



Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

Är gnagare reservoar för encefalomyokarditvirus i svenska grisstallar?

Magnus Saager

Uppsala

2009

Examensarbete inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:1*

Är gnagare reservoar för encefalomyokarditvirus i svenska grisstallar?

Magnus Saager

Handledare: Claes Fellström, Enheten för gris- och fjäderfäsjukdomar

Bitr handledare: Frederik Widén, Enhet för virologi, immunbiologi och parasitologi, SVA

Examinator: Bernt Jones, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete inom veterinärprogrammet, Uppsala 2009
Fakulteten för Veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper
Kurskod: EX0239, Nivå X, 30hp*

Nyckelord: Encefalomyokarditvirus, EMCV, reservoar, gnagare, råtta, mus, gris, reproduktionsstörningar, myokardit, Sverige

*Online publication of this work: <http://epsilon.slu.se>
ISSN 1652-8697
Examensarbete 2010:1*

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

SAMMANFATTNING	1
SUMMARY	2
INLEDNING	3
BAKGRUND	3
SYFTE	3
LITTERATURÖVERSIKT	3
ALLMÄNT OM EMCV	3
<i>Förekomst i Europa</i>	3
<i>Virusgenomet</i>	4
<i>Riskfaktorer för en besättning</i>	4
<i>Naturliga värdar av EMCV</i>	4
PATOGENES VID EMCV	5
<i>Infektion hos råttor</i>	5
<i>Infektion hos möss</i>	5
<i>Infektion hos gris</i>	6
SPRIDNING MELLAN GRISAR	7
SYM TOM HOS GRIS	8
<i>Plötsliga dödsfall</i>	8
<i>Reproduktionsproblem</i>	8
DIFFERENTIALDIAGNOSER	9
<i>Reproduktionsstörningar</i>	9
<i>Hjärtmuskelsjukdomar</i>	10
EMCV DIAGNOSTIK	11
<i>Molekylärdiagnostik</i>	11
<i>Serologiska tester</i>	11
ZONOSASPEKTEN AVSEENDE EMCV	13
MATERIAL OCH METODER	14
GNAGARMATERIALET	14
POSITIV OCH NEGATIV KONTROLL	16
POSITIV OCH NEGATIV KONTROLL	16
PRIMERS	16
HOMOGENISERING OCH EXTRAKTIONSMETOD	16
C(COPY)DNA MED HJÄLP AV RANDOM HEXAMERS	17
POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)	17
NESTED PCR	18
DNA-RENING	19
CYKELSEKVENSERING	19
RESULTAT	20
DISKUSSION	21
SLUTSATS	23
LITTERATURFÖRTECKNING	24

SAMMANFATTNING

Syftet med denna studie var att undersöka om smågnagare utgör en naturlig reservoar för encefalomyokarditvirus i svenska grisstallar. Liknande undersökningar är inte tidigare genomförda i Sverige.

Kliniska sjukdomsutbrott orsakade av infektioner med encefalomyokarditvirus (EMCV) har förekommit bland europeiska grisbesättningar. Den kliniska bilden varierade mellan utbrotten och fortfarande råder oklarheter kring den kliniska betydelsen av EMCV. De symtom som kunnat ses hos drabbade grisar är reproduktionsstörningar och myokardit. Smågnagare har visat sig vara naturliga värdar av EMCV. Virus kan spridas mellan gnagare, mellan gnagare och grisar samt mellan grisar.

En tidigare undersökning i Sverige har visat att 16,8 % av undersökta grisar var seropositiva. Direkt påvisande av viruset har aldrig tidigare utförts i Sverige. I svenska grisbesättningarna saknas ibland förklarande diagnoser vid plötsliga dödsfall och reproduktionsstörningar. EMCV kan möjligen ha en bidragande roll kring de kliniska mönstren som ses.

I studien analyserades förekomsten av EMCV bland gnagare i svenska grisbesättningar. Hjärtvävnad från 97 gnagare fångade i åtta grisbesättningar, samt ytterligare 28 gnagare analyserades, av vilka de senare var fångade i andra miljöer. Analyserna genomfördes med hjälp av RT-PCR och 10 prover (10,3 %) från grisbesättningar visade sig vara positiva för EMCV. Femtio % av besättningarna visade sig ha positiva prover och 75 % av dessa hade >1 positiv gnagare. Ett positivt prov hittades i en värphönsbesättning.

Resultaten indikerar att infektion med EMCV är vanligt eller mycket vanligt förekommande i Sverige. Ytterligare undersökningar krävs för att fastställa den kliniska relevansen av dess förekomst.

SUMMARY

The purpose of this study was to investigate whether small rodents are the natural reservoir of encephalomyocarditis virus in Swedish pig herds. Similar studies have not been carried out in Sweden.

Clinical outbreak of infections with encephalomyocarditis virus (EMCV) have been recorded among European pig herds. The clinical picture varied between the outbreaks and the clinical significance of EMCV is still unclear. Symptoms that could be seen in affected pigs are reproductive failure and myocarditis. Small rodents have proven to be the natural host of EMCV. Virus can be spread between rodents, from rodents to pigs and between pigs.

An earlier study in Sweden has shown that 16.8% of the examined pigs were seropositive. Direct detection of the virus has never before been performed in Sweden. The Swedish pig herds sometimes lack diagnoses when sudden deaths and reproductive disorders occur. EMCV can possibly have a contributing role on these clinical patterns.

This study analyzed the presence of EMCV among rodents in Swedish pig herds. Cardiac tissue from 97 rodents captured in eight pig herds were analyzed along with 28 rodents, which instead was trapped in other environments. The analysis was conducted using RT-PCR and 10 samples (10.3%) from pig herds were found to be positive for EMCV. Fifty % of these herds had positive samples of which 75% had >1 positive rodent. One additional positive sample was found in a poultry farm.

The results indicate that EMCV is a common or very common infection in Sweden. Further investigation is needed to determine the clinical relevance of its occurrence.

INLEDNING

Bakgrund

Encefalomyokarditvirus (EMCV), genus *Cardiovirus*, är ett icke höljeförsett RNA-virus inom familjen *Picornaviridae* (Quinn *et al.*, 2002 b). Viruset isolerades första gången 1945 i Florida hos schimpans (Helwig *et al.*, 1945). Första gången som infektion upptäcktes på gris var 1960 i Panama (Murnane *et al.*, 1960). Viruset har visat sig kunna ge reproduktionsstörningar (Koenen *et al.*, 1994) och myocardit hos infekterade grisar (Billinis *et al.*, 2004; Gelmetti *et al.*, 2005). EMCV, isolerade från fångade råttor i Europa, visade sig vara genetiskt lika motsvarande virus isolerade från gris i det aktuella landet (Koenen *et al.*, 1999).

