



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Tillgängliga metoder för att diagnosticera Bornasjuka hos häst

Åsa Järnberg

Självständigt arbete i veterinärmedicin, 15 hp

Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 74

Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Uppsala 2010



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap

Tillgängliga metoder för att diagnosticera Bornasjuka hos häst

Methods available for diagnosing Borna disease in horses

Åsa Järnberg

Handledare:

Mikael Berg, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, avd. för parasitologi och virologi

Examinator:

Désirée S. Jansson, SLU, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Omfattning: 15 hp

Kurstitel: Självständigt arbete i veterinärmedicin

Kurskod: VM0068

Program: Veterinärprogrammet

Nivå: Grund, G2E

Utgivningsort: SLU Uppsala

Utgivningsår: 2010

Omslagsbild: -

Serienamn, delnr: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen Nr. 2010: 74
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, SLU

On-line publicering: <http://epsilon.slu.se>

Nyckelord: Bornasjuka, Bornavirus, Häst, Diagnostik, Metoder

Key words: Borna disease, Borna virus, Horse, Diagnosis, Methods

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	1
Inledning	1
Material och metoder	2
Litteraturöversikt	2
Klinisk bild	2
Serologi	4
Histopatologi.....	5
Påvisande av antigen	6
Infektivitetstest.....	7
Diskussion	8
Litteraturlförteckning	9

SAMMANFATTNING

Det saknas idag metoder för att med säkerhet fastställa diagnosen Bornasjuka *intra vitum*. För att få en så säker diagnos som möjligt krävs fortfarande histopatologiska belägg och påvisande av virus i material från centrala nervsystemet, vilket ej kan tas från levande djur. Trots det finns det en risk att det intracellulära viruset undgår detektion då infekterade celler ej är jämt fördelade i hjärnan. De kliniska symtomen är specifika enbart för infektion i centrala nervsystemet och inte för Bornasjuka. Att förlita sig på antikroppar är osäkert på grund av låg titer som kan göra testen mindre tillförlitliga. Hos häst är det även vanligt att djuren trots påvisade antikroppar i serum aldrig utvecklar några andra symtom. Risken med PCR är kontaminering som kan ge falska positiva resultat, samt falerande primers. En annan fara är nya stammar av viruset som avviker i den sekvens som primrarna är riktade mot och därigenom kan undgå upptäckt. PCR kan användas på perifert blod, men det är en osäker metod som inte kan rekommenderas i diagnostiskt syfte. Bättre är att ta prover från hjärnan.

SUMMARY

Until this date there is a lack of reliable methods available for the diagnosis of Borna disease *intra vitum*. Histopathological evidence still seems to be the best way to confirm presence of the virus, although the neurological material needed cannot be obtained from living animals. However, there is a risk of the virus escaping detection as infected cells are not homogeneously distributed throughout the brain. Clinical symptoms associated with Borna disease are specific only for an infection of the central nervous system and not for the virus in particular. Detection of antibodies is unreliable because of low titers. Furthermore it is common in horses tested positive for antibodies that they never display any further symptoms. With sensitive methods such as PCR there is a risk of contamination or failing primers. New subtypes of the virus might avoid detection because of mutation in the sequence targeted by the primers. PCR can be used on peripheral blood, but using brain material is more accurate.

INLEDNING

Bornasjuka orsakas av ett virus som först upptäcktes i närheten av staden Borna i Tyskland. Huvudsakligen förekommer sjukdomen på häst och får i vissa delar av Tyskland men viruset har även isolerats hos många andra varmblodiga arter, inklusive människa, apor, getter, hund och katt. Infektionen kan vara subklinisk eller leda till neurologiska anomalier och död (Staehele et al 2000, Dauphin et al 2002). Det har även gjorts studier på människa som indikerar att det kan finnas ett samband mellan Bornavirus och psykisk sjukdom (Yamaguchi et al 1999, Richt et al 1997).

