



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap

Ingen påvisad förekomst av cetacean morbillivirus hos svenska tumlare

**No cetacean morbillivirus found in
Swedish harbour porpoise**

Elin Axelsson

*Uppsala
2019*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

Ingen påvisad förekomst av cetacean morbillivirus hos svenska tumlare

No cetacean morbillivirus found in Swedish harbour porpoise

Elin Axelsson

Handledare: Anne-Lie Blomström, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Biträdande handledare: Sara Persson, institutionen för kliniska vetenskaper

Examinator: Mikael Berg, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examensarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 30 hp

Nivå och fördjupning: Avancerad nivå, A2E

Kurskod: EX0869

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2019

Elektronisk publicering: <https://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: cetacean morbillivirus, paramyxovirus, tumlare, nestad RT-PCR

Key words: cetacean morbillivirus, paramyxovirus, harbour porpoise, nested RT-PCR

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsa

SAMMANFATTNING

Cetacean morbillivirus (CeMV) har sedan 1980-talet påvisats hos ett flertal arter av valar över hela norra halvklotet, däribland tumlare. Viruset kan delas in i flera stammar, däribland Dolphin morbillivirus och Porpoise morbillivirus (DMV respektive PMV). Viruset har hos delfiner orsakat utbrott av massdöd medan dess påverkan på tumlare är mindre undersökt men ger intryck av att vara lindrigare. Obduktionsfynd inkluderar nekrotiserande encefalit och interstitiell pneumoni. Syftet med den här studien är att undersöka förekomsten av morbillivirus hos svenska tumlare som strandat och obducerats mellan 2007 och 2017. Den möjliga påverkan som viruset haft på infekterade individer diskuteras också.

Studien är utförd på 126 vävnadsprover från 59 tumlare som strandat längs med Sveriges kust. Tumlarna är obducerade på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) eller på Naturhistoriska riksmuseet och prover har sedan frysts ner för att sparas i Naturhistoriska riksmuseets miljöprovbank för framtida forskning. RNA extraherades och en nestad RT-PCR användes för att amplifiera DNA från DMV. PCR-produkterna analyserades sedan med en agaros-gelelektrofores och prover som där gav ett positivt resultat skickades för sekvensering.

Av de prover som skickades på sekvensering visade endast ett upp ett kromatogram som gjorde att nukleotidsekvensen gick att lita på. Denna nukleotidsekvens visade sig dock ha störst likhet med en vektor och inte med något morbillivirus. De övriga proverna visar upp kromatogram med oregelbundna eller svaga toppar, för korta sekvenser eller överlappande toppar och deras nukleotidsekvenser kunde därför inte ge något svar på om DMV fanns i de analyserade proverna. Inför framtida forskning på området bör ställning tas till om det finns lämpligare metoder för provbearbetning och analys.

SUMMARY

Cetacean morbillivirus (CeMV) has since the 1980s been detected in several species of cetaceans throughout the Northern Hemisphere, including porpoises. The virus is divided into several strains, including the dolphin morbillivirus (DMV) and porpoise morbillivirus (PMV). The virus has in dolphins caused outbreaks of mass death, while its impact on the porpoise population is less investigated but gives the impression of being less significant. Autopsy findings include necrotizing encephalitis and interstitial pneumonia. The purpose of this study was to investigate the prevalence of morbillivirus in Swedish porpoise, stranded and autopsied between the years 2007 and 2017. The possible impact that the virus has had on infected individuals is also discussed.

The study was conducted on 126 tissue samples from 59 harbour porpoises stranded along the Swedish coast. Post mortems of the porpoises was performed at the Swedish National Veterinary Institute (SVA) or at the Swedish Museum of Natural History and samples were stored frozen in the environmental specimen bank at the Swedish Museum of Natural History for future research purposes. RNA was extracted and a nested RT-PCR was used to amplify DNA from DMV. The PCR products were then analysed via agarose gel electrophoresis and samples that gave a positive result were sent for sequencing.

Of the samples sent for sequencing, only one showed a valid chromatogram for the nucleotide sequence to be trusted. However, this nucleotide sequence proved to be more similar to a vector than to any morbillivirus. The other samples showed chromatograms with irregular or small peaks, too short sequences or overlapping peaks, and their nucleotide sequences can therefore not give an answer to if DMV were present in the analysed samples. Prior to future research in the field, consideration should be taken to if there are more appropriate methods of analysis.

INNEHÅLL

Förkortningar.....	1
Inledning.....	2
Litteraturoversikt.....	2
Paramyxovirus.....	2
Morbillivirus hos marina däggdjur.....	3
Patologi.....	4
Tumlare.....	5
Diagnostik.....	6
Material och metoder.....	7
Prover och provuttag.....	7
Provbearbetning och RNA-extraktion.....	7
cDNA-preparering.....	8
PCR-körningar.....	9
Analys och sekvensering.....	10
Resultat.....	11
Diskussion.....	12
Provhantering.....	13
Sekvensering.....	13
Virusets påverkan på tumlarpopulationen.....	14
Kliniska tecken.....	15
Konklusion.....	16
Populärvetenskaplig sammanfattning.....	17
Bakgrund.....	17
Provmaterial.....	17
Diagnostik.....	18
Diskussion.....	18
Referenser.....	19

FÖRKORTNINGAR

CDV	Canine Distemper Virus
CeMV	Cetacean Morbillivirus
DMV	Dolphin Morbillivirus
PDV	Phocine Distemper Virus
PMV	Porpoise Morbillivirus
PWMV	Pilot Whale Morbillivirus

INLEDNING

Cetacean morbillivirus (CeMV) har sedan 1980-talet påvisats hos ett flertal arter av valar, däribland tumlare. Viruset är ett enkelsträngat RNA-virus inom familjen *Paramyxoviridae* där flera andra viktiga virus ingår, bland annat valpsjukevirus, mässling, peste des petit ruminants och det utrotade boskapspestviruset. Som flera närbesläktade virus orsakar CeMV varierande grader av pneumoni, encefalit och immunosuppression. På ett flertal arter av delfiner har epidemier som resulterat i hög mortalitet visats bero på viruset medan det hos tumlare ännu inte finns så mycket information om ifall infektion leder till sjukdom och dödsfall i populationen (Müller *et al.*, 2000; Guardo *et al.*, 2005).

Tumlaren (*Phocena phocena*) är den enda arten av val som lever i svenska vattnen. En tumlare som påträffas strandad tillhör enligt Jaktförordningen (SFS 1987:905) staten och måste rapporteras till polisen som sedan kontaktar Naturhistoriska riksmuseet (NRM). NRM samlar in ett begränsat antal tumlare per år. Detta för att få en uppfattning om det generella hälsoläget i populationen och utföra forskning inom flera områden (Naturhistoriska riksmuseet, 2018).

Syftet med den här studien är att undersöka förekomsten av delfinens morbillivirus hos svenska tumlare som strandat och obducerats mellan 2007 och 2017. Detta gjordes med hjälp av nestad PCR-teknik och provtagna individer förväntas vara så pass representativa för den svenska populationen att det går att få en uppfattning om hur utbredd viruset är i denna. På grund av studiens begränsade omfattning tas ingen hänsyn till obduktionsfynd hos de provtagna individerna. Slutsatserna som kan dras angående om vilken påverkan viruset eventuellt har haft på individen och för tumlarpopulationen i stort är därmed mycket begränsade. Litteraturöversikten försöker ändå beskriva de möjliga effekter som morbillivirus kan tänkas ha haft på tumlarna utifrån vad som beskrivits på andra arter av valar där viruset påvisats.

LITTERATURÖVERSIKT

Från 1980-talet och framåt har ett flertal utbrott av sjukdom setts hos flera arter av marina däggdjur. Det har främst rört sig om episoder med massdöd och hos sälar var obduktionsfynden generellt mycket lika dem som ses hos hund vid infektion med valpsjukevirus (CDV). Misstankar om att det kunde röra sig om ett morbillivirus bekräftades år 1988 (Osterhaus & Vedder, 1988). Viruset har även hos valar resulterat i epidemier på flera platser på norra halvklotet. Framför allt strimmig delfin (*Stenella coeruleoalba*) och långfenad grindval (*Globicephala melas*) har drabbats runt medelhavet och flasknosdelfiner (*Tursiops truncatus*) längs med den amerikanska östkusten (Di Guardo & Mazzariol, 2016). Däremot finns få rapporter om viruset hos tumlare och om sjukdom i vatten nära Sverige. Ett undantag är en studie gjord av Müller med kollegor (2000) som hittat antikroppar mot PMV (porpoise morbilli virus) hos tumlare utanför Tyskland, både längs med Nordsjökusten och i Östersjön.