Fortfarande råder oklarheter kring den kliniska betydelsen av EMCV. Ute i grisbesättningarna saknas ibland förklarande diagnoser vid plötsliga dödsfall och reproduktionsstörningar. EMCV kan möjligen ha en bidragande roll kring de kliniska mönstren som ses. Ett av de första stegen i utredningen kring EMCV kan vara att skaffa sig en överblick över virusets förekomst bland gnagare i anslutning till grisbesättningarna.

En tidigare undersökning i Sverige (Widén, 1994) visade att svenska grisbesättningar blivit exponerade för encefalomyokarditvirus. Serologiska tester utfördes för att försöka påvisa antikroppar mot EMCV och serokonversion kunde påvisas hos 16,8 % av de testade grisarna.

Syfte

Syftet med denna studie var att undersöka om smågnagare utgör en naturlig reservoar för encefalomyokarditvirus i svenska grisstallar. Liknande undersökningar är inte tidigare genomförda i Sverige.

LITTERATURÖVERSIKT

Allmänt om EMCV

Förekomst i Europa

Sjukdomsutbrott orsakade av encefalomyokarditvirus (EMCV) under 90-talet studerades av Maurice *et al.*, (2006). Ett antal europeiska länder studerades avseende kliniska utbrott av viruset med hjälp av serologisk undersökning. Variation mellan de olika utbrotten i Europa kunde ses. De skilde sig åt genom att olika ålderskategorier av grisarna angreps och de kliniska symtomen varierade i uttryck. Länder som utbrott kunde ses i var Belgien, Italien, Grekland och Cypern, medan seropositiva grisar utan några utbrott fanns i Frankrike och Österrike.

Knowles *et al.*, (1998) jämförde isolat av EMCV från olika platser i Italien med isolat från Nederländerna. Det visade sig att dessa isolat var närbesläktade och att grisar förmodligen ligger bakom spridningen av viruset.

Acland *et al.*, (1975), beskrev ett utbrott i södra Wales 1970. En mortalitet från några få procent upp till 50 procent kunde observeras hos smågrisar mellan 21 dagar och 16 veckor. Dock var de yngre mer drabbade.

Virusgenomet

Denis *et al.*, (2006) och Vanderhallen & Koenen (1998) visade att EMCV genomet är relativt stabilt. I ett försök gjorde Denis *et al.*, (2006), tolv *in vivo* passager hos åtta veckor gamla smågrisar. Efteråt kunde inga betydande mutationer identifieras i virusets genotyp förutom i ett av isolaten. I det isolatet kunde variation ses både i virusets genotyp och i dess symtombild. Sammantaget så hittades inget samband eller någon förklaring till varför variation uppstår i den kliniska sjukdomsbilden till följd av virusets genotyp. Enligt Denis *et al.*, (2006) kan virusets anpassningsförmåga till olika arter eventuellt ha påskyndat och gjort EMCV- problematiken aktuell idag.

Riskfaktorer för en besättning

Undersökningar gjorda av Maurice *et al.*, (2007) visade olika faktorer betydelse för förekomst av EMCV i grisbesättningar. Betydelsen av närvaro av möss för att infektionen skulle finnas i besättningen kunde styrkas. Ytterligare riskfaktorer som identifierades var nötkreatur i nära anslutning till grisbesättningen, automatisk utfodring samt om dricksystemen var gemensamma för grisgruppen. Som skyddsfaktor fann man istället att allmänna hygienrutiner tillsammans med goda rutiner för avföringshantering hade en negativ inverkan på spridningen. De fann även indikation på att avföringen från smittade grisar, som trängde upp underifrån genom spalten vid exempelvis avflödes hinder, skulle kunna fungera som ett vaccin.

Naturliga värdar av EMCV

Naturliga värdar av EMCV är gnagare (Spyrou *et al.*, 2004), där råttor och möss har visats vara bärare av viruset (Psalla *et al.*, 2006 a, b). Att råttor kan vara bärare av viruset stärks av en studie där ett kliniskt utbrott av EMCV i Panama bland grisar undersöktes. Infångade råttor undersöktes serologiskt och råttorna visade sig vid analys vara serologiskt positiva för EMCV (Murnane *et al.*, 1960). Två olika stammar av EMCV, kända för att ge reproduktionsstörningar respektive myokardit, studerades av Koenen *et al.*, (1997) i ett infektionsförsök. De visade att de båda stammarna av viruset kunde orsaka både myokardit och reproduktionsstörningar, det vill säga korsa placentan. Dock sågs skillnader mellan stammarna i virulens.

Försök har gjorts där råttor infekterats med två olika stammar av EMCV, en grekisk och en belgisk stam (Spyrou *et al.*, 2004). Syftet var att undersöka hur smittan överfördes mellan gnagare samt hur virusmittan påverkade det enskilda djuret. Ingen av råttorna visade några kliniska symtom under försöket. Det visade sig också att smittan spreds horisontellt och att alla kontaktdjuren blev smittade utan att någon dog. Från levande råttor kunde enbart låga koncentrationer neutraliserande antikroppar påvisas, troligen till följd av att djuren avlivats tidigt. I thymus och peyerska plaque kunde EMCV isoleras oberoende av infektionsdos. Efter infektionstillfället minskade mängden virus i övriga vävnader i kroppen med tiden. Man fann även att en smittad råtta enkelt sprider viruset vidare till minst 2 andra råttor. Resultaten tyder på en stor förmåga hos viruset att spridas mellan råttor, hållas kvar inom råttpopulationen och därmed göra råttor till sin naturliga reservoar.

Vidare så diskuterade Psalla *et al.*, (2006 a) EMCV's möjlighet att kunna persistera bland råttor. Viruset påvisades i makrofager, i enlighet med Spyrou *et al.*, (2004), bland annat i thymus och i mjälten. I thymus kunde virus isoleras 56-62 dagar efter infektion, vilket visar på en stor förmåga hos viruset att överleva i råttan.

Patogenes vid EMCV

Infektion hos råttor

Psalla *et al.*, (2006 a) visade att överföring av EMCV mellan råttor, samt mellan råttor och grisar, sker via råttans avföring. Enligt Spyrou *et al.*, (2004) så utsöndras EMCV i avföringen hos infekterade råttor mellan dag 2 och dag 29. Detta bekräftar slutsatsen som Murnane *et al.*, (1960) redan i tidigare studier dragit om att avföring från gnagare sprider viruset i grisarnas miljö då avföringen kontaminerar bland annat grisarnas foder och vatten. I studien av Spyrou *et al.*, (2004) visade ingen av försöksråttorna några kliniska symtom. Vid obduktion av de infekterade djuren kunde inte heller några makroskopiska lesioner påvisas. Råttorna var under försöket infekterade med en dos dödlig för grisar. Då ingen av råttorna dog visar detta på dess potential som smittspridare vid kliniska utbrott i grisbesättningar.