Bornavirus (BDV) har ett genom som utgörs av osegmenterat enkelsträngat RNA. Replikationen sker i cellkärnan hos infekterade nervceller och det är även där det mesta antigenet kan påträffas (Cubitt & de la Torre 1994, Gosztonyi & Ludwig 1984). BDV är strikt neurotropiskt, icke cytolytiskt och replikerar långsamt. Gensekvensen är mycket stabil över tiden (Dauphin et al 2002).

Genomet har 6 open reading frames (ORFs) och delas in i tre transkriptionsenheter. Den första kodar för nukleoproteinet N (p40 eller p38), den andra för proteinet X samt fosfoproteinet P (p24) som är en co-factor till enzymet polymeras. Den tredje transkriptionsenheten kodar för matrixprotein M, membranprotein GP och RNA-polymeras L (Dauphin et al 2002). Benämningarna p24 och p40 har tillkommit på grund av molekylernas storlekar i kDa och i litteraturen syftar dessa benämningar oftast på nukleotidsekvenserna och inte proteinerna de kodar för. Just p24 och p40 används ofta som målsekvenser vid detektion av antigen från BDV på grund av att de är mycket oförändrade mellan olika virusstammar. Dessa mRNA-sekvenser uttrycks även i relativt höga nivåer i infekterade celler, vilket gör dem lättare att påvisa än andra (Schneider et al 1994). I vissa studier användes även p14 som kodar för matrixprotein M (Katz et al 1998).

Detta intracellulära virus har länge varit känt. Det isolerades första gången 1929 ((Zimmermann et al 1994), men sjukdomen har man känt till sedan långt tidigare. Men hur diagnostiserar man egentligen ett virus som förökar sig i cellkärnorna i centrala nervsystemets neuroner och som dessutom replikerar mycket långsamt? Det var frågan jag ställde mig när jag för första gången kom i kontakt med detta mycket intressanta virus. Denna studie kommer därför att diskutera de olika metoder som finns tillgängliga och för och nackdelar med dessa.

MATERIAL OCH METODER

En sökning i webb of knowledge med sökorden Topic=(borna OR bornaviridae) AND Topic=((horse* OR equine OR mare* OR stallion*)) AND Topic=(disease OR virus OR infection) AND Topic=(diagnos* OR diagnostic* OR treatment OR treated) AND Topic=(METHOD*) gav efter begränsning till engelska 72 träffar. Därefter användes referenslistorna i bland annat de reviewartiklar som återfanns i den första sökningen för att hitta relevanta studier. Ett mycket stort antal artiklar fanns tillgängligt, men på grund av tidsbrist och restriktioner vad gäller arbetets storlek kunde långt ifrån alla behandlas i denna litteraturstudie.

LITTERATURÖVERSIKT

Klinisk bild

Kliniska tecken hos naturligt eller experimentellt infekterade djur varierar med djurslag och virusstam. Inkubationstiden kan vara från 2 veckor till några månader (Dauphin et al 2002). Hos hästar verkar BDV ge subklinisk infektion i de flesta fallen eftersom BDV-specifika antikroppar frekvent detekteras hos kliniskt friska hästar (Richt et al 1997). Det har även förekommit att seropositiva hästar funnits vara negativa för BDV då viruset inte gått att påvisa på något annat sätt, trots att de uppvisat symtom som anses klassiska för Bornasjuka (Heden et al 1999).

Vid klinisk sjukdom uppvisar hästarna en rad olika symtom, främst beteendestörningar, apati och problem med rörelseapparaten. Vanligen ses först inkoordination följt av paralyt och död. Dessa symtom är inte specifika för just Bornasjuka, utan uppkommer generellt hos djur där mikroorganismer invaderat CNS. (Staheli et al 2000, Narayan et al 1983, Zimmermann et al 1994)

Under sjukdomens initiala fas ses ospecifika symtom som hypertermi, anorexi, kolik och förstoppning. Under akutfasen ger meningoencephaliten upphov till neurala symtom. Dessa kan yttra sig som ataxi, onormala kroppsställningar, proprioceptiv dysfunktion (förlust av kroppens förmåga att orientera sig utan visuella ledtrådar) samt repetitiva rörelser som bruxism (tandgnissling), trismus (oförmåga att öppna munnen), strabismus (vindögdhet), nystagmus (ofrivilliga ryckningar ögonen) och myosis (kontraktion av pupillen). Hästarna kan även reagera onormalt på yttre stimuli, till exempel med hyperexcitation, aggression, letargi, dåsigthet och nedsatt svar på stimuli som beröring och smärta (Dauphin et al 2002).