Paramyxovirus

CeMV tillhör genus Morbillivirus, familj *Paramyxoviridae* i ordningen Mononegavirales (Chang & Dutch, 2012). *Paramyxoviridae* och mer specifikt morbillivirus, inkluderar flera virus med betydelse för både djurvälstånd och ekonomi då hög dödlighet ses vid sjukdomar som till exempel peste des petits ruminants (PPRV), valpsjuka (CDV) och den nyligen utrotade

boskapspesten (RPV). Humana patogener som mässling och zoonoserna Hendra- och Nipah-virus är också de paramyxovirus.

Hittills har tre stammar av CeMV identifierats. Tumlarens (PMV), delfinens (DMV) och pilotvalens morbillivirus (PWMV) (Van Bresse *et al.*, 2014). CeMV har dock hittats hos fler arter av valar och det är troligt att fler stammar kommer att identifieras i framtiden.

Arvsmassan hos PMV och DMV skiljer sig endast åt med ungefär 10 % vilket är jämförbart med skillnaden som finns mellan stammar inom samma art hos andra morbillivirus (Barrett *et al.*, 1993). Därför räknas de nu båda som stammar av CeMV. Däremot infekterar de i försök *in-vitro* olika typer av celler än sälarnas PDV och är alltså biologiskt skilda från det viruset. Viruset har mer likheter med peste des petits ruminants-virus (PPRV) än med andra morbillivirus

Morbillivirus är enkelsträngade, linjära, negativa RNA-virus och virionen är försedd med ett lipidhölje. Genomet är 15 702 nukleotider långt och kodar för 6 strukturella proteiner och 2 proteiner med betydelse för virusets virulens (C och V). De strukturella proteinerna är ett nukleokapsidprotein (N), två glykoproteiner (hemagglutinin H och fusionsprotein F), två proteiner associerade till RNA-polymeras (ett fosfoprotein P och ett större protein L) samt ett matrixprotein (M) (Sato *et al.*, 2012; Van Bresse *et al.*, 2014).

Morbillivirus hos marina däggdjur

Varken sälarnas PDV eller hundens CDV är artspecifika virus utan har ett brett värdspektrum. Vid utredning av utbrott på kaspisk säl (Kennedy *et al.*, 2000) och bajkalsäl (Butina *et al.*, 2010) har det hittats virus som har större likheter med CDV än med PDV. CDV är sedan tidigare känt för att kunna infektera ett flertal djurarter utöver hunddjur, däribland hyenor, mårddjur och björnar. Valar verkar däremot inte vara mottagliga för CDV utan alla stammar av morbillivirus som hittats hos val tillhör CeMV (Jo *et al.*, 2018).

Av de tre stammar av CeMV som hittills finns beskrivna verkar DMV vara den mest virulenta då den gett upphov till flera utbrott med hög mortalitet (Jo *et al.*, 2018). Prevalensen av viruset hos strandade valar varierar kraftigt och i flera studier påpekas det att provtagning av dessa individer är ett opålitligt sätt att mäta den verkliga prevalensen då mycket få kliniskt friska djur ingår i djurmaterialet (Van Bresse *et al.*, 2009; Sierra *et al.*, 2014; Serrano *et al.*, 2017).

När det gäller tumlarnas morbillivirus ser det inte ut som att påverkan på individen är lika stor. I en studie gjord av Müller med kollegor (2000) hittades antikroppar mot PMV hos 88 % av individerna men utan typiska patologiska fynd som pekade på PMV-infektion och slutsatsen som drogs var att dödsorsaken var en annan.

I andra studier där immunohistokemi använts för att hitta viruset hos arten har resultaten varit negativa (Siebert *et al.*, 2001).

Hos tumlare i nordöstra atlanten där antikroppar mot DMV undersöktes med en ELISA var prevalensen i genomsnitt 5,36 %, med fler äldre än yngre individer positiva (Van Bresse *et al.*, 2001). I det närliggande Nordsjön hittades inga positiva fall. I studien redovisas inga resultat

från obduktion eller histologiska undersökningar och det går därmed inte att i de fallen koppla infektion till faktisk sjukdom.

Eftersom tumlare är flocklevande djur som är sociala och har mycket kontakt med andra grupper av samma art så tros även lågvirulenta stammar av viruset kunna cirkulera (Müller *et al.*, 2000; Dhermain *et al.*, 2002). Många djur bär därför på viruset eller har genomgått en infektion och har utvecklat antikroppar. Infektion blir därför inte så svår som om en helt naiv grupp drabbats av en mer högvirulent stam.

Patologi

Morbillivirus använder de cellulära proteinerna CD46, CD150 och nectin-4 som receptorer för att infektera värdcellen (Chang & Dutch, 2012). CD46 är ett glykoprotein som uttrycks på cellytan hos alla typer av celler utom erythrocyter. Deras främsta uppgift är att hindra komplementaktivering och därmed cytolys av cellen. CD150 uttrycks av bland annat lymfocyter och dendritiska celler och reglerar aktiveringen av flera andra typer av immunceller. Nectin-4 uttrycks framför allt av epitelceller och bidrar till cellbindningar och differentiering, förflyttning och proliferation av celler (Astier, 2008; Sato *et al.*, 2012). Användningen av dessa proteiner som receptorer gör att CeMV, precis som de flesta andra morbillivirus, framför allt är lymfotropa och epiteliotropa.

Det är ännu inte klarlagt på vilket sätt viruset sprider sig till och mellan nervceller men eftersom dessa celler inte uttrycker något av de tidigare nämnda ytproteinerna är det troligt att ytterligare vägar in i cellen finns för morbilliviruset (Sato *et al.*, 2012; Van Bresseem *et al.*, 2014). En senare studie (Sato *et al.*, 2018) visar att de virala proteinerna H och F har en betydande roll för virusets förmåga att ta sig in i cellen, det sistnämnda speciellt i neuron.

Morbillivirus infekterar först lymfoida celler (dendritiska celler, makrofager och lymfocyter) och replikeras sedan upp i lokala lymfknotor där fler B- och T-lymfocyter infekteras (Sato *et al.*, 2012). Via de infekterade immuncellerna sprids viruset ut i kroppen via blodet (viremi) och infekterar framför allt epitelceller. Virus utsöndras sedan via aerosol från luftvägarna. Hos valar spekuleras det om att utsöndring av viruset och spridning till andra individer sker via aerosoler från blåshålet (Van Bresseem *et al.*, 2014; Jo *et al.*, 2018). Det finns även enstaka rapporter om vertikal spridning från bland annat en studie av strandade pilotvalar där virus hittades med hjälp av PCR hos ett 7 månaders foster (Fernández *et al.*, 2008).

Obduktionsfynd och kliniska tecken

Obduktionsfynd på valar som visat sig vara infekterade med någon av typerna av CeMV inkluderar interstitiell pneumoni, nekrotiserande encefalit och ulcerativ stomatit (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992). Histologiskt visar lungorna proliferation av typ-II-pneumocyter och intracytoplasmatiska inklusionskroppar. Ödem i interstitium, konsoliderade lobes och emfysem har också observerats och närliggande lymfknotor är även de ödematösa. Tecken på icke-suppurativ encefalit sågs i både grå och vit hjärnsubstans med varierande grad av demyelinisering. Stomatiten som en del individer uppvisade sågs som ulcerationer på tunga och i gingiva (Domingo *et al.*, 1992).

Andra fynd som beskrivits i samband med misstanke om infektion med CeMV är avmagring, ödem i andra inre organ och erosioner i huden (Kennedy, 1998). Individer som obducerats i ett flertal studier har också varierande grad av nematoder i luftvägar, munhåla och urogenitalia men inte i sådana mängder att någon av forskargrupperna tror att det är den primära dödsorsaken. Då morbillivirus har en immunosupprimerande effekt är sekundärinfektioner vanliga (Domingo *et al.*, 1992; Duignan *et al.*, 1992).