Psalla *et al.*, (2006 a) kunde även visa via immunmarkörer att råttans hjärta var infekterat av viruset. Mer i detalj sågs viruspartiklar både i cellernas cytoplasma och i deras cellkärna. Virus kunde även frekvent isoleras från pankreas hos infekterade råttor. Vid histopatologisk undersökning av pankreas sågs nekros, degeneration och metaplasi av körtelvävnad. Detta tyder på skillnader i de cytopatogena egenskaperna hos de två stammarna av EMCV som undersöktes. När den grekiska och den belgiska stammen jämfördes, sågs enbart patologiska förändringar efter den grekiska stammen. Infektion av pankreas kunde eventuellt förklara varför det var möjligt att påvisa viruset i råttans avföring. Hos infekterade råttor kunde EMCV isoleras från lymfoid vävnad (Spyrou *et al.*, 2004). Denna egenskap hos viruset kunde även ses vid infektion hos gris enligt Gelmetti *et al.*, (2005).

Infektion hos möss

Psalla *et al.*, (2006 b) satte upp ett försök med möss liknande det försök som Psalla *et al.*, (2006 a) tidigare satt upp för råttor. Resultaten för möss liknade de resultat som tidigare fått fram för råttor. Psalla *et al.*, (2006 b) visade att överföringen av viruset mellan möss, samt mellan möss och grisar, sker via musens avföring. Virusantigen kunde identifieras i olika organ, framför allt från thymus, pankreas, avföring och hjärta. Skillnader fanns mellan möss och råttor vid undersökning av inre organ, inklusive thymus. Det man fann var att hos mus var det inte möjligt att isolera viruspartiklar av EMCV med bibehållen struktur eller cytopatogen effekt. Till skillnad från råttor är mössens förmåga till ny viremi inte trolig hos möss i slutskedet av infektion (Psalla *et al.*, 2006 b). Hos råttor däremot kan viruset åter få fäste och på nytt spridas i kroppen under slutskedet av infektionen. Jämfört med råttor pågick utsöndring av virus från avföringen hos mus endast under begränsad tid. Detta gör att råttor kan anses spela en marginellt mer betydande roll än möss vid epidemiologin kring EMCV (Psalla *et al.*, 2006 b). Vid försök av LaRue *et al.*, (2003) dog alla möss som infekterats med EMCV.

Dräktiga möss har i försök inokulerats med EMCV för att studera effekten av viruset under dräktighet (Nakayama *et al.*, 2004). Resultatet blev fosterdöd efter 3 dagar efter infektion och efter ytterligare två dagar var så gott som alla foster döda. Livmodern visade sig vara opåverkad medan virusreplikationen ägde rum i foster och i placentan. Hos foster observerades myokardit 3 dagar efter infektion. Infektion av placenta och foster anses vara den primära orsaken till död hos musfostren.

Infektion hos gris

Grisar har en relativt kort exkretionsfas av EMCV. Billinis *et al.*, (2004) visade att antikroppar mot EMCV finns i blodet hos tidigare oexponerade grisar redan efter två till tre dagar efter infektionstillfället. Detta kan förklara varför den viremifas som djuren genomgår är så kort. Billinis *et al.*, (2004) visade att både ökningen av antikroppshalten till följd av ökad virusdos, samt minskning av antikroppshalten i relation till tid efter infektion, följer linjära samband.

Encefalomyokarditvirusets spridning genom kroppen hos gris studerades av Gelmetti *et al.*, (2005). Tjugosex grisar, med vikt runt 15 kg, infekterades oronasalt. Grisarna avlivades efter ett visst schema, om de inte självdog under försökets gång. Att virusisolering från hjärta hos avlivade grisar var möjlig redan vid 12 timmar efter infektion visades av Gelmetti *et al.*, (2005). Lever, mjälte, tarm, bukspottkörtel, njure och hjärna visade inga tecken på förändringar vid histologisk undersökning (Gelmetti *et al.*, 2005). Alla organ, förutom tarm, var negativa för EMCV och en generell spridning till organ liknande den hos möss och råttor i försök utförda av Psalla *et al.*, (2006 a, b) kunde inte ses hos dessa grisar. Organ som Gelmetti *et al.*, (2005) fann förändringar i var tonsiller, lymfknutor och hjärta, i enlighet med Billinis *et al.*, (1999). De lyckades påvisa en primär viremi som följdes av en sekundär viremi.

Primär viremi

Den primära viremin inleds med att EMCV infekterar tonsillerna (Gelmetti *et al.*, 2005). I tonsillerna infekteras sedan makrofager och där kunde virus detekteras 6-12 timmar efter infektion. Därefter följer förändringar i lymfknutorna i form av follikulär hyperplasi och 12-24 timmar efter infektion kan virus påvisas i hjärtmuskelcellerna. Viruset befinner sig då i cellerna cytoplasma och enbart lindrigt avgränsade förändringar i hjärtmuskelcellernas struktur (6-30 timmar efter infektion) kan observeras, som resultat av den tidigare inledda replikationen. Liknande resultat kunde ses av Billinis *et al.*, (1999), där förändringar i hjärtmuskel sågs från 36 timmar efter infektion. Enligt Gelmetti *et al.*, (2005) tyder detta på att den inledande spridningen ut i griskroppen sker med hjälp av makrofager, då virus i blodet inte kunde ses under den inledande primära viremifasen. Kim *et al.*, (1989) hittade rikligt med mononukleära celler i hjärtmuskeln hos ett grisfoster som dött till följd av EMCV. Brewer *et al.*, (2001) identifierade också, förutom i hjärta, förändringar i hjärnvävnaden under den akuta fasen hos infekterade grisar. Man såg lymfocytinfiltration, degeneration av nervceller och glios.

Sekundär viremi

Den sekundära viremin, då virus kan påvisas i blodet, startar vid 30 timmar efter infektion (Gelmetti *et al.*, 2005). Runt 42 timmar efter infektion observeras mer omfattande förändringar i hjärtats struktur. I histologiska snitt av hjärtat ses områden med nekros och cellinfiltration av lymfocyter, makrofager, plasma celler samt en och annan neutrofil. Hjärmuskelcellerna kan vara hypertrofiska med förändringar i cellkärnan. Främst höger och vänster kammare får förändringar. Billinis *et al.*, (2004) kunde också hitta liknande förändringar i hjärtats kamrar, men såg även förändringar i epikardium och endokardium, samt i papillarmuskulerna. Zimmerman *et al.*, (1990) fann även fibrösa sammanväxningar mellan hjärtsäck och hjärta.

Under den kroniska fasen i hjärnvävnaden sågs istället perivasculär cuffing (Brewer *et al.*, 2001). Enligt Acland *et al.* (1975) sågs fibros i myokardiet som var under avläkning, men virus kunde inte isoleras.

Spridning mellan grisar

För att undersöka patogeniciteten hos en grekisk och en belgisk stam av EMCV, samt spridningen mellan grisar, gjorde Billinis *et al.*, (1999) ett försök med totalt 21 grisar. Medelåldern på grisarna var 40 dagar, då detta är medelåldern för kliniska utbrott i fält.