I sjukdomens slutfas kan paralyt uppkomma, eventuellt följt av kramper. Ofta pressar hästarna sitt huvud till exempel mot väggar och andra ytor utan synbar anledning. Detta tros bero på förhöjt tryck av cerebrospinalvätskan till följd av den inflammatoriska processen i CNS. Ofta lägger sig hästarna ned. Döden inträder ofta efter en till tre veckor efter att djuren börjat uppvisa neurologiska symtom och dödligheten hos hästar med klinisk infektion är hög. Hos djur som överlevt akutfasen kan de kroniskt infekterade djuren drabbas av återfall under resten av livet. Dessa återfall kan ta sig uttryck som depression, apati, dåsigthet och skygghet, ofta efter att djuret utsatts för stress. Hos vissa arter har det förekommit att djur varit infekterade hela sin livslängd utan att någonsin visa symtom (Dauphin et al 2002).

Ibland ses ett plötsligt utbrott av pyrexia precis innan djuren börjar uppvisa neurologiska symtom. I en studie av Katz et al från 1998 infekterades 3 ponnyer med bornavirus och två av tre uppvisade feber omedelbart innan tecken på neurologisk dysfunktion uppkom. Under de följande 3-16 dagarna uppvisade alla tre djuren symtom som ataxi och cirkelgång, hästarna intog onaturliga kroppsställningar, de lutade huvud och nacke, drabbades av muskelryckningar och på vissa hudtyper utvecklade de ökad känslighet för sensoriska stimuli såsom smärta och beröring. Alla tre ponnyer verkade även omedvetna om omgivningen och upprepade motoriska beteenden som att smacka med läpparna och nicka med huvudet. Två av försöksdjuren avlivades då de 72 timmar efter att ha börjat uppvisa neurologiska symtom blev liggande utan att kunna resa sig eller döende. Den tredje ponnyns tillstånd stabiliserades och återgick till så gott som normal under ca 2 veckor. Efter denna tid blev den gradvis aggressiv och hyperaktiv och avlivades sedan.

Skadorna som orsakar uppkomsten av kliniska symtom anses uppstå till följd av samverkan mellan virusreplikation och värdens immunsvaret enligt experimentella försök på immunsupprimerade respektive friska råttor (Staheli et al 2000, Richt et al 1997, Vahlenkamp et al 2000, Dauphin et al 2002).

Serologi

Diagnos *in vivo* ställs vanligen genom att påvisa BDV-specifika antikroppar (Vahlenkamp et al 2000). Antikroppar med specificitet för BDV kan påvisas i sera eller cerebrospinalvätska (CSV) med hjälp av metoder som indirect immunofluorescens assay (IFA) Och enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Yamaguchi et al 1999, Herden et al 1999, Staeheli et al 2000).

Antikroppar förekommer vanligen i låg titer i både serum och CSV. I ett försök av Narayan et al. 1983 visade sig antikroppstitern i CSV vaar 4-8ggr lägre än i serum, vilket gör det svårare att detektera dem. Antikroppar brukar kunna påvisas under sjukdomens akutfas, men det är mycket svårt att upptäcka dem hos djur med subakut eller kronisk sjukdom (Dauphin et al 2002). I litteraturen råder delade meningar om vilken metod för detektion av antikroppar som är mest tillförlitlig av ELISA, IFA och blotting.