Kliniska tecken som observerats hos infekterade individer är framför allt neurologiska eller beteendemässiga så som planlöst simmande och vad som upplevts som förvirring (Domingo *et al.*, 1992).

Tumlare

Tumlaren (*Phocena phocena*) är en liten tandval som lever i kustnära vatten på norra halvklotet. Det är den enda arten av val som lever längs den svenska kusten (Carlén *et al.*, 2018). Beroende på geografisk utbredning kan de sommartid översiktligt delas in i tre populationer: Nordsjöpopulationen, Bälthavspopulationen och Östersjöpopulationen. Nordsjöpopulationen finns norr om Falkenberg, Bälthavspopulationen mellan Falkenberg och i höjd med Hanö, och Östersjöpopulationen i övriga Östersjön, norr och öster om Hanö. Östersjöpopulationen beräknas bestå av under 500 individer och klassas som akut hotad. Nordsjö- och Bältpopulationerna består tillsammans av drygt 40 000 individer.

Eftersom deras naturliga fiender främst är större tandvalar så som späckhuggare så är tumlare i våra svenska vatten inte ett bytesdjur.

Det största hotet mot den enskilda individen och mot populationen som helhet är fiskeutrustning men även andra faror orsakade av människor kan utgöra risker för tumlarna (Hammond *et al.*, 2008). På grund av sitt kustnära levnadssätt är de mer utsatta för föroreningar, trafik och buller än många andra arter av valar. I Svarta havet är intensivt fiske en anledning till en minskning av populationen.

I en studie från 2016 gjord på tumlare längs Kanadas kuster (Fenton *et al.*, 2016) obducerades strandade tumlare för att fastställa dödsorsak. Där orsaken kunde fastställas var infektion den vanligaste, 18,7 %, men endast 1 av 241 fall var virusorsakat (herpesvirus). Flera av de individer som dött till följd av andra typer av infektioner testades med PCR för morbillivirus också då viruset är immunosupprimerande och på så sätt kan predisponera för andra infektioner. Hos ingen av de här individerna fanns dock varken antigen eller specifika mikroskopiska lesioner som kunde tyda på att viruset förekom. Andra dödsorsaker som tas upp i studien är utmärgling och skador orsakade av fiskenät eller illegal jakt. Den största delen av individerna fanns det dock inte någon diagnos för.

Tumlare som hittats döda längs med Tysklands Nordsjö- och Östersjö kust obducerades i en studie gjord av Siebert med kollegor (2001). Av de 133 individer som ingick i studien var 71 strandade och 62 bifångade vilket tyder på att 46 % av tumlarna i området dött till följd av asfyxi efter att ha fastnat i fiskeutrustning. Författarna identifierar själva ett selektionsbias då ett stort antal individer i dåligt skick valts bort från studien, till stor del strandade sådana. Inte

heller i den här studien hittades tecken på morbillivirusinfektion efter immunohistokemisk undersökning.

Diagnostik

Immunofluorescens

Immunfluorescens som diagnostisk metod innebär att man använder monoklonala antikroppar som binder till specifika epitoper på viruset. Antikropparna är fluorescerande och efter bindning till antigen kan de ses i ljus- eller elektronmikroskop (Van Bresse *et al.*, 2014). Då metoden innebär manuell undersökning av vävnadsprover i mikroskop så är det dessutom möjligt att koppla positiva svar till patologiska lesioner (Sierra *et al.*, 2014).

Serologiska metoder

Med en ELISA detekteras antikroppar mot viruset (Van Bresse *et al.*, 2014). Ett viralt protein fästs i botten av brunnar och provet som ska analyseras tillsätts, finns det några antikroppar i provet kommer de att binda till antigenet. De bundna antikropparna kan sedan detekteras med hjälp av en märkt antikropp. Via olika ELISA kan antikroppar mot flera av CeMVs proteiner detekteras och metoden fungerar även i hemolyserat serum och skulle därför teoretiskt sett kunna användas även på individer hittade döda. Det är dock oftast inte är praktiskt genomförbart att ta blodprover på vare sig levande eller döda individer. Den metod som framför allt används för CeMV-diagnostik är en direkt ELISA.

Virusneutralisation (VN) innebär att infektiöst virusantigen tillsätts till proverna som ska analyseras (Van Bresse *et al.*, 1998, 2014). De prover som innehåller antikroppar kommer att neutralisera antigenet och inga tecken på infektion kan ses när proverna undersöks efter en inkubationsperiod på 2-3 dagar. Virusneutralisation kan endast detektera antikroppar riktade mot glykoproteinerna på virusets yta. Vid användning av den här metoden är det speciellt viktigt att använda stammar av CeMV och inte något närbesläktat virus. Antikroppar mot CeMV kan binda till andra arter av morbillivirus men inte vid lika låg viruskoncentration och svaret kan därför bli falskt negativt.

ELISA och VN kan även kombineras för att få pålitligare svar. I en studie gjord av Van Bresse med kollegor (1998), med syfte att hitta DMV, användes först en ELISA för att identifiera morbillivirus. För att vidare utröna vilka av proverna som var positiva för just DMV användes virusneutralisation.

RT-PCR

Med hjälp av PCR amplifieras en specifik nukleotidsekvens som sedan kan identifieras genom sekvensering (Van Bresse *et al.*, 2014). Amplifiering sker genom att virusets nukleinsyra, specifika primers och DNA-polymeras värms och kyls i termiska cykler. Fördelar med PCR är snabb och säker konfirmering samt att det möjliggör differentiering mellan olika stammar och identifiering av nya sådana. Detta till skillnad från metoder som utgår från antikroppar där eventuell korsreaktion med bland annat CDV och PDV måste beaktas. Vid reverse transcriptas-PCR (RT-PCR) syntetiseras cDNA från RNA med hjälp av enzymet reverse transcriptase och det är sedan cDNA som används som mall vid amplifieringen.

Nestad PCR innebär att två omgångar av PCR körs (Centelleghé *et al.*, 2016). I den första används en primer med högre sensitivitet men lägre specificitet. Vid nästa körning används den första PCR-produkten som templat och primern är istället designad för en kortare specifik del av genomet vilket gör att metoden som helhet får både högre specificitet och sensitivitet än traditionell PCR. Den är därför lämplig även på prover som är sämre bevarade eller av annan anledning innehåller mindre mängder virusgenom.

I den här studien används en nestad RT-PCR för att ta reda på prevalensen av DMV hos tumlare som rört sig längs den svenska kusten.

MATERIAL OCH METODER

Prover och provuttag

Proverna som analyserats kommer från strandade tumlare längs med Sveriges kust. Tumlarna är obducerade på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) eller på Naturhistoriska riksmuseet (NRM) och delar av organ har efter det sparats i Naturhistoriska riksmuseets miljöprovbanks för framtida forskning. Val av individer att provta utgick från en lista över tumlarna där lunga, hjärna och/eller mjälte provtagits (eftersom viruset tidigare påvisats i dessa vävnader). De prover som har använts kommer från tumlare som påträffats mellan 2007 och 2017. De med mest kadaverösa förändringar valdes bort och likaså tumlare som varit bifångst och alltså kan antas ha dött på grund av att de fastnat i fiskenät och inte av sjukdom. Individer med endast ett organ provtaget exkluderades. I studien ingår 126 prover från 59 individer.

Av de 59 tumlare som ingått i studien tillhör 26 individer Nordsjöpopulationen och 33 individer Bältpopulationen. Tumlarna är av båda könen (28 hanar, 30 honor och 1 ej könsbestämd) och åldersmässigt spridda från kalvar till adulta.

Proverna i miljöprovbanken förvaras i frysrums i -25°C på NRM i Stockholm. De är inlindade i aluminiumfolie och vakuumpförpackade. Vid uttag ur provbanken tinades proverna under kortast möjliga tid och ca 4x4 mm stora bitar av lunga, mjälte och hjärna skars ut, delades i mindre bitar och lades i homogeniseringsrör, som sedan genast frystes in igen. De organ som provtagits är lunga, mjälte och hjärna. NRMs rutiner för provuttag innebär att de 2 mm av vävnaden som varit närmast folien skärs bort och kasseras för att inte den ska påverka analysresultat. Detta eftersträvades i största möjliga mån men då flera av organen, framför allt mjälte, var så små så var det inte alltid möjligt. Till uttaget användes pincett och skalpellblad som byttes efter varje prov.