För båda stammarna gällde att virus kunde isoleras i blodet med början en dag efter exponering och därefter under cirka två dagar (Billinis *et al.*, 1999). Ett mönster liknande det som sågs för utsöndring av virus i blodet, kunde även ses för utsöndringen av virus i avföring och nässekret. Det var alltså under den akuta fasen av sjukdomen (Gelmetti *et al.*, 2005), det vill säga den sekundära viremin, som framför allt utsöndringen av virus skedde.

Enligt Billinis *et al.*, (1999) infekterades de friska kontaktindivider inom 1-2 dagar efter introduktion till de smittade grupperna. Enligt Murnane *et al.*, (1960) kan spridningen av virus mellan grisar också ske genom att infekterade grisar faeceskontaminerar foder och dricksvatten eller då grisar äter upp döda infekterade individer (Maurice *et al.*, 2002). En del grisar dör så fort efter infektion (Maurice *et al.*, 2002) att någon spridning mellan grisarna inte är möjlig.

Spridningen mellan grisar under ett utbrott blir förmodligen begränsad på grund av den korta viremifasen (Maurice *et al.*, 2002). Dock kunde man inte belägga att den begränsade spridningen i besättningen skulle hindra smittan från att persistera. Vad som styr sjukdomsutvecklingen är ännu inte helt känt. Enligt Gelmetti *et al.*, (2005) kan grisens förmåga att hindra transporten av virus till hjärtmuskel- och purkinjecellerna vara avgörande, då störst virusmängd återfinns här när kliniska symtom uppträder.

Enligt Maurice *et al.*, (2002) bör fler studier göras för att studera betydelsen av subkliniska fall av EMCV vid utbrott. Misstanke har också riktats mot att andra faktorer som smågnagare har betydelse för smittspridningen (Psalla *et al.*, 2006 a, b).

Symtom hos gris

Plötsliga dödsfall

Det enda symtom, som observerats av Gelmetti *et al.*, (2005), var fyra plötsliga dödsfall bland 26 infekterade grisar. Dödsfall kunde även ses vid försök gjorda av Billinis *et al.*, (1999). Där dog fem av de 21 grisar som ingick i försöket, där alla som dog var infekterade med en grekiska stam.

En förklaring till de plötsliga dödsfallen kan man möjligen hitta hos Billinis *et al.*, (1999). Under försöket studerades vilka specifika celler i hjärtmuskeln som infekteras med EMCV. Ingen skillnad mellan de två undersökta EMCV-stammarna kunde ses och precis som Gelmetti *et al.*, (2005), hittades virus i hjärtmuskeln. Vid den histologiska undersökningen av hjärtmuskelvävnaden påvisades viruspartiklar även i makrofager, endotelceller och i purkinjeceller. Infektion av purkinjecellerna kan eventuellt vara förklaringen till en del av de plötsliga dödsfall som inträffar i samband med infektion av EMCV.

Vid obduktion av grisarna efter dödsfall eller avlivning, påvisades vätska i bukhåla, brösthåla, hjärtsäck samt i lungorna (Billinis *et al.*, 1999). Vätskeutträdet till kroppshålor och organ kan vara orsakad av ökad permeabilitet i blodkärlens endotelceller till följd av infektion av EMCV. En liknande iakttagelse gjordes av Murnane *et al.*, (1960). Obduktionsfynden stämde överrens med de kliniska symtom som observerades hos drabbade grisar under utbrottet. De hade då kollapsat och dött efter fem minuter efter att först ha drabbats av andningsproblem. Dock var myokardit hos dessa grisar den dominerande obduktionsbilden.

Billinis *et al.*, (2004) kunde visa att dödligheten hos grisarna minskade i takt med minskad virusdos. De kunde även visa ett inverterat samband mellan makro- respektive mikroskopiska fynd, och grisarnas ålder. Äldre djur kring 105 dagar var relativt mer motståndskraftiga mot infektion än yngre individer mellan 20 dagar och 40 dagar. De äldre grisarna uppvisade mindre grad av förändringar i inre organ men viremifasen varade ändå någon dag längre jämfört med de yngre grisarnas.

Reproduktionsproblem

Åtta dräktiga suggor infekterades med en belgisk stam av EMCV för att studera dess effekt på dräktigheten (Koenen *et al.*, 1994). Stammen var känd för att tidigare ha orsakat reproduktionsproblem hos suggor. Djuren infekterades vid olika tidpunkter under dräktigheten (mellan dag 60 och dag 92) antingen intramuskulärt eller intranasalt. Alla suggor utvecklade antikroppar mot EMCV. Enbart de två suggorna som infekterades dag 60 i dräktigheten grisade tidigare än beräknat, efter totalt 101 respektive 108 dagars dräktighet. Övriga suggor grisade vid förväntad tidpunkt. Intranasalt infekterade suggor födde levande men svaga kultingar, medan intramuskulärt infekterade suggor förutom svaga kultingar även hade någon dödfödd kulting i kullen. Vid obduktion av de dödfödda kultingarna hittades inga onormala fynd och kropparna var väl utvecklade. Från hjärta och mjälte hos en del kultingar kunde virus urskiljas. Detta demonstrerar en transplacent infektion av foster, även under senare del av dräktighet. Det bekräftas också av att man hos döda smågrisar även hittat antikroppar mot

EMCV, trots att någon råmjölksgiva ännu inte hade givits och att transplacental transport av antikroppar hos gris inte är möjlig. Virus kunde även isoleras från smågrisar som blivit en månad gamla.

Differentialdiagnoser

Reproduktionsstörningar

Problemet som praktikern ofta står inför vid reproduktionsproblem i fält är att aktuell agens inte är närvarande när symtom väl uppträder hos djuret (Straw *et al.*, 1999). Om det rör sig om exempelvis aborterade foster, så kan fostren ha angripits långt tidigare och orsaken är då svår att finna. Har fostren vid abort ungefär samma ålder och deras beräknade ålder stämmer med insemineringen, kan suggan misstänkas vara det bakomliggande problemet. Om suggan har en stor kull och ett antal av kulingarna är normalt utvecklade men döda vid grisning kan orsaken vara utdragen förlösning. Finns det mumifierade foster i kullen, bör dock en infektion misstänkas ligga bakom. Är kulingarna vid abort dessutom av olika åldrar bör en infektiös orsak misstänkas.

Enligt Koenen *et al.*, (1994) och Joo *et al.*, (1988) kan aborterade eller nyfödda kulingar ha antikroppar mot EMCV i brösthålans vätska. Antikropparna kan användas som diagnostisk metod för att hitta den bakomliggande orsaken till aborten (Straw *et al.*, 1999). Foster har normalt inga antikroppar i blodet vid grisning då miljön i livmodern normalt är steril och inga antikroppar kan passera över placentan. Vid en infektion så har fostret från dag 70 i dräktigheten förmågan att producera egna antikroppar. Antikroppar från foster är diagnostiskt. Närvaro av antikroppar kan eventuellt minska möjligheten att genom virusisolering påvisa virus i vävnader, då antikropparna kan ha en neutraliserande förmåga (Joo *et al.*, 1988; Kim *et al.*, 1989).