Vid blotting försöker man att visualisera en viss makromolekyl i en komplex blandning. Molekylerna separeras först med gelelektrofores. Därefter tillsätter man en markör som märkts med enzymer eller radioaktivitet och som kan binda till målmolekylen. Det finns olika sorters blotting som är riktade mot olika typer av molekyler. Med Southern blotting vill man till exempel påvisa DNA, medan man med western blotting söker ett visst protein. Southern blotting är uppkallat efter sin skapare Edward Southern och de övriga metoderna är uppkallade western, northern och eastern blotting som en anspelning på hans namn (Protocol online)

Tabell 1. Resultat av serologisk analys av tre ponnyer med ELISA, Immunofluorescens och western blotting, data från Katz et al 1998

Ponny nr	Immunofluorescens	ELISA	Western blotting
1	Svagt positiv	Negativ	Reagerade med p14 och p24
2	Svagt positiv	Svagt positiv	Reagerade med p14 och p24
3	Positiv	Positiv	Reagerade med p14, p24 och p38-40

I Katzs et al försök från 1998 pekade resultatet på att immunofluorescens och western blotting är känsligare metoder än ELISA vid detektion av antikroppar. I studien användes tre ponnyer som innan försöket var seronegativa i upprepade tester med ELISA, indirect immunofluorescens (IF) och western blotting (immunoblot). Då ponnyerna avlivades efter sjukdomens akutfas var den första svagt positiv med IF och western blotting, men var negativ för ELISA. Den andra ponnyn var marginellt positiv för IF och ELISA samt positiv för western blot. Den tredje ponnyn som inockulerats med den lägsta infektionsdosen serokonverterade samtidigt som de andra två, men återhämtade sig sedan från de neurologiska symtomen. Under konvalescensen steg antikroppstitern stadigt. För IF nådde den 1:12,000 vid

studiens slut (ponnyn avlivades) och 1:5,120 för ELISA. Även den sista ponnyn var positiv med western blotting (se tabell 1).

I en annan studie gjordes försök att detektera antikroppar hos experimentellt infekterade råttor vid olika stadier av sjukdomen med ELISA, IFA och western blot. Resultatet utpekade ELISA som den känsligaste metoden då endast den lyckades detektera antikroppar hos djuren i sjukdomens initiala skede, innan de första symtomen bröt ut (Briese et al 1995). Dessa två studier är exempel på de motstridiga resultat som beskrivs i litteraturen vad gäller känsligheten hos metoder för detektion av antikroppar mot BDV. En av orsakerna kan vara den vanligen låga antikroppstitern. En annan möjlig förklaring till de varierande resultaten kan vara skillnader i sensitivitet på de olika cellsystemen i laboratorer där försöken utfördes enligt Staeheli et al 2000.

Nackdelarna med IFA som diagnostiskt verktyg är att det inte framgår vilka virala proteiner som orsakat immunreaktiviteten. Enligt Briese et als studie från 1995 är IFA dessutom mindre känslig för låga titrar är ELISA, vilket gjorde att man inte kunde detektera infektion hos råttorna innan de kom in i sjukdomens akutfas. Nackdel med WB är att det är en dyr och tidskrävande metod även om den är relativt pålitlig och specifik. Den lämpar sig därför inte för serologisk screening i stor skala (Yamaguchi et al 1999). ELISA är som metod billig och snabb och fungerar därför bättre att använda i storskaliga studier. Medan IFA och western blot kan ta 2 dagar att slutföra hinner man med ELISA på några timmar analysera hundratals serumprov med minimal utrustning (Briese et al 1995).

Inför studien som gjordes av Katz et al 1998 testades ponnyer serologiskt för att finna tre individer som kunde anses fria från smitta. Av 12 årsgamla synbart friska ponnyer som testades med immunoblot reagerade sera från 4 ponnyer med antigenet p24. Ponnyerna hade varken kliniska tecken på eller historik av BDV och borde därför inte utsatts för smitta. Att dessa djur skulle vara positiva för antikroppar var mycket oväntat. En möjlighet är att antigenic mimicry orsakade falska positiva resultat. Om så är fallet skulle det ytterligare kunna försvåra serologisk diagnostik.