Metoden följer till största del den som finns beskriven av Centelleghé och hennes kollegor (2016).

Provbearbetning och RNA-extraktion

RNA-extraktion utfördes med GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Fisher Scientific, 2014). 750 μl Trizol tillsattes till vävnadsprovet som sedan homogeniserades och fick inkubera i rumstemperatur i 5 minuter. Därefter tillsattes 150 μl kloroform och proverna skakades ordentligt innan de fick inkubera i rumstemperatur i ytterligare 2-3 minuter. Proverna

centrifugerades sedan i 12 000 rpm i 4°C under 15 minuter. Resterande centrifugering utfördes i rumstemperatur. RNA-fasen flyttades till nya rör och samma mängd 70 %-ig etanol tillsattes. Efter att ha vortexats flyttades proverna över till varsin GeneJET RNA Purification Column placerad i uppsamlingsrör. Proverna tvättades i tre omgångar med två etanolbaserad bufferts enligt följande: 700 µl Wash buffer 1, 600 µl Wash buffer 2 och 250 µl Wash buffer 2. Därefter byttes uppsamlingsrör och 50 µl RNAase-fritt vatten tillsattes för att få RNA att eluera. Efter den sista centrifugeringen (12 000 rpm) förvarades RNA i -80°C.

Sedan mättes koncentrationen av RNA i proverna med Qubit RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, 2013). Detta för att avgör hur stor volym av provet som behövdes i nästa steg. Först gjordes en working solution genom att späda reagent 1:199 i buffern. Därefter skapades två standardlösningar (S1 och S2) genom att blanda 190 µl av arbetslösningen med 10 µl av vardera koncentrerad S1 och S2. Proverna innehållande RNA förbereddes på liknande sätt: 199 µl av arbetslösningen blandades med 1 µl av provet som skulle analyseras. Därefter vortexades både standardlösningar och prover i 2-3 sekunder och fick efter det inkubera i rumstemperatur under 2 minuter. Sedan avlästes resultaten i Qubit 2.0 Fluorometer och koncentrationen av RNA räknades ut. Prover som efter spädning fick en koncentration på >6 µg/ml och därmed inte kunde mätas korrekt av fluorometern späddes 1:9 med RNAase-fritt vatten och analyserades därefter igen. Prover som visade för låga nivåer av RNA (<0,05 µg/ml) för att kunna mätas analyserades i ett kit med högre sensitivitet (Qubit RNA HS Assay Kit) men i samtliga 6 prover var nivåerna av RNA även här för låga för att kunna mätas (<20 ng/ml) och de uteslöts därför från studien.

cDNA-preparering

För preparering av cDNA användes RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, 2015b). Beroende på koncentrationen av RNA i proverna användes mellan 1 och 2 µg RNA tillsammans med den genspecifika primern DMV-2 till mastermix 1, se tabell 1. Primern DMV-2 hade sekvensen ATHCCCAGCTTTGTCTGGT (Bellière *et al.*, 2011). RNAase-fritt vatten tillsattes för att volymen skulle bli 12 µl. Proverna centrifugerades, inkuberades i 65°C i 5 minuter och kylde därefter på is. Sedan tillsattes per prov 12 µl mastermix 2 enligt tabell 2. Återigen centrifugerades proverna och de inkuberades sedan i 42°C i 60 minuter och efter det i 70°C i 5 minuter. Proverna förvarades i väntan på nästa steg i -18°C.

Tabell 1. *Mastermix 1*

Komponent	Volym för 12 µl rxn
Primer DMV-2	2 µl
Nukleasfritt vatten	Upp till 12 µl rxn
Templat RNA	1-10 µl (1-2 µg RNA)

Tabell 2. *Mastermix 2*

Komponent	Volym för 8 µl rxn	Slutlig koncentration
5 X Reaktionsbuffert	4 µl	1 X
RiboLock RNase Inhibitor (20 U/µl)	1 µl	20 U
10 mM dNTP Mix	2 µl	1 X
RevertAid M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl	200 U

PCR-körningar

Proverna analyserades med nestad PCR. PCR-kittet som användes var Phusion Hot Start II DNA Polymerase (Thermo Fisher Scientific, 2018) och termoprotokollet som följdes var det som beskrivs av Centelleghé med kollegor (2016), se tabell 3.

Först blandades en mastermix för varje prov enligt tabell 4. Se primersekvens i tabell 5. Därefter tillsattes 2 µl templat vilket motsvarar 200 ng cDNA. Proverna kördes enligt termoprotokoll för PCR 1, tabell 3. Efter det gjordes en ny mastermix till PCR 2 enligt samma princip men med primern DMV-13. Till PCR 2 användes 4 µl av lösningen från PCR 1 och mängden vatten justerades så att den slutliga volymen även här blev 50 µl. Proverna kördes andra gången enligt termoprotokoll för PCR 2, tabell 3.

Tabell 3. *Termoprotokoll för PCR*

	PCR 1	PCR 2
	30 s i 98 °C	
	10 s i 98 °C	
35 cykler	30 s i 56 °C	30 s i 62 °C
	1 min i 72 °C	
	10 min i 72 °C	

Tabell 4. *Mastermix för PCR 1*

Komponent	Volym för 50 µl rxn	Slutlig koncentration
Nukleasfritt vatten	18 µl	
2X Phusion HS II HF Master Mix	25 µl	1X
Forward primer DMV-11	2,5 µl	0,5 µM
Reverse primer DMV-11	2,5 µl	0,5 µM
Templat	2 µl	

Analys och sekvensering

Gelelektrofores

Tabell 5. *Primersekvenser för PCR*

Primer	Sekvens	Längd på fragment
DMV-11F	CCGAACCTGATGATCCATTT	612 bp
DMV-11R	CGTAAATGTCCATCCCTGCT	
DMV-13F	CATCATAGGGGGTGGTTTGA	200 bp
DMV-13R	GGGGTGGTCTACTCTTGCAC	

Proverna fick vandra genom en agarosgel (1,4 % agaros) på 120 V under 40 minuter. Till samtliga prover användes stegen GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific).

Sekvensering

De prover som uppvisade rätt storlek skickades, tillsammans med båda de primers som använts till respektive prov tidigare, till Macrogen för sekvensering. Inför detta renades PCR-produkterna fram med GeneJet Gel Extraction Kit (Thermo Fisher Scientific, 2015a) enligt tillverkarens instruktioner, tabell 6.

PCR-produkt blandades med bindningsbuffert och isopropanol för att underlätta bindning till kolonnen.

Sedan tvättades den med etanolbaserad tvättbuffer för att bli av med kontaminerande ämnen och eluerades därefter. Av den renade PCR-produkten överfördes 5 µl till ett nytt Eppendorf-rör och blandades med den forwardprimer som använts till det specifika provet tidigare. Det samma gjordes med reverseprimern för provet i ett annat rör. De två rören för varje prov förvarades sedan i -25 °C till de skickades iväg.