Infektiösa agens (Tabell 1) vid abort hos sugga kan vara virus, bakterier, parasiter eller mögel (Straw *et al.*, 1999). Övriga orsaker till abort är grisionskomplikationer, suggans näringsstatus, miljöfaktorer, toxiner eller teratogener. Virus är den mest framträdande patogena orsaken till abort hos suggor (Quinn *et al.*, 2002 c).

Många fler mikroorganismer än de som nämns i Tabell 1 finns beskrivna som orsak till abort (Straw *et al.*, 1999). Dessa agens orsakar inte abort av foster primärt utan ger exempelvis upphov till en generell infektion i kroppen och ibland även infektion i livmodern med systemisk påverkan (Quinn *et al.*, 2002 c). Bakterier, virus och toxiner i blodet kan bland annat orsaka förhöjd kroppstemperatur och påverkad endokrin styrning av dräktighet, vilket kan sätta igång en abort. Exempel på sådana agens är bland annat *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Streptococcus suis* typ 2 och Afrikansk svinpest.

Tabell 1, Patogener som ger upphov till reproduktionsproblem hos gris (efter: Straw *et al.*, (1999); Quinn *et al.*, (2002 c))

Sjukdom	Symtom
Virus	
Klassisk svinpest	SMEDI (stillbirth, mummification, embryonic death and infertility), underutvecklade foster
Encefalomyokarditvirus	SMEDI, myokardit
Porcine enterovirus	SMEDI
Adenovirus	
Reovirus	
Cytomegalovirus	
Aujeszky's disease virus	SMEDI, systemisk sjukdom
Porcine herpesvirus typ 2	Mumifiering och fosterdöd
Porcine parvovirus	SMEDI
Porcine respiratory and reproductive virus (PRRS)	SMEDI
Bakterier	
Brucellos (<i>Brucella suis</i>)	Dödfödslar, abort i senare del av dräktighet, systemisk spridning
Leptospiros	Abort i senare del av dräktighet, subklinisk infektion, dödfödslar, mumifiering och svagfödda
Parasiter	
<i>Toxoplasma gondii</i>	Abort, dödfödslar
Mögel	
Zearalenone	Abort, dödfödslar

Hjärtmuskelsjukdomar

Många olika typer av sjukdomar kan drabba hjärtat (Darke *et al.*, 1996). Antingen kan sjukdomen vara isolerad till hjärtat eller vara en del av ett sjukdomstillstånd där hela kroppen är involverad. Sjukdomar, Tabell 2, som kan drabba hjärtmuskeln hos gris kan bland annat bero på genetiska, infektiösa och nutritionella orsaker (Radostits *et al.*, 2007). Dessa kan ge upphov till hjärtsvikt antingen genom rytmrubbning eller genom inverkan på hjärtats kontraktilitetsförmåga (Darke *et al.*, 1996). Beroende på vilken sida av hjärtat som påverkats kan olika symtom komma till uttryck. Högersidig hjärtsvikt ger bland annat ascites medan vänstersidig svikt kan ge lungödem.

Tabell 2. Sjukdomar som kan ge myokardit hos gris (Efter: Aiello *et al.*, 1998; Radostits *et al.*, 2007)

Sjukdom
Infektiösa
Mul- och klövsjuka
Swine vesicular disease
Parvovirus
Encefalomyokarditvirus
Porcine respiratory and reproductive virus (PRRS)
Salmonellos
Rödsjuka
Streptokockinfektioner
Nutritionella
Selen- och E-Vitamin brist
Kopparbrist
Järnbrist
Genetiska
Malign hypertermi
Hypertrofisk cardiomyopati

EMCV diagnostik

Molekylär diagnostik

Reverse Transcriptas - Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

Möjligheten att använda RT-PCR som alternativ till virusisolering och virusneutralisation, undersöktes av Vanderhallen & Koenen (1998). Hjärta som provmaterial visade sig vara det bästa organet. Sensitiviteten var 94 % medan specificiteten var 100 %. Nedre gräns för möjlighet att identifiera EMCV låg på en viruspartikel per 100 mg vävnad. Enligt Quinn *et al.*, (2002 b), går det att särskilja EMCV från FMDV (foot-and-mouth disease virus), som också hittas i familjen picornaviridae.

Serologiska tester

Serum neutralisationstest

Ett vanligt förekommande diagnostiskt verktyg för EMCV är serum neutralisationstest (Zimmerman *et al.*, 1990). Testet går ut på att man i en brunn tillsätter virus till celler som är känsliga för viruset (Quinn *et al.*, 2002 a). I brunnen finns också tillsatt provserum som ska skydda cellerna från viruset. Provserumet har olika spädningar och med det minskar förmågan att neutralisera viruset och skydda de känsliga cellerna. Utifrån detta kan typen och mängden av antikroppar ses.

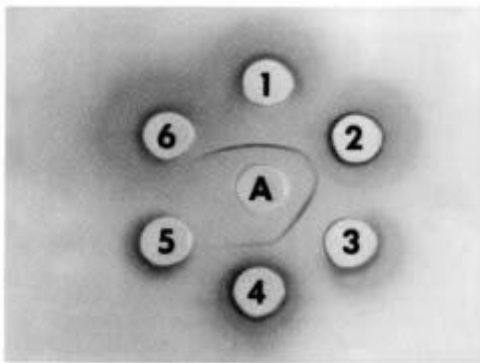
Testet visade sig både ha hög specificitet och sensitivitet (Zimmerman *et al.*, 1990). Vid titer >16 var specificiteten 100 % och sensitiviteten 93,9 %. Enligt Zimmerman *et al.*, (1990) är det en fördel att använda parprov. Det är möjligt då antikropps nivåerna håller sig konstanta under minst ett par månader. Ett enskilt

positivt serumprov räcker inte för att kunna säga att det aktuella agens som hittats är orsaken till problemet (Straw et al, 1999). För att kunna säkert påvisa en pågående infektion krävs att man ser en titerstegring.

Negativa egenskaper för serum neutralisationstest är testets oförmåga att ge information om antikropparnas svar mot enskilda strukturer (Kim *et al.*, 1991). Äldre grisar kan också av okänd anledning visa positiva titrar, på grund av ospecifika antikroppar, utan att ha exponerats för EMCV. De viruskänsliga cellerna påverkas också av toxiska egenskaper i provet som kan påverka avläsningen, som till exempel kontamination av provet med bakterier. Denna påverkan kan ge en titerstegring upp till en titer av 1:8. Detta försvårar tolkningen av låga antikroppstitrar i serumet.

