkomplexdetektion (Bode et al., 2001). Alla tre bygger på en princip där plattorna först coatas med en antimus-antikropp. Sedan tillsätts en monoklonal musantikropp och därpå, om man vill studera antikropps förekomst, ett virusantigen. Därefter adderar man provet. När antigenet, antikroppen alternativt immunkomplexet har bundit in, tillsätts en antikropp mot antigenet alternativt mot antikropp/antikroppscomplex. Denna antikropp kan i sin tur detekteras med hjälp av substrat och stopplösning eller via ytterligare en antikropp. Denna antikropp är i så fall konjugerad för att kunna detekteras via substrat och stopplösning.

RESULTAT

PCR

Vid analys av proverna med realtids-PCR visade sig alla prover vara negativa (tabell 1). De positiva kontrollerna fungerade utan problem. De positiva kontrollerna översteg tröskelvärdet efter 19 cykler. Proverna följde istället samma utveckling som de negativa kontrollerna (figur 3). Som positiv kontroll användes RNA från BDV-infekterade celler.



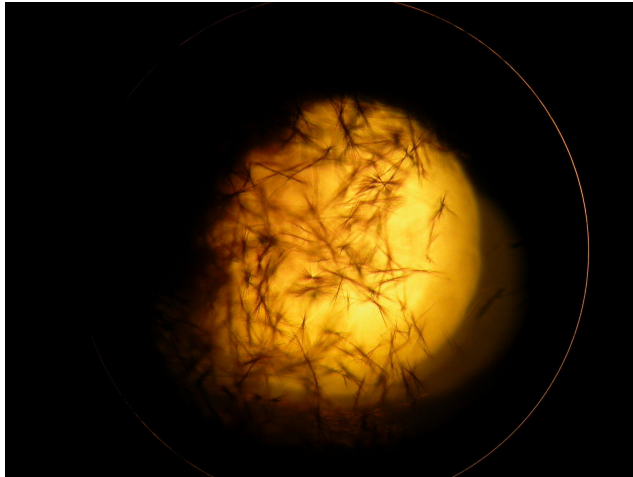
Figur3. Exempel på resultat från realtids-PCR. Grön linje = positiv kontroll.

Tabell 1. Översikt av katter ingående i studien. Prover 1-14 är från Uppsala, prover A-N är från Göteborg.

Katt-ID	Kön	ELISA	PCR
1	Hane	-	negativ
2	Hane	-	negativ
3	Hona	-	negativ
4	Hane	-	negativ
5	Hane	-	negativ
6	Hane	-	negativ
7	Hona	-	negativ
8	Hane	-	negativ
9	Hona	-	negativ
10	Hane	-	negativ
11	Hane	-	negativ
13	Hona	-	negativ
14	Hona	-	negativ
A	Hona	-	negativ
B	Hona	-	negativ
C	Hane	-	negativ
D	Hane	-	negativ
E	Hona	-	negativ
F	Hona	-	negativ
G	Hane	-	negativ
H	Hane	-	negativ
I	Hona	-	negativ
J	Hane	-	negativ
K	Hona	-	negativ
L	Hane	-	negativ
M	Hona	-	negativ
N	Hane	-	negativ
2849 (positiv)	Hane	positiv	-
670/94 (negativ)	Hona	negativ	-

ELISA

För att se hur väl den ELISA som har använts tidigare vid BDV-undersökning fungerade, testades den först enligt det ordinarie protokollet (Johansson et al., 2002). Som primär antikropp användes kaninantikropp i olika spädningar. ELISA:n såg ut att fungera och därför fortsattes testandet av ELISA med antikroppar från katt och häst. Vid dessa försök erhöles dock precipitationer. Även vid nya försök av kanin (dock i högre koncentration av antikroppar än vid första försöket) erhöles precipitationer (figur 4). För att försöka att lösa problemet byttes flera av de ordinarie lösningarna ut. Detta hjälpte dock inte, utan även här erhöles precipitationer.



Figur 4. Bild av precipitationer.

Vid fortsatta tester byttes buffrarna ut mot dem som användes i den kombinerade ELISA:n. Dock behölls bufferten till de sekundära antikropparna och även substrat och stopplösning bibehölls. Vid dessa försök erhöles inga utfällningar. Dock blev det en mycket hög bakgrund, vilket gjorde det omöjligt att skilja på negativa och positiva resultat.

Vid försök med den kombinerade ELISA:n utfördes endast antikroppsvarianten. Även här erhöles en mycket hög bakgrund, vilket gjorde att det inte gick att urskilja de negativ resultaten från de positiva.

På grund av tidsbrist utfördes inte fler tester.

DISKUSSION

Dessa undersökningar ger inget belägg för att BDV på katt förekommer utanför Mälarenregionen. Givetvis kan det dock inte uteslutas. Provunderlaget är inte tillräckligt stort för att representera hela kattpopulationen. Dessutom är ELISA-resultaten inte tillförlitliga. Det är ju framförallt denna metod som visar att individen eventuellt har stött på viruset, då denna metod påvisar antikroppar.

Idag finns inte något riktigt bra sätt att diagnosticera vingelsjuka på levande katter. Hittills har man varit tvungen att förlita sig på obduktion för att ställa

diagnos. Den Realtids-PCR som är under utveckling är dock ett stort steg på väg för att kunna diagnostisera sjukdomen på levande katter. Detta är också av stor betydelse för epidemiologiska studier. Att vi fick ett negativt resultat på de proverna vi hade, från både Uppsala och Göteborg, var ganska väntat. PCR-undersökningen visar på en eventuell förekomst av viruset. De katter prover togs på var friska katter utan symptom på sjukdom. Därför är det inte heller så troligt att de skulle ha viruset i blodet, eller åtminstone inte i så hög koncentration att det skulle upptäckas i en PCR. Det är inte heller helt klarlagt om blodprov är det bästa provet för analys med PCR. Forskning pågår om huruvida det vore mer lämpligt med exempelvis tårvätska eller prov från nosselemlinna som provmaterial.