Histopatologi

På häst förknippas Bornavirusinfektion med nonpurulent meningoencephalit i den grå substansen med perivaskulära infiltrat av mononukleära celler (cuffing). I vissa fall ses i samband med inflammationen se en ökning av antalet astrocyter (Herden et al 1999, Gosztonyi & Ludwig 1984, Narayan et al 1983, Katz et al 1998). Bornavirus påvisas i störst mängd och mest frekvent i prover från hippocampus, bulbus olfactorius, delar av hjärnbarken och thalamus samt hypothalamus. I cerebellum är vanligen inflammationen mindre uttalad eller helt frånvarande (Zimmermann et al 1994, Herden et al 1999, Staeheli et al 2000, Gosztonyi & Ludwig 1984, Narayan et al 1983).

En annan indikation är de patognomona Joest-Degen inklusionskroppar i kärnan på infekterade neuron (Gosztonyi & Ludwig 1984, Staeheli et al 2000, Katz et al 1998). De återfinns företrädesvis i hippocampus hos häst. Immunohistologiska analyser av

paraffinbehandlade hjärnsektioner men antikroppar mot de två huvudsakliga antigenen p40 och p24 har visat att de infekterade cellerna är osymmetriskt utspridda över parenchymet. Hos vissa djur med tydliga neurologiska symtom har endast ett mycket litet antal infekterade celler gått att påvisa, vilket indikerar att det finns en risk att viruset kan undgå detektion med denna metod (Staehele et al 2000).

För att öka sensitiviteten vid mikroskopering kan det vara möjligt att använda märkta monoklonala antikroppar (immunohistokemi) påvisa förekomsten av vissa virala proteiner i nukleus – ofta p24 och p40 (Herden et al 1999, Staehele et al 2000, Dauphin et al 2002). Denna metod förlitar sig på ett välbevarat genom med mycket små förändringar i strukturen hos målproteinet. Trots att virus isolerats från provmaterialet har det förekommit fall där målproteinet (p40) inte gått att detektera med immunohistokemi. När istället polyklont BDV-specifikt antiserum användes var det möjligt att påvisa antigenet, vilket indikerar att det finns BDV-varianter med variationer i antigenuttrycket (Herden et al 1999). Detta innebär att konfirmering av diagnosen med immunohistokemi blir mer osäker (Staehele et al 2000).

För att tydligt skilja bornasjuka från andra infektioner i CNS bör virusförekomst påvisas, till exempel genom infektivitetstest (Staehele et al 2000).

Påvisande av antigen

Sedan de la Torre och Cubitt 1994 fastslog att genomet består av negativt ssRNA har det varit möjligt att använda sig av Reversed-Transkriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) för att påvisa nukleinsyra från bornavirus i vävnadsprover (Cubitt & de la Torre 1994). Tekniken kan användas på prover från både blod och hjärna (Dauphin et al 2002). Vävnadsproverna kan vara färska, men det går även att använda bevarade vävnader som fixerats med formalin och bäddats in i paraffin (Sorg & Metzler 1995). Eftersom viruset utsöndras dåligt är det inte tillförlitligt att ta prover från till exempel tårvätska och nossekret (Rich et al 1993).

I försök på möss, råttor och människa har p40-RNA isolerats ur perifert blod (Vahlenkamp et al 2000). Vid PCR av blod är målet att detektera virus i PBMC (peripheral blood mononuclear cells), men det är en osäker metod. Det har visat sig att den virala belastningen i blodet inte speglar halterna av virus i hjärnan vilket kan ge en missvisande bild (Sauder & de la Torre 1997, Vahlenkamp et al 2000).

På grund av bristande precision i de virala RNA-beroende RNAPolymerasen har de flesta ssRNA-virus en divergens i nukleotidsekvensen som motsvarar 10^3 till 10^4 för varje site och replikationsomgång (Hatalski et al 1997). Bornavirus är däremot känt för att vara mycket stabilt. Sedan det först isolerades 1929 tycks det inte genomgå stora förändringar. Jämförelser med ”nyligen” isolerade stammar har visat mycket små skillnader i kodande sekvenserna p40 och p24 (<5% skillnad i nukleotidsekvensen och <3% i aminosyrasekvens) (Schneider et al 1994, Richt et al 1997, Nowotny et al 2000). För att PCR ska vara effektivt krävs stabilt genom så att de primers man använder passar för alla olika virusstammar. Risken är att om nya subtyper dyker upp som är muterade i just de sekvenser som används som primers (vanligen i p40 och p24) kan dessa virus undgå detektion genom PCR (Staehele et al