Tabell 6. *Rening av DNA inför sekvensering*

Bindning	Återstående PCR-produkt, 100 µl Binding Buffer och 100 µl Isopropanol i kolonn.
	Centrifugering 30 s 12 000 rpm
Tvätt	700 µl Wash buffer
	Centrifugering 30 s 12 000 rpm
	1 min 12 000 rpm
Eluering	25 µl Elution Buffer
	Centrifugering 1 min

RESULTAT

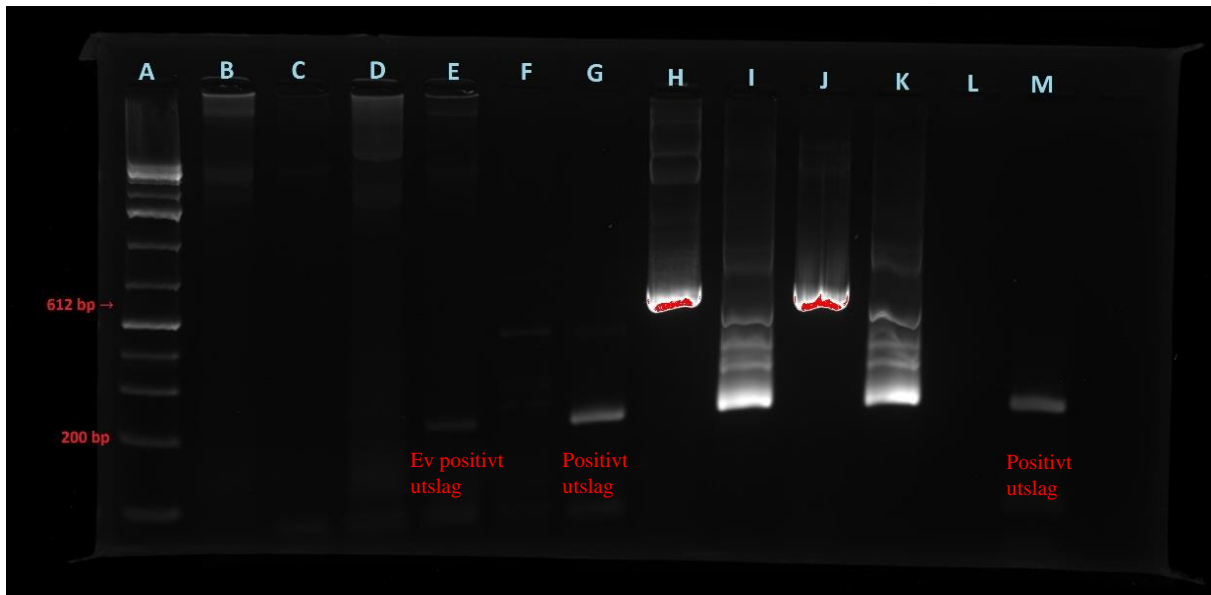
Endast 6 av 252 prover gav intrycket av att kunna vara positiva på gel. På de proverna kunde band ses i området för 612 bp (för PCR-produkt 1) eller 200 bp (PCR-produkt 2). Inget av proverna hade både positiv PCR-produkt 1 och 2. Fler prov än de 6 nämnda eventuellt positiva proverna visade band vid rätt plats men hade då även tydliga band vid andra storleksmarkeringar.

De 6 proverna bestod av hjärna och lunga och kom från 5 olika individer. De är alla hittade vid skilda platser över 10 års tid. Av de 5 individerna är 3 strandade norr om Falkenberg och kan därför förväntas tillhöra Nordsjöpopulationen, de andra 2 tillhör Bälthavspopulationen. 4 var hanar och 1 hona och det fanns 2 vuxna djur, 1 kalv och 2 av okänd ålder.

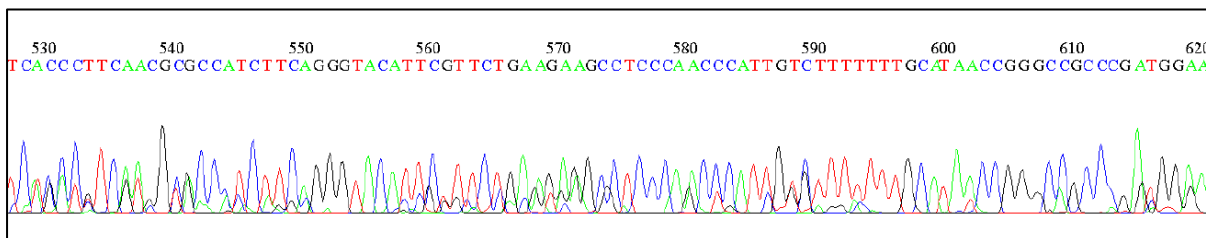
Eftersom så få prover gav positivt utslag på gel så analyserades även en positiv kontroll i två olika spädningar för att säkerställa att PCR och geler utförts på korrekt sätt. Tillsammans med de kontrollerna kördes även tre prover som tidigare gett ett resultat som eventuellt kunnat tolkas som positivt, samt en negativ kontroll. Se figur 1 för resultat av gelen. De positiva kontrollerna och åtminstone ett av proven ger positivt utslag. Så gör dock även den negativa kontrollen på den här gelen och vi kan alltså anta att det skett en kontamination här och att de analyserade proverna eventuellt också har drabbats av det. I tidigare körda geler sågs dock inte denna kontamination.

De 6 prover som här eller tidigare visat ett eventuellt positivt resultat skickades iväg på sekvensering. Då de skickades med både forward och reverse primer fick vi 12 svar tillbaka. Utifrån svaren som kom tillbaka gick det inte att dra några slutsatser om proverna är positiva eller negativa. Endast ett av de tolv svaren från MacroGen har ett kromatogram som är tillräckligt regelbundet för att gensekvensen ska vara värd att titta på, se figur 2. Det provet är ett av de som ses i gelen i figur 1 men som inte är positivt där. Nukleotidsekvensen jämfördes med andra sekvenser med hjälp av NCBI's nukleotid-BLAST och den närmaste likhet som kan ses är 90 %, med en vektor, men inte med något morbillivirus.

De övriga proverna visar upp kromatogram med oregelbundna eller svaga toppar, för korta sekvenser eller överlappande toppar och deras tillhörande sekvenser har därför inte undersökts med BLAST.



Figur 1. A: stege (*GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder*); B-G: PCR-produkt 1 och 2 av analyserade prover; H och I: PCR-produkt 1 och 2 av positiv kontroll (100X); J och K: PCR-produkt 1 och 2 av positiv kontroll (10X); L och M: negativ kontroll. G och M ger tydligt positivt utslag vid 200 bp. E ger eventuellt ett positivt svar.



Figur 2. Kromatogram.

DISKUSSION

Sedan 1980-talet har CeMV hittats hos flera arter av valar på hela norra halvklotet, bland annat tumlare. Viruset tillhör familjen *Paramyxoviridae* tillsammans med bland annat valpsjukevirus och mässling och ger liknande kliniska tecken med pneumoni och encefalit. Syftet med den här studien var att undersöka hur stor del av de tumlare som strandat längs med Sveriges kust som bär på viruset. De strandade tumlarna kan antas vara ett så pass representativt urval av hela den svenska populationen att det går att göra en uppskattning om förekomsten i ett vidare perspektiv. Det finns flera stammar av CeMV och i den här studien undersöks förekomsten av DMV. DMV verkar vara en mer aggressiv variant av viruset, åtminstone när den drabbar sina huvudsakliga värdar som är arter av delfiner. I vilken utsträckning just den här stammen leder till sjukdom hos tumlare är inte säkert. Positiva resultat på tumlare utan sjukdomstecken kan

snarare hjälpa till att förstå om de spelar en roll som reservoarer och i att hjälpa till att behålla viruset cirkulerande bland andra arter av valar.

Utifrån de resultat som studien har fått går det inte att dra några slutsatser om prevalensen av morbillivirus hos svenska tumlare. Det är svårt att vet var i processen som något gått fel och utan att veta det är det inte heller möjligt att säga vad det mest troliga utslaget hade blivit om allt gått enligt plan. En enkel förklaring är att det helt enkelt inte fanns något virus att hitta men även det är svårt att konfirmera.

Studier på tumlare från samma geografiska områden har tidigare undersökts men resultaten där går åt olika håll. I en studie (Müller *et al.*, 2000) hittas antikroppar mot PMV men inget virusantigen, i en annan (Siebert *et al.*, 2001) är alla prover negativa vid immunohistokemi. Antikroppar har alltså tidigare påträffats hos de populationer av tumlare som rör sig i svenska vatten men inget antigen.

Provhantering

En viktig felkälla som delvis varit utom min kontroll är provhantering. Förvaring av prover är en annan faktor som har stor påverkan, framför allt innan vi fick proverna. I Naturhistoriska riksmuseets Miljöprovbanks förvaras proverna under flera år i -25°C och tinas delvis vid varje uttag. Prover som ska analyseras för RNA-virus bör förvaras i -80°C eller i vätska som bevarar RNA (Mutter *et al.*, 2004). RNA är inte tillräckligt stabilt för att förvaras i så höga temperaturer som -25°C utan att det finns risk för degradering. Även i labbet här i Uppsala förvarades proverna i höga temperaturer ($-18 - -20^{\circ}\text{C}$) innan RNA-extraktion.