När det gäller ELISA:n, var det helt oväntat att den inte fungerade som den skulle. Den har fungerat tidigare (Johansson et al., 2002) och därför borde det inte ha varit några problem att använda den igen. Det finns flera olika teorier om varför den inte fungerade vid våra försök. En av dessa är att det var något med de sekundära antikropparna som reagerade annorlunda än vad de skulle ha gjort. En annan teori var att substrat och stopplösning inte fungerade normalt. Inga av dessa teorier gick dock att klart belägga, trots upprepade tester av de ingående reagenserna. Vid försök med att addera de två olika ELISA-metoderna (buffrar från den kombinerade ELISA:n och sekundära antikroppar samt substrat och stopplösning från den ordinarie ELISA:n) verkade det som om problemet med utfällningarna var lösta. Detta tyder på att något med buffertlösningarna till den ordinarie ELISA:n inte fungerade som de skulle. Detta skulle kunna bero på ett annorlunda pH i lösningarna, vilket i sin tur gör att något i reagenserna kan fällas ut. Att addera de två ELISA-metoderna verkar ge ett problem med för hög bakgrund. Detta gör att det inte går att urskilja negativa och positiva resultat, då alla ger en reaktion och ett färgslag. Detta skulle kunna bero på att ospecifik bindning av antikroppar sker. Kanske skulle detta kunna lösas med att blockera ordentligt. Ett blockeringssteg ingår inte i den kombinerade ELISA:n.

Det är tidigare känt att naturligt sjuka och även experimentellt infekterade katter har låga titrar av antikroppar mot BDV (Nakamura et al., 1996). Kanske finns det andra prover än blodprov som är bättre för att påvisa BDV hos katt. Detta behöver utredas vidare. Det är även av intresse att undersöka huruvida andra arter av djur, såsom fåglar och gnagare, inom andra områden än Mälardalen eventuellt är bärare av viruset.

Sammanfattningsvis kan man konstatera att det behövs vidare forskning och studier kring ämnet BDV. Inte bara vad avser diagnostik, utan också när det gäller epidemiologi.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Berg, A-L., Reid-Smith, R., Larsson, M. & Bonnett, B. 1998. Case control study of feline Borna disease in Sweden. *The veterinary record* 142, 715-717.
- Berg, M., Johansson, M., Montell, H & Berg, A-L. 2001. Wild birds as possible natural reservoir of Borna disease virus. *Epidemiology and infections* 127, 173-178.
- Bode, L., Reckwald, P., Severus, W.E., Stoyloff, R., Ferszt, R., Dietrich, D.E. & Ludwig, H. 2001. Borna disease virus-specific, circulating immune complexes, antigenemia, and free antibodies – the key marker triplet determining infection and prevailing in severe mood disorders. *Molecular Psychiatry* 6, 481-491.
- Briese, T., de la Torre, J.C., Lewis, A., Ludwig, H. & Lipkin, W.I. 1992. Borna disease virus, a negative-strand RNA virus, transcribes in the nucleus of infected cells. *Proceedings of National Academy of Sciences* 89, 11486-11489.
- Dürrwald, R. & Ludwig, H. 1997. Borna disease virus (BDV), a (zoonotic?) worldwide pathogen. A review of the history of the disease and the virus infection with comprehensive bibliography. *Journal of veterinary medicine B* 44, 147-184.
- Johansson, J. 2004. Development of a real-time PCR for in vivo diagnosis of feline Borna disease, 9-23.
- Johansson, M., Berg, M. & Berg, A-L. 2002. Humoral immune response against Borna disease virus (BDV) in experimentally and naturally infected cats. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 90, 23-33.
- Kronevi, T., Nordström, M., Moreno, W. & Nilsson, P.O. 1974. Feline ataxia due to nonsuppurative meningoencephalomyelitis of unknown aetiology. *Nordisk veterinärmedicin* 26, 720-725.
- Lundgren, A-L. & Berg, M. 1997. Bornavirus: ett neurotropt agens på frammarsch? *Svensk veterinärtidning* 49, 269-275.
- Morales, J.A., Herzog, S., Kompter, C., Frese, K. & Rott, R. 1988. Axonal transport of Borna disease virus along olfactory pathways in spontaneously and experimentally infected rats. *Medical microbiology and immunology* 177, 51-68.
- Nakamura, Y., Asahi, S., Nakaya, T., Bahmani, M.K., Saitoh, S., Yasui, K., Mayama, H., Hagiwara, K., Ishihara, C. & Ikuta, K. 1996. Demonstration of Borna disease virus RNA in peripheral blood mononuclear cells derived from domestic cats in Japan. *Journal of clinical microbiology* 70, 188-191.
- Nishino, Y., Funaba, M., Fukushima, R., Mizutani, T., Kimura, T., Iizuka, R., Hiram, H., & Hara, M. 1999. Borna disease virus infection in domestic cats: evaluation by RNA and antibody detection. *Journal of veterinary medical sciences* 61, 1167-1170.
- Nowotny, N., Kolodziejek, J., Jehle, C.O., Suchy, A., Staeheli, P. & Scwemmele, M. 2000. Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *Journal of virology* 74, 5655-5658.
- Tomonaga, K., Kobayashi, T. & Ikuta, K. 2002. Molecular and cellular biology of Borna disease virus infection. *Microbes and infection* 4, 491-500.