AGID (Agar gel immunodiffusionstest)

Till testet gjuts en gel med sex brunnar i cirkel runt en centralt placerad brunn (Kim *et al.*, 1991). I den centralt placerade brunnen placeras framrenat EMCV-antigen. I brunnarna runt omkring, placeras provserum samt positiv och negativ kontroll. Antikropparna och antigenet diffunderar i gelen och när de möts bildas en utfällning i form av en linje som sedan kan läsas av (Figur 1).



Figur 1. Agar gel immunodiffusionstest (Kim *et al.*, 1991).

AGID-testet utvärderades av Kim *et al.*, (1991). Det jämfördes med hemagglutination-inhibition- och serumneutralisationstestet för att påvisa EMCV. Serumneutralisationstest är det mest använda serologiska testet och det visade sig att AGID i jämförelse hade mycket gott till utmärkt resultat.

Hemagglutination-inhibitionstest

EMCV har förmågan att agglutinera röda blodkroppar och därför har hemagglutination-inhibitionstest utvecklats (Quinn *et al.*, 2002 b). Provserum med eventuella antikroppar sätts till viruset och de röda blodkropparna (Quinn *et al.*, 2002 a). Vid påvisande av antikroppars inhibition av agglutinationen av de röda blodkropparna till följd av att antikropparna binder in till viruset. Provserum tillsätts i två-stegs spädningar.

Positiva egenskaper för testet är att det inte är speciellt känsligt för dålig provkvalité och det är lätt att genomföra (Kim *et al.*, 1991). Högre antikroppstitrar sågs jämfört med serum neutralisationstestet. Enligt Kim *et al.*, (1991) kan detta bero på högre halt av just denna typ av hämmande antikroppar i fostret. Hemagglutination inhibition testet står sig starkt jämfört med andra serologiska

tester. Med serum neutralisationstestet som standard är sensitiviteten och specificiteten 91,5 % respektive 81 %, vilket ansågs tillfredsställande.

Western immunoblottnig

Genom att placera viruspartiklar i en gel och köra en elektrofores så avskiljs virusproteiner (Quinn *et al.*, 2002 a). Dessa proteiner fästs på ett membran i gelen och bildar band. Membranet klipps i remsor och provserum tillsätts till remsorna. Via antiglobuliner åskådliggörs om några antikroppar fästs från provserumet genom att binda in till proteinbanden på membranremsan.

Vid körning av Kim *et al.*, (1991) bildades 3 proteinband på membranremsan. Testet visade en stor förmåga att påvisa antikroppar i låga titrar, till skillnad från andra serologiska tester. Enligt Kim *et al.*, (1991) bör man undersöka, för att undvika falskt negativa resultat, minst två foster från två onormala kullar per EMCV drabbad besättning.

Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Vid ELISA renas virusantigen fram och fästs till botten av en brunn (Quinn *et al.*, 2002 a). Provserum tillsätts och reagerar med antigen på botten av brunnen. Vid tillsatts av antiglobuliner med ett enzym fastsatt i änden sker en fluorescerande reaktion som åskådliggör eventuell bindning av antikroppen till virusantigen.

Shanley (1980) undersökte möjligheten att använda ELISA för detektion av EMCV-antikroppar av immunoglobulin G-klass. Vid analys av serum utan antikroppar sågs en svag reaktion trots att provet var negativt. Vid körning av provserum positivt för antikroppar mot EMCV sågs en tydlig reaktion och skillnaden mot negativt provserum var uppenbar.

Ett antal fördelar vid analys med ELISA gentemot andra serologiska metoder hittades (Shanley 1980). Virusets antigener visade sig vara hållbara och dugliga uppemot ett halvår. Övriga reagenser används flitigt och är lättillgängliga vilket gör användningen av metoden okomplicerad. Nackdelarna med ELISA är att metoden enbart testats på musserum samt att antikroppar korsreagerar mellan olika stammar av EMCV.

Zoonosaspekten avseende EMCV

Enligt Quinn *et al.*, (2002 b), kan encefalomyokarditviruset även infektera människa. Undersökningar gjorda av Brewer *et al.*, (2001) stärker detta. Försök har gjorts för att isolera EMCV hos 100 grisar vilka var seronegativa för EMCV. Det visade sig att isolering av viruset var möjligt hos två av grisarna trots att djuren var antikroppsnegativa. Detta tyder på en möjlighet att viruset har en förmåga att persistera hos gris. Vidare undersökningar visade att EMCV kunde infektera hjärtvävnad från människa. Dessa upptäckter kan vara av stor betydelse vid organtransplantation. Risken finns att ett infekterat grisorgan kan infektera den mottagande människan.

LaRue *et al.*, (2003) infekterade möss, grisar och makaker för att studera hur människa skulle reagera på en EMCV-infektion. Alla mössen dog inom 7 dagar efter infektionstillfället. Av grisarna dog 16,2 % och resterande djur visade inte

några kliniska symtom, men förändringar sågs vid obduktion. Trots resultaten för möss och grisar visade makaker inga symtom. Från makakerna isolerades virus från blod, mjälte, lever, hjärta, hjärna, njure och skelettmuskulatur. Histologiska förändringar sågs i hjärna och hjärta. I hjärta sågs inflammatoriska processer, degeneration av hjärtmuskelceller och nekrotiska områden medan perivaskulär cuffings sågs i hjärnan. Detta kan eventuellt tyda på att människa inte nödvändigtvis behöver utveckla allvarliga symtom vid organtransplantation från grisar infekterade med EMCV. Vid organtransplantation är patienterna immunosupprimerade vilket förmodligen ökar risken för infektion och i värsta fall allvarliga symtom.

MATERIAL OCH METODER

Gnagarmaterialet

För undersökning av förekomst av EMCV i Sverige, användes 97 gnagare från 8 grisgårdar insamlade under 13 månader i ett pågående doktorandprojekt. Burfälla, slagfälla och gevär användes för att fånga dem. Därefter obducerades gnagarna och bitar från olika organ frystes in. Till detta projekt användes bitar från hjärta från husmus, skogsmus, större skogsmus och brunråtta (Tabell 3). Totalt kom gnagarna ifrån åtta olika gårdar med grisproduktion.

Tabell 3. Antal och andel undersökta gnagare, samt könsfördelning i grisbesättningar

Art	Antal	Andel	Könsfördelning
Husmus	63	65%	(honor 55,5 %, hanar 36,5 %, okänd 8 %)
Brunråtta	27	28%	(honor 33,3 %, hanar 63 %, okänd 3,7 %)
Större skogsmus	5	5%	(honor 20 %, hanar 80 %)
Skogsmus	2	2%	(Honor 50 %, hanar 50 %)
Totalt	97		(Honor 47,5 %, hanar 46,4 %, okänd 6,2 %)

Materialet kompletterades med gnagare fångade i andra typer av miljöer, totalt 6 olika platser. Dessa gnagare, 28 totalt, kom från fjäderfäbesättningar, en nötbesättning samt från områden med stadsmiljö. En närmare beskrivning av provmaterialet visas i Tabell 4.