Med tanke på det stora antalet prover är det inte omöjligt att den mänskliga faktorn spelat in någonstans i processen och lett till ett felaktigt resultat. Däremot så är proverna analyserade i många omgångar och sannolikheten att samma misstag skett i alla dessa grupper får anses liten. Det är då mer troligt att det är metoden som inte fungerat tillfredsställande eller utförts på fel sätt genom hela undersökningen. Eftersom PCR kördes av en positiv kontroll som gav förväntat resultat så har åtminstone den reaktionen fungerat som den ska.

Ett observandum är att vi i den här studien letat efter DMV när det är PMV som är den stam som främst dokumenterats hos tumlare. DMV har påvisats hos tumlare med ELISA och virusneutralisation (Van Bresse *et al.*, 1998). I det fallet rör det sig dock om diagnostik med serologiska metoder vilket inte är en lika specifik metod som PCR då korsreakens kan ske.

Sekvensering

De sekvenserade proverna som visar korta sekvenser eller låga toppar med mycket störningar kan bero på för lite templat, för lite primer eller på att templat och primer inte överensstämmer (Macrogen Online Sequencing Order System, 2018). Innehåller provet mer än en nukleotid-sekvens ses överlappande toppar vilket är fallet i flera av kromatogrammen från den här studien. PCR-produkterna renades inte fram från gel utan direkt från PCR-produkten vilket gör att är möjligt att segment med en annan längd än 200 eller 612 kommer med. I den mån det gick undveks prover som visade flera band men ett säkrare sätt att undvika att de ställer till problem

vid sekvensering hade varit att skära ut banden av intresse och endast rena fram DNA från dessa.

Genom att få primern att binda mer specifikt hade risken för extra band kunnat minimeras från början. Detta hade eventuellt kunnat hanteras genom att justera termocyklerna vid PCR så att annealing-temperaturen hade optimerats för just den primer och det templat som används i det här specifika fallet.

En annan möjlig anledning till mycket störningar vid sekvenseringen är en effekt av isopropanolen som tillsattes vid rening av DNA. Dess funktion är att öka bindningen av kortare produkter (<500 bp) till kolonnen och då en av sekvenserna som eftersöks är 200 bp lång användes isopropanol för att optimera utfallet. En bieffekt av detta är att även primer dimers kan ha bundit in och därmed finnas kvar i den reade produkten. Primer dimers är biprodukter från PCR med sekvenser som motsvarar de F- och R-primers som använts tidigare och ska egentligen försvinna vid rening. Resterna av primrar stör sekvenseringen så att reaktionen vid denna sker åt två håll samtidigt. Även detta problem hade kunnat hjälpas av en optimerad annealing temperatur så att så få primer dimers som möjligt bildas, alternativt genom att ha renat fram PCR-produkten direkt från gelen.

Kontamination

Det enda provet som hade ett kromatogram med någorlunda fina toppar visade sig innehålla en gensekvens tillhörande en vektor. Denna vektor är inte någon som hanteras i labbet som min del av analysen utförts i och mest sannolikt från en kontamination som skett under sekvenseringen hos Macrogen. Kontamination kan såklart även ha skett under andra delar av processen även om lämpliga hygienåtgärder följts.

Virusets påverkan på tumlarpopulationen

Då inga slutsatser om prevalensen kunde dras från den här studien är följande diskussion en sammanställning och reflektion kring den litteraturoversikt som ligger till grund för arbetet.

En av de mest intressanta frågorna tycker jag är huruvida viruset har någon påverkan kliniskt på tumlare eller valar i stort. Eftersom det handlar om vilda djur är det så klart svårt att undersöka men obduktion och efterföljande histologisk undersökning kan ändå gör att man kommer några steg närmre ett svar. Vid insamlande av bakgrundsinformation om förekomsten av viruset så har det för mig blivit tydligt att publicerade artiklar kan delas in i två kategorier: de som är utförda med virologin och diagnostiken som huvudområde och de som är inriktade på patologiska fynd.

Exempel på den första typen är studierna gjorda av Van Bresse *et al.* (1998 och 2001) och Centelleghé *et al.* (2016) och de har i många fall lyckats identifiera virus med hjälp av flera av de tidigare beskrivna metoderna. Däremot finns det inte i någon av studierna några uppgifter om obduktionsfynd och mycket bristfällig information om individerna i övrigt.

Studier med fokus på patologin är till exempel de gjorda av Siebert *et al.* (2001), Sierra *et al.* (2014), Fenton *et al.* (2016) och Pintore *et al.* (2018). Dessa studier har generellt fått ett resultat

som visar en lägre prevalens av CeMV. En möjlig förklaring till detta går att hitta i studien gjord av Fenton med kollegor (2016) där endast vävnad från individer som visar obduktionsfynd överensstämmande med infektion, har analyserats för CeMV. Här är det möjligt att många djur med tidig, lindrig eller avläkt infektion missats. I de här studierna ingår generellt fler djur där alla obducerats och är såklart därför mer resurskrävande. Analys av samtliga djur har antagligen därför prioriterats bort eftersom det inte uppfyllde studiens syfte.

En annan anledning till en högre prevalens i studier där CeMV varit huvudfokus är publiceringsbias. I de bredare studierna där syftet varit att få reda på en dödsorsak har författarna fått ett resultat även om samtliga individer visat sig vara negativa för viruset. En smalare frågeställning på en mindre studie gör att sannolikheten för ett negativa resultat ökar och viljan att publicera ett sådant resultat får antas vara mindre.

Enligt mig borde utformningen av den optimala studien vara så bred att både obduktionsfynd och virusförekomst kan dokumenteras och ett samband mellan dessa kunde undersökas. Då hade fler slutsatser dragits om huruvida virus- eller antikroppsförekomst alltid leder till de tidigare beskrivna lesionerna eller om viruset även finns hos individer som inte blir påverkade. Den enda studie jag läst med liknande upplägg är utförd av Müller med kollegor (2000). De identifierar med hjälp av virusneutralisation PMV eller DMV även i en stor mängd prover som histologiskt inte visar tecken på infektion. Samtliga prover är också negativa vid immunohistokemisk undersökning.

Kliniska tecken

De patologiska fynd som ändå har beskrivits och kunnat kopplas till CeMV är sådana som liknar de som andra arter av morbillivirus orsakar. Det är dock svårt att bedöma om de är dödsorsaken och därmed också i vilken grad de patologiska förändringarna har påverkat tumlarna kliniskt på individnivå.

Enligt en studie av Domingo med kollegor (1992) på strimmiga delfiner så var det enda kliniska tecken som kunde ses neurologiska eller beteendemässiga förändringar. Dessa individer visade tecken på förvirring genom att simma in i båtar och hittades senare strandade. Det är ändå inte rimligt att anta att kliniska tecken ska kunna utredas så mycket närmre än så här. Det enda tillfälle när det med dagens teknik går att observera valar på så nära håll är när de hålls i fångenskap och utbrott i sådana grupper är i sig mindre troligt.

Andra obduktionsfynd är pneumoni, ofta saminfektioner med andra patogener, och i vilken grad den har en påverkan på tumlarna kliniskt är mycket svårt att avgöra då material i de allra flesta fall kommer från individer som är funna döda med oklar dödsorsak.

Müller och hans kollegor hittade i sina undersökningar (2000) antikroppar mot PMV men inga lesioner eller virusantigen. De drog slutsatsen att tumlarna varit infekterade med en mindre virulent stam och bekämpat infektionen. De olika stammarna av CeMV tycks alltså ha olika virulens och hur pass sjuka svenska tumlare blir av morbillivirus kan därför påverkas av vilken stam de är smittade av. I samma studie diskuteras även om tumlar som art skulle vara mindre mottagliga för infektionen än de arter av delfiner där stora utbrott skett.

KONKLUSION

Då det inte utifrån den här studien inte säkert går att säga något om de svenska förhållandena vore det spännande att få den utförd på nytt, med eventuella justeringar i tillvägagångssätt för att med säkerhet kunna säga att viruset inte finns. Tillgång till provmaterial finns ju redan i en sådan omfattning att det vore synd att inte utnyttja det. Den verkliga påverkan som viruset har på populationen vore också intressant att få reda på. Till detta skulle det ju behövas en större och bredare studie än den som gjorts i det här projektet, med närmare samarbete mellan virologer och patologer för att obduktionsfynd och PCR ska utföras och kunna korreleras.