2000). Så var fallet med en stam som isolerades från en ponny i Österrike och beskrevs av Nowotny et al 1998. Denna stam kunde inte detekteras med de på rutin använda primers som vanligen ger resultat. Först när de dåligt matchande primrarna byttes ut blev svaret positivt. Vid jämförande mot de vanliga referensstammarna V (isolerat från häst 1929) och He/80 (isolerat från häst 1980) skilde sig genomet med mer än 15% i nukleotidsekvensen.

Även med en känslig metod som RT-PCR är det möjligt att undgå att detektera virus hos en bevisligen infekterad individ (Herden et al 1999). För att öka specificiteten kan nukleinsyran amplifieras ytterligare med hjälp av en andra omgång primers, så kallad RT-nested PCR. Med Southern blot som underlättar detektionen av den amplifierade nukleinsyran är det möjligt öka sensitiviteten upp till 100 gånger jämfört med vanligt RT-PCR (Zimmermann et al 1994 och Sauder & de la Torre 1998). Enligt en studie av Mizutani et al från 1999 är den lägsta detektionsgränsen för nested RT-PCR 10 kopior av RNA i ett prov. Mest antigen påträffas i hippocampus och bulbus olfactorius, varför provtagning bör ske från dessa områden (Zimmermann et al 1994).

Jämfört med andra är PCR en känslig metod för att påvisa virus. I ett experiment som utfördes av Zimmermann et al 1994 påvisades nukleinsyra från bornavirus med RT-nested PCR i material från alla de hjärnor (från hästar, får och åsnor som uppvisat klassiska tecken på infektion av bornavirus) som ingick i försöket. Dock var det bara möjligt i ca 30% av dessa att påvisa infektiöst virus eller antikroppar med hjälp Av IFA. Risken med RT-PCR och särskilt nested RT-PCR är felaktiga resultat på grund av fallerande primers eller korskontaminering (Hatalski et al 1997). Med flera amplifieringssteg ökar risken för kontamination. En risk kan vara hanteringen då den första PCR-produkten överförs till den andra PCR-lösningen. Det är därför önskvärt att finna en modell som är lika känslig som nested RT-PCR, men som går att utföra i ett enda steg: så kallad single-step RT-PCR (Mizutani et al 1999).

Syntetiskt BDV-RNA har tagits fram för att öka säkerheten vid RT-nested PCR och undvika användningen av en BDV-positiv kontroll som ger ökad kontamineringsrisk. Dessa molekyler (p40INS) är nästan identiskt med den naturliga nukleotidsekvensen (p40) som används som målsekvens vid RT-PCR och amplifieras därför av samma primers. Skillnaden är 56 nukleotider som tillförts mitt i sekvensen, vilket gör den större och därför möjlig att skilja från den naturliga p40 via gelelektrofores. Genom att använda sig av p40INS är det möjligt att utvärdera känsligheten i testet utan att öka risken för falska positiva resultat från den positiva kontrollen (Sauder & de la Torre 1997, Dauphin et al 2002).

Infektivitetstest

Vid infektivitetstest eller inockulering visas att det virus som finns i misstänkt smittat material är kapabelt till att infektera andra djur. Detta sker genom att överföra materialet till mottagliga celler, till exempel Feotal Rabbit Brain cells, Veroceller (njurceller från apa), eller MDCK (njurceller från hund). Metoden är dock inte helt tillförlitligt - ibland misslyckas testet även om diagnosen har ställts med hjälp av histopatologiska och immunohistologiska fynd (Dauphin et al 2002, Herden et al 1999, Staeheli et al 2000).

Klassiska metoder för att isolera virus är inte tillräckligt känsliga på grund av den låga förekomsten av virala partiklar (Dauphin et al 2002). Eftersom det är så svårt att påvisa infektiöst virus anses det oftast tillräckligt att påvisa virusspecifika antikroppar eller antigen (Richt et al 1993).