Tabell 4. Beskrivning av gnagarmaterialet avseende gårdstyp/plats och län

Namn	Gårdstyp/Plats	Län	Brunnrätta	Husmus	Skogsmus	Större skogsmus	Antal gnagare
A	Integrerad grisbesättning	Västmanland		9	2		11
B	Slaktsvinsbesättning	Uppland	17	1			18
C	smågrisbesättning	Uppland		21		1	22
D	Slaktsvinsbesättning	Stockholm		16			16
E	smågrisbesättning	Halland		2			2
F	smågrisbesättning	Jönköping		1			1
G	Integrerad grisbesättning, ute	Uppland		7	4		11
H	Integrerad grisbesättning	Uppland	10	6			16
			Totalt	63	6	1	97
			antal:				
I	Höns- och nötstall	Uppland	4				4
J	värphönsbesättning, ute	Stockholm		5			5
K	Stadsmiljö	Uppland	5				5
L	Stadsmiljö	Uppland	4				4
M	Stadsmiljö	Uppland		2			2
N	Unghönsbesättning	Uppland		8			8
			Totalt	13	15		28
			antal:				

Positiv och negativ kontroll

Encefalomyokarditvirus från schimpans användes som positiv kontroll. Schimpansen hade vid döden drabbats av lungödem, vätska i brösthålan och myocardit. Viruset, VR-129 från American Type Culture Collection (ATCC), isolerades 1944 i Florida.

SuperQ-H₂O användes som negativ kontroll under hela analysen vid varje enskild körning.

Primers

Aktuella primers (Tabell 5), CBA F och CBB R, användes enligt Denis *et al.*, (2006). Dessa beställdes och producerades hos Thermo Scientific, Ulm, Tyskland. Aktuell genomregion heter 5'-UTR. Här amplifierar dessa primers en region på virusgenomet som är 598 baspar lång.

Tabell 5. Aktuella primers och deras sekvens (Efter Denis *et al.*, 2006)

Primer	Sekvens	Plats i virusgenomet (bp)
CBA F	5'- AAT AAG GCC GGT GTG CGT TTG-3'	307-328
CBB R	5'- GCA GAG CAT TTT GGG CAT TCC-3'	884-905

Homogenisering och extraktionsmetod

Då hjärta är predilektionställe för EMCV, så användes RNeasy® Fibrous Tissue Mini Kit för att extrahera RNA från hjärtvävnaden. En rostfri metallkula, placerad i ett 2 ml mikrocentrifugrör, homogeniserade vävnaden med hjälp av Tissuelyser under två gånger två minuter vid 20 Hz. Upp till 30 mg hjärtvävnad, som förvarats i -80 °C, användes för analys. Efter homogeniseringen överfördes hjärtvävnaden till ett nytt provrör, där Proteinase K tillsattes och inkuberades under 10 minuter i 65 °C. Detta steg var viktigt då det underlättade både sönderdelningen av hjärtat, vilket är ett utpräglat fibröst organ, och av viruspartiklarna. Efter centrifugering samlades de fibrösa strukturerna i botten av röret så att surfaktanten med RNA kunde överföras via pipettering till ett nytt provrör.

De frigjorda RNA- molekylerna fanns nu tillsammans med andra komponenter i surfaktanten. För att isolera RNA- molekylerna filtrerades surfaktanten genom RNeasy spin column med filter och ett membran till vilket molekylerna fäste.

Ett tilläggsteg i processen utnyttjades då eventuell störning från DNA-segment ville undvikas. 80 µl av DNase tillsattes till RNeasy spin column och inkuberades under 15 minuter i rumstemperatur.

Via olika reningssteg frigjordes sedan RNA genom tillsättning av 30 µl RNase fritt vatten. Detta ändrade osmolaliteten över membranet i RNeasy spin column och gjorde så att RNA släppte och kunde sedan samlas upp via centrifugering i ett nytt 1,5 ml mikrocentrifugrör. RNA hade nu renats fram från hjärtmuskeln.

C(copy)DNA med hjälp av Random hexamers

För att kunna analysera RNA med hjälp av PCR måste det först ske en produktion av c(copy)DNA med hjälp av ett enzym, reverse transcriptas. Detta måste ske då den extraherade produkten, EMCV, består av RNA. Steget producerar en mängd kopior motsvarande en linjär ökning av antalet. Från cDNA- produkten kan sedan en amplifiering ske av aktuellt segment, med en exponentiell ökning av DNA mängden.

Produktionen av cDNA kan ske på två sätt. Det första sättet användes vid körning av samtliga prov och ingår som ett enskilt steg i PCR-körning, se QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit nedan. Det andra och alternativa steget för produktion av cDNA kan ske som ett helt enskilt steg efter extraktionen innan PCR-körningen (Tabell 6). Då används primers, Random Hexamers, för att konvertera hela genomet från RNA till DNA. Detta steg genomfördes på RNA från prov positiva efter PCR, då större totalmängd DNA behövdes på grund av alltför svaga band. Vid körning av cDNA i PCR:n får man då större mängd PCR- produkt vilket är önskvärt i senare steg. Dock är detta steg mer tidskrävande än det andra alternativet.

Tabell 6. Reagenser och inkubering för cDNA i Thermocycler, som ett enskilt steg, uppdelat på två delar efter varandra

Reagenser del I	Mängd per reaktion
pdN6 (1:10)	2 µl
ddH2O	3 µl
RNA	5 µl

→Inkubering 65 °C, 10 min

Tillägsreagenser inför Del II	Mängd per reaktion
5x 1 st standardbuffert	4 µl
0,1 M DTT	2 µl
dNTP mix (10 mM)	2 µl
RNasin (32 U)	1 µl
M-MLV RT (200 U)	1 µl

→Inkubering 37 °C i 90 minuter (RT enzym), därefter 95 °C i 5 minuter (inaktivering av enzym)

Polymerase Chain Reaction (PCR)

För PCR-körningen användes QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit. Detta kit kan genomföra produktionen av cDNA och sedan direkt påbörja att amplifiera önskat segment med hjälp av utvalda primers.

QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit innehåller enzym för både reverse transcriptas och amplifiering, Enzym mix RT Tabell 7, för reagenser och mängd. Omniscrypt och Sensiscrypt reverse transcriptas används för produktion av DNA från RNA och de är båda effektiva och specifika. Vidare i enzymblandningen så ingår

HotStar DNA Polymerase för en mycket specifik amplifiering. Under inledningen av körningen så är HotStar DNA Polymerase helt inaktivt. Vid övergången mellan enzymerna så hettas PCR:n upp till 95 °C under 15 minuter. Detta steg inaktiverar Omniscript och Sensiscript reverse transcriptas, samtidigt som HotStar DNA Polymerase aktiveras. Dessa egenskaper är av stor vikt. Ospezifisk amplifiering av aktuella primers undviks och senare steg för amplifieringen av aktuellt virus segment sker mer effektivt.