I min studie uteslöts bifångade djur eftersom de vid fångstillfället kan förväntas ha varit relativt friska. I ytterligare studier vore det intressant att analysera vävnad även från dem för att få en uppfattning om virusförekomst som i större omfattning kan extrapoleras till hela populationen. En annan aspekt att undersöka vidare vid ett eventuellt positivt resultat är att titta närmre på individerna i förhållande till analysresultat, om det finns skillnader i ålder, kön eller geografisk utbredning.

POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

Sedan 1980-talet har Cetacean morbillivirus (CeMV) hittats hos flera arter av valar på hela norra halvklotet, bland annat hos tumlare. Viruset är släkt med det virus som orsakar valpsjuka på hundar och mässling på människa och tecknen på sjukdom liknar de som syns vid de sjukdomarna. Syftet med den här studien var att undersöka hur stor del av tumlarna som rör sig i svenska vatten som är smittade av viruset.

Bakgrund

Valar som smittas av morbillivirus får ofta hjärninflammation och lunginflammation och bland delfiner har sjukdomen lett till stora utbrott där många djur dött. Flera djur har också haft sår i munslemhinna och på tungan, varit väldigt magra och haft ansamlingar med vätska i flera inre organ.

Det finns flera stammar av CeMV som kan orsaka sjukdom hos olika arter av valar. Tumlaren har en egen stam men har även setts kunna smittas av delfinens morbillivirus. Forskning visar att det kan skilja sig åt mellan stammarna i hur aggressiva de är. Delfiner har i flera studier visat sig bli sjukare när de är smittade, tumlare verkar ha klarat sig bättre. Det är däremot inte säkert om det beror på stammen av virus eller på att delfiner har sämre motståndskraft mot sjukdomen.

I studier rör det sig i de allra flesta fallen om djur som vid undersökningstidpunkten varit döda. De behöver däremot inte ha dött av just det här viruset. För att komma närmare ett svar på om så är fallet är det viktigt att titta på delar av organ i mikroskop. Celler i sjuka organ reagerar olika på olika typer av virus och bakterier. Går det att hitta sjukliga förändringar som är typiska för just morbillivirus kan diagnosen vara mer säker. I många fall är valarna smittade med mer än en mikroorganism samtidigt och det blir då svårare att hitta det specifika virus man letar efter. Så är ofta fallet med alla typer av morbillivirus eftersom det bland annat attackerar celler som ingår i kroppens immunförsvar. Med ett immunförsvar som inte fungerar ordentligt kan inte kroppen bekämpa andra sjukdomar. Organ som morbillivirus brukar hittas i är mjälte, lungor och hjärna.

Tumlaren är den enda arten av val om lever längs den svenska kusten. De kan delas in i tre grupper på geografisk utbredning: Nordsjöpopulationen, Bältpopulationen och Östersjöpopulationen. Hos tumlare som hittats döda i just de här områdena är den vanligaste dödsorsaken kvävning till följd av att ha fastnat i fiskeutrustning. Utöver det är infektion som lett till lunginflammation också vanligt. Här har tumlaren inga naturliga fiender och är därmed inte ett bytesdjur.

Provmaterial

Den här studien vill undersöka hur stor del av de svenska tumlarna som bär på viruset. Studien utgår från tumlare som strandat längs den svenska kusten mellan åren 2007 och 2017. De strandade tumlarna tillhör de grupper som rör sig i Nordsjön och i Bälthavet och både honor och hanar av olika åldrar ingår. Delar av mjälte, lunga och hjärna sparades vid obduktionen och har sedan dess förvarats nedfryst för att användas i framtida forskning. Till den här undersökningen tinades organen delvis för att prover skulle kunna tas.

Diagnostik

Det finns flera metoder att använda för att komma fram till om en individ är infekterad av virus. Två huvudprinciper är att leta direkt efter viruset eller att leta efter tecken på att kroppen försökt bekämpa viruset.

För att ta reda på om djuret var infekterat av viruset vid sin död användes här en metod som försöker hitta arvs massa från virus i organproverna. För det behöver vävnaderna först sönderdelas mycket fint och sedan filtreras proverna för att fånga virusets gensekvenser. För att kunna undersöka sekvenserna behöver de bli fler och proverna värms och kyls därför i cykler. En mall används för att just den eftersökta gensekvensen är den som förökas. Antalet kopior av samma gensekvens blir då så stort att det går att granska dem närmre. Bitarna av gener som hittas i proverna jämförs sedan med prover där det redan är bekräftat att det rör sig om morbillivirus.

Diskussion

I undersökningarna kunde inget virus hittas men förekomst kunde inte heller helt uteslutas. En enkel anledning till det negativa resultatet skulle kunna vara att det inte fanns tillräckligt mycket virus i proverna. En annan möjlig anledning kan vara att proverna förvarats på ett sätt som inte är optimalt för metoden som använts i den här studien. Prover som ska analyseras för virus ska, för att bevaras så bra som möjligt, förvaras i -80°C eller i en speciell vätska som bevarar arvs massan.

Oavsett om viruset finns hos tumlare kring Sveriges kuster eller inte så hade det varit intressant att veta i vilken utsträckning tumlare som verkligen smittats blir påverkade av viruset. Blir de så sjuka att de dör av det eller kan deras immunförsvar bekämpa infektionen? För att få svar på det skulle man behöva jämföra de provsvar som fås med vad som ses vid obduktion. På så sätt kan en trolig dödsorsak konstateras och sedan får man bestämma om det är det här viruset som tros ligga bakom eller inte.

REFERENSER

- Astier, A. L. (2008). T-cell regulation by CD46 and its relevance in multiple sclerosis. *Immunology*, 124:149–154.
- Barrett, T., Visser, I. K. G., Mamaev, L., Goatley, L., van Bressen, M.-F. & Osterhaus, A. D. M. E. (1993). Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology*, 193: 1010–1012.
- Bellière, E. N., Esperón, F. & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2011). Genetic comparison among dolphin morbillivirus in the 1990-1992 and 2006-2008 Mediterranean outbreaks. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*, 11:1913–1920.
- Carlén, I., Thomas, L., Carlström, J., Amundin, M., Teilmann, J., Tregenza, N., Tougaard, J., Koblitz, J. C., Sveegaard, S., Wennerberg, D., Loisa, O., Dähne, M., Brundiars, K., Kosecka, M., Kyhn, L. A., Ljungqvist, C. T., Pawliczka, I., Koza, R., Arciszewski, B., Galatius, A., Jabbusch, M., Laaksonlaita, J., Niemi, J., Lyytinen, S., Gallus, A., Benke, H., Blankett, P., Skóra, K. E. & Acevedo-Gutiérrez, A. (2018). Basin-scale distribution of harbour porpoises in the Baltic Sea provides basis for effective conservation actions. *Biological Conservation*, 226:42–53.
- Centelleghe, C., Beffagna, G., Zanetti, R., Zappulli, V., Di Guardo, G. & Mazzariol, S. (2016). Molecular analysis of dolphin morbillivirus: A new sensitive detection method based on nested RT-PCR. *Journal of Virological Methods*, 235:85–91.
- Chang, A. & Dutch, R. E. (2012). Paramyxovirus fusion and entry: multiple paths to a common end. *Viruses*, 4:613–636.
- Dhermain, F., Soulier, L. & Bompar, J.-M. (2002). Natural mortality factors affecting cetaceans in the Mediterranean Sea. I: Notarbartolo di Sciarra, G. (red). *Cetaceans of the Mediterranean and Black Seas: state of knowledge and conservation strategies*. Monaco: A report to the ACCOBAMS Secretariat.
- Di Guardo, G. & Mazzariol, S. (2016). Cetacean morbillivirus-associated pathology: knowns and unknowns. *Frontiers in Microbiology* [online], 7. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2016.00112/full>. [Accessed 2018-09-27].
- Domingo, M., Visa, J., Pumarola, M., Marco, A. J., Ferrer, L., Rabanal, R. & Kennedy, S. (1992). Pathologic and immunocytochemical studies of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*). *Veterinary Pathology*, 29:1–10.
- Duignan, P. J., Geraci, J. R., Raga, J. A. & Calzada, N. (1992). Pathology of morbillivirus infection in striped dolphins (*Stenella coeruleoalba*) from Valencia and Murcia, Spain. *Canadian Journal of Veterinary Research = Revue Canadienne de Recherche Vétérinaire*, 56:242–248.
- Fenton, H., Daoust, P., Forzan, M., Vanderstichel, R., Ford, J., Spaven, L., Stephane, L. & Raverty, S. (2016). Causes of mortality of harbor porpoises *Phocoena phocoena* along the Atlantic and Pacific coasts of Canada. *Diseases of Aquatic Organisms*, 122:171-183.
- Fernández, A., Esperón, F., Herraéz, P., Espinosa de los Monteros, A., Clavel, C., Bernabé, A., Sánchez-Vizcaino, J. M., Verborgh, P., DeStephanis, R., Toledano, F. & Bayón, A. (2008). Morbillivirus and pilot whale deaths, Mediterranean Sea. *Emerging Infectious Diseases*, 2008:792–794.
- Guardo, G. D., Marruchella, G., Agrimi, U. & Kennedy, S. (2005). Morbillivirus infections in aquatic mammals: a brief overview. *Journal of Veterinary Medicine Series A*, 52:88–93.
- Hammond, P. S., Bearzi, G., Bjørge, A., Forney, K., Karczmarski, L., Kasuya, T., Perrin, W. F., Scott, M. D., Wang, J. Y., Wells, R. & Wilson, B. (2008). *Phocoena phocoena*. The IUCN red list of