DISKUSSION

BDV är inte lätt att diagnosticera *intra vitum* eftersom viruset gömmer sig i hjärnans neuroner, det utsöndras inte i stor utsträckning och ger inte upphov till höga antikroppstitrar. Diagnostiken är en känslig balansgång mellan säkerhet och sensitivitet. Det som önskas är en metod som inte riskerar att missa BDV (tillexempel serologi eller kliniska symtom), samtidigt som den inte riskerar att ge falska positiva svar på grund av att sensitiviteten är så hög att kontaminationsrisken ökar (tillexempel PCR).

Det finns för- och nackdelar med alla de metoder som idag finns tillgängliga. Testernas känslighet kan ökas genom metoder som Southern blotting och immunhistokemi, men utfallen är ändå osäkra. Ingen metod finns som med närmast 100% säkerhet kan avgöra om en individ är infekterad av BDV eller inte. Med histopatologi finns risken att virus missas, trots att det faktiskt finns där (falska negativa svar) och med känsliga metoder som PCR finns risken för falska positiva resultat. Med histopatologi är det möjligt att verkligen kan se viruset i parenchymet, varför det verkar vara en av de bästa metoderna för att sätta diagnos, gärna i kombination med immunohistokemi och PCR för att vara så säker som möjligt på att virala partiklar inte förbises. Detta är dock inte möjligt att utföra på levande djur eftersom det kräver material från viktiga delar av hjärnan.

De provmaterial man har att tillgå på levande djur är helblod och sera. PCR på PBMC som diagnostiskt verktyg är mycket osäker, vilket gör att sera och kliniska symtom är allt som finns att förlita sig på för en *intra vitum* diagnos. Frågan är dock hur mycket man törs sätta sin tillit till de svar som fås med serodiagnostik på grund av de låga antikroppstitrarna. Som grund för en säker diagnos väger kanske kliniska symtom och serologi inte särskilt tungt. På hästar hittas ju såväl friska hästar positiva för antikroppar som sjuka hästar där antikroppar inte kan påvisas och kliniska symtom är för generella. Finns det idag inte mycket alternativ för att fastställa diagnosen på levande djur.