Tabell 7. Reagenser använda från QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit

Reagens	Mängd per reaktion
5xone-step buffert	5 µl
DNTP	1 µl
Primer 1	2 µl
Primer 2	2 µl
RNase inhibitor	1 µl
Enzym mix RT-dH2O	1 µl
Template RNA	8 µl
	5 µl
Total mängd	
	25 µl

Värmeprogrammet för PCR:n innehöll sju steg (Tabell 8). Det första steget bestod av reverse transcriptas och skapade cDNA strängar. Andra värmesteget syftade till att skifta enzym. Körningen gick då vidare från steget med reverse transcriptas till steget för amplifieringen och detta blev alltså starten för den egentliga PCR körningen. Denaturerings-, anealings- och elongeringssteget upprepades så att det sammanlagt genomfördes 35 cykler.

Tabell 8. Värmeprogrammet för PCR

Steg	Temperatur	Tid
1 Reverse Transcriptas	50 °C	30 minuter
2 Initialt PCR steg	95 °C	15 minuter
3 Denaturering	94 °C	30 sekunder
4 Anealing	58 °C	1 minuter
5 Elongering	72 °C	1 minuter
→Åter till steg tre 34 gånger		
6 Final extension	72 °C	10 minuter
7 Paus	4 °C	Tillsvidare

Erhållna PCR produkter analyserades genom elektrofores på gel, 1,5 % (Agaros typ 2, Sigma). För att ett prov skulle räknas som positivt skulle det finnas ett band på gelen i nivå med 600 baspar.

Nested PCR

Då proverna med cDNA kördes i PCR-maskinen, minskar mängden byggstenar efterhand som PCR- produkter producerades. Om svaga band syntes på gelen, tydde det på att en liten mängd DNA hade producerats. Då kunde eventuellt en PCR-körning på PCR-produkten köras för att ytterligare öka på den slutliga

mängden DNA-produkt, dock med risk för ospecifik amplifiering. Detta genomfördes på de erhållna positiva proverna där det var möjligt. En rening från gel var tvungen, se nedan, för att få fram ren PCR-produkt innan körningen.

DNA-rening

För att vidare kunna analysera de positiva PCR- produkterna så krävdes det att DNA renades fram, koncentrerades och blev fritt från bland annat salter och primers. För detta ändamål användes Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. I detta fall fanns möjligheten att rena fram DNA från två olika alternativ. I det ena fallet kunde DNA renas fram direkt från PCR produkten om resultatet från elektroforesen visade starka, tydliga band utan ospecifik amplifiering. Om banden istället var svaga med riklig ospecifik amplifiering fanns alternativet att rena fram DNA direkt från gelen. Banden i gelen synliggjordes genom att placeras på en UV-bänk och skars sedan ut med hjälp av skalpell. Därefter löstes gelbiten upp som innehöll PCR- produkten. Därifrån var tillvägagångssättet lika mellan de båda alternativen. Produkterna kördes sedan genom SV Minicolumn innehållande ett DNA-bindande membran. Via reningssteg frigjordes sedan DNA från SV Minicolumn genom tillsättning av cirka 25 µl Nuclease-Free Water direkt på membranet. Genom centrifugering samlades den framrenade DNA- produkten upp i ett 1,5 ml microcentrifugrör.

Cykelsekvensering

För att verifiera att det verkligen rörde sig om EMCV hos identifierade band på gelelektroforesen efter PCR- analysen så kördes cykelsekvensering (Tabell 9). Mängden renad PCR-produkt som användes bestämdes utifrån styrkan på banden efter gelelektroforesen. Cykelsekvenseringen genomfördes med två rör från varje prov med en typ av primers i respektive rör i Termocyklern.

Tabell 9. Tillsättningen av reagenser inför cykelsekvensering

Reagens	Mängd per reaktion
Big Dye	2 µl
Sekvenseringsbuffert	3 µl
Primer	1,8 µl
Renad-PCR produkt	Individuell provmängd
Filterat vatten	Tillsätts till totalmängd 20 µl

Efter värmeprogrammet, (Tabell 10), genomfördes precipitering.

Tabell 10. Värmeprogrammet inför cykelsekvenseringen

Steg	Temperatur	Tid
1	+ 95 ° C	15 sekunder
2	+ 50 ° C	10 sekunder
3	+ 60 ° C	4 minuter
→Åter till steg ett 24 gånger		
4	+ 4 ° C	Tillsvidare

Vid precipiteringen bildades en pellets av DNA. Den löstes upp i Formamid och analyserades sedan med hjälp av cykelsekvensering. Resultatet presenterades genom sekvenser producerade av nukleotiderna A, T, G och C. Dessa kördes i databaser för att studera likheten med tidigare cykelsekvenserade encefalomyokarditvirus.

RESULTAT

Av de totalt 97 gnagarna fångade i grisbesättningar, var 10 positiva för encefalomyokarditvirus (Tabell 11). Detta utgör 10,3 % av gnagarna. Av dessa var samtliga fångade med hjälp av slagfälla. De gnagare som utgör de positiva proverna är husmus och brunråtta. Dock fanns en dominans av husmus med 8 positiva individer. De positiva proverna var jämt fördelade mellan könen och kom från Upplands- och Stockholms län. Ingen skillnad sågs mellan olika slags grisbesättningar.

Av de 28 gnagarna som var fångade i värphönsbesättning J var en husmus positiv för EMCV (Tabell 11). Detta motsvarar att EMCV kunde påvisas hos 3,6 % av gnagarna som inte infångats i grisbesättningar.

Tabell 11. Positiva prov för encefalomyokarditvirus efter RT-PCR

Gård	Provnummer	Besättning	Ras	Kön	Län	Fälla
C	49	Smågris	Husmus	Hona	Uppland	Slagfälla
C	50	Smågris	Husmus	Hane	Uppland	Slagfälla
C	52	Smågris	Husmus	Hona	Uppland	Slagfälla
D	47	Slaktsvin	Husmus	Hane	Stockholm	Slagfälla
D	55	Slaktsvin	Husmus	Okänd	Stockholm	Slagfälla
D	56	Slaktsvin	Husmus	Hona	Stockholm	Slagfälla
G	101	Integrerad	Husmus	Okänd	Uppland	Slagfälla
H	109	Integrerad	Husmus	Hona	Uppland	Slagfälla
H	112	Integrerad	Brunråtta	Hane	Uppland	Slagfälla
H	114	Integrerad	Brunråtta	Hane	Uppland	Slagfälla
Övrigt						
Gård	Provnummer	Område	Ras	Kön	Län	Fälla
J	146	Värphöns	Husmus	Hona	Stockholm	Slagfälla

Av de totalt 11 positiva proverna utfördes cykelsekvensering på 5. Ett sjätte prov, nr 56, gick förlorat under cykelsekvenseringen. Regionen som analyserades var 5'-UTR. Denna region är generellt väl konserverad hos