- threatened species. *International Union for Conservation of Nature*. Available from: <http://www.iucnredlist.org/details/17027/0>. [Accessed 2018-11-10].
- Jo, W. K., Osterhaus, A. D. & Ludlow, M. (2018). Transmission of morbilliviruses within and among marine mammal species. *Current Opinion in Virology*, 28:133–141
- Kennedy, S. (1998). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Journal of Comparative Pathology*, 119:201–225.
- Macrogen Online Sequencing Order System. *Macrogen Sequencing Troubleshooting guide*. [online] (2018). Available from: <https://dna.macrogen.com/eng/support/ces/guide/troubleshooting.jsp#8>. [Accessed 2018-12-08].
- Mutter, G. L., Zahrieh, D., Liu, C., Neuberger, D., Finkelstein, D., Baker, H. E. & Warrington, J. A. (2004). Comparison of frozen and RNALater solid tissue storage methods for use in RNA expression microarrays. *BMC Genomics*, 5:88.
- Müller, G., Siebert, U., Wünschmann, A., Artelt, A. & Baumgärtner, W. (2000). Immunohistological and serological investigation of morbillivirus infection in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German Baltic and North Sea. *Veterinary Microbiology*, 75:17–25.
- Naturhistoriska riksmuseet. *Museets roll*. [online] (2018). Available from: <http://www.nrm.se/forskningochsamlingar/zoologi/statensvilt/museetsroll.1314.html>. [Accessed 2018-11-21].
- Osterhaus, A. D. & Vedder, E. J. (1988). Identification of virus causing recent seal deaths. *Nature*, 335:20.
- Pintore, M. D., Mignone, W., Di Guardo, G., Mazzariol, S., Ballardini, M., Florio, C. L., Gorla, M., Romano, A., Caracappa, S., Giorda, F., Serracca, L., Pautasso, A., Tittarelli, C., Petrella, A., Lucifora, G., Di Nocera, F., Uberti, B. D., Corona, C., Casalone, C. & Iulini, B. (2018). Neuropathologic findings in cetaceans stranded in Italy (2002–14). *Journal of Wildlife Diseases*, 54:295–303.
- Sato, H., Yoneda, M., Honda, T. & Kai, C. (2012). Morbillivirus receptors and tropism: multiple pathways for infection. *Frontiers in Microbiology* [online], 3. Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2012.00075/full>. [Accessed 2018-09-27].
- Sato, Y., Watanabe, S., Fukuda, Y., Hashiguchi, T., Yanagi, Y. & Ohno, S. (2018). Cell-to-cell measles virus spread between human neurons is dependent on hemagglutinin and hyperfusogenic fusion protein. *Journal of Virology*, 92:e02166-17.
- Serrano, L., Simeone, C. A., Colegrove, K. M., Duignan, P. J., Goldstein, T. & Gulland, F. M. D. (2017). Cetacean morbillivirus in odontocetes stranded along the central California coast, USA, 2000–15. *Journal of Wildlife Diseases*, 53:386–392.
- SFS 1987:905 *Jaktförordning*, Stockholm: Näringsdepartementet.
- Siebert, U., Wünschmann, A., Weiss, R., Frank, H., Benke, H. & Frese, K. (2001). Post-mortem findings in harbour porpoises (*Phocoena phocoena*) from the German North and Baltic Seas. *Journal of Comparative Pathology*, 124:102–114.
- Sierra, E., Sánchez, S., Saliki, J. T., Blas-Machado, U., Arbelo, M., Zucca, D. & Fernández, A. (2014). Retrospective study of etiologic agents associated with nonsuppurative meningoencephalitis in stranded cetaceans in the Canary Islands. *Journal of Clinical Microbiology*, 52:2390–2397.
- Thermo Fisher Scientific (2013). *User Guide: RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1621>. [Accessed 2018-10-05].

- Thermo Fisher Scientific (2014). *User Guide: GeneJET RNA Purification Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0732>. [Accessed 2018-11-26].
- Thermo Fisher Scientific (2015a). *User Guide: GeneJET Gel Extraction Kit*. Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K0692>. [Accessed 2018-12-03].
- Thermo Fisher Scientific (2015b). *User Guide: Qubit RNA BR Assay Kits*. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q10210>. [Accessed 2018-10-05].
- Thermo Fisher Scientific (2018). *User Guide: Phusion Hot Start II High-Fidelity PCR Master Mix*. Thermo Fisher Scientific Inc. Available from: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/F565S>. [Accessed 2018-12-07].
- Van Bresseem, M.-F., Duignan, P., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K., De Guise, S., Di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernandez, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K., Gulland, F., Jensen, B., Jepson, P., Hall, A., Kuiken, T., Mazzariol, S., Morris, S., Nielsen, O., Raga, J., Rowles, T., Saliki, J., Sierra, E., Stephens, N., Stone, B., Tomo, I., Wang, J., Waltzek, T., Wellehan, J., Van Bresseem, M.-F., Duignan, P. J., Banyard, A., Barbieri, M., Colegrove, K. M., De Guise, S., Di Guardo, G., Dobson, A., Domingo, M., Fauquier, D., Fernandez, A., Goldstein, T., Grenfell, B., Groch, K. R., Gulland, F., Jensen, B. A., Jepson, P. D., Hall, A., Kuiken, T., Mazzariol, S., Morris, S. E., Nielsen, O., Raga, J. A., Rowles, T. K., Saliki, J., Sierra, E., Stephens, N., Stone, B., Tomo, I., Wang, J., Waltzek, T. & Wellehan, J. F. (2014). Cetacean morbillivirus: current knowledge and future directions. *Viruses*, 6:5145–5181.
- Van Bresseem, M.-F., Jepson, P. & Barrett, T. (1998). Further insight on the epidemiology of cetacean morbillivirus in the northeastern Atlantic. *Marine Mammal Science*, 14:605–613.
- Van Bresseem, M.-F., Raga, J. A., Guardo, G. D., Jepson, P. D., Duignan, P. J., Siebert, U., Barrett, T., Santos, M. C. de O., Moreno, I. B., Siciliano, S., Aguilar, A. & Waerebeek, K. V. (2009). Emerging infectious diseases in cetaceans worldwide and the possible role of environmental stressors. *Diseases of Aquatic Organisms*, 86:143–157.
- Van Bresseem, M.-F., Waerebeek, K. V., Jepson, P. D., Raga, J. A., Duignan, P. J., Nielsen, O., Di Benedetto, A. P., Siciliano, S., Ramos, R., Kant, W., Peddemors, V., Kinoshita, R., Ross, P. S., López-Fernandez, A., Evans, K., Crespo, E. & Barrett, T. (2001). An insight into the epidemiology of dolphin morbillivirus worldwide. *Veterinary Microbiology*, 81:287–304.