Eftersom genomet hos Bornavirus är så välbevarat efter passage även mellan olika djur kan det vara svårt att spåra smittvägar genom att identifiera olika stammar. Att hitta säkra metoder utan risk för falska positiva och negativa svar är därför mycket viktigt, inte bara för diagnosticering utan även för vidare epidemiologiska studier. Detta skulle vara av intresse inte bara inom veterinärmedicinen utan även för att räta ut de frågetecken finns vad gäller humana infektioner.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Briese, T., Hatalski, C.G., Kliche, S., Park, Y.S., Lipkin, W.I. (1995). Enzyme-Linked Immunosorbent assay for detecting Antibodies to borna disease virus-specific proteins. *J. of clinical microbial.* Feb: 348-351
- Caplazi, P., Ehrensperger, F. (1998). Spontaneous Borna disease in sheep and horses: immunophenotyping of inflammatory cells and detection of MHC-I and MHC-II antigen expression in Borna encephalitis lesions. *Veterinary Immunology and Immunopathology.* 61:203-220
- Cubitt, B. & de la Torre, J. (1994). Borna disease virus (BDV), a nonsegmented RNA virus, replicates in the nuclei of infected cells where infectious ribonucleoproteins are present. *J. of virology,* 68: 1371-1381
- Dauphin, G., Legay, V., Pitel, P.H., Zientara, S. (2002). Borna Disease: Current knowledge and virus detection in France. *Vet. Res.* 33: 127-138
- Gosztanyi, G. & Ludwig, H. (1984). Borna disease of horses. An immunohistological and virological study of naturally infected animals. *Acta Neuropathologica* 64: 213-21
- Hatalski, C. G., J Lewis, A., Lipkin, W. I. (1997). Borna Disease. *Emerging infectious diseases.* Vol. 3. No. 2. 129-135
- Herden, C., Herzog, S., Wehner, T., Zink, C., Richt, J. A., Frese, K. (1999). Comparison of different methods of diagnosing Borna disease in horses post mortem. *Equine Inf. Dis.* 8: 286-290
- Katz, J. B., Alstad, D., Jenny, A. L., Carbone, K. M., Rubin, S. A., Waltrip, R. W., II. (1998). Clinical, serologic and histopathologic characterization of experimental Borna disease in Ponies. *J. Vet. Diagn. Invest.* 10:338-343.
- Mizutani T, Nishino Y, Kariwa H, Takashima I. (1998). Reverse transcription-nested polymerase chain reaction for detecting p40 RNA of Borna Disease Virus, without Risk of plasmid Contamination. *J. of Veterinary medical science.* Vol. 61. Issue: 1. 77-80
- Mizutani T, Ogina M, Nishino Y, Kimura T, Inagaki H, Hayasaka D, Kariwa H, Takashima I. (1999). Single step reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection of Borna virus RNA in vitro and in vivo. *Japanese journal of veterinary research.* 46(4): 156-169.
- Narayan, O., Herzog, S., Freze, K., Scheefers, H., Rott, R. (1983). Pathogenesis of borna disease in Rats: immune-mediated Ophthalmoencephalopathy causing blindness and behavioural abnormalities. *The Journal of Infectious Diseases.* Vol. 148 no. 2: 305-315
- Nowotny, R., Kolodziejek, J., Jehle, C.O., Suchy, A., Staeheli, P., Schwemmele, M. (2000). Isolation and characterization of a new subtype of Borna disease virus. *J. of Virology.* Volume: 74 Issue: 12 Pages: 5655-5658
- Richt, J. A., Herzog, S., Habertztl, K., Rott, R. (1993). Demonstration of borna disease virus-specific RNA in secretions of naturally infected horses by the polymerase chain reaction. *Med. Microbiol. Immunol.* 182: 193-304
- Richt, J. A., Pfeuffer, I., Christ, M., Frese, K., Bechter, K., Herzog, S. (1997). Borna disease virus infection in animals and humans. *Emerging infectious diseases.* Vol 3. No 3. 343-352
- Sauder, C. & de la Torre, J. C. (1998). Sensitivity and reproducibility of RT-PCR to detect Borna disease virus (BDV) RNA in blood: implications for BDV epidemiology. *J of virology.* 71: 229-245

Schneider, P.A , Briese, T., Zimmermann, W., Ludwig, H., Lipkin, W. I.(1994). Sequence conservation in field and experimental isolates of Borna disease virus. *J of virology* 68: 63-68

Vahlenkamp, T.W , Enbergs, H.K., Müller, H. (2000). Experimental and natural borna disease virus infections: presence of viral RNA in cells of the peripheral blood. *Vet. Microbiol.* 76: 229-244-

Sorg, I. & Metzler, A. (1995). Detection of Borna disease virus RNA in Formalin-Fixed Paraffin-Embeddes brain tissue by nested PCR. *Journal of clinical microbiology.* Vol. 33, No. 4: 821–823

Yamaguchi, K., Sawada, T., Naraki, T., Igata-Yi, R., Shiraki, H., Horii, Y., Ishii, T., Ikeda, K., Asou, N., Okabe, H., Mochizuki, M., Takahashi, K., Yamada, S., Kubo, K., Yashiki S., Royce, W., Waltrip, II., Carbone, K.M. (1999). Detection of Borna disease Virus-reactive antibodies from patients with psychiatric disorders and from horses by electrochemical immunoassay. *Clinical and diagnostic Laboratory immunology.* Sept. 696-700

Zimmermann, W., Dürrwald R., Ludwig, H. (1994). Detection of Borna disease virus RNA in naturally infected animals by a nested polymerase chain reaction. *J of Virological methods,* 46: 133-143

Protocol online. Your lab's reference book [online] (19-02-2010)

Tillgänglig:

http://www.protocol-online.org/prot/Molecular_Biology/DNA/Southern_Blotting/index.html [03-03-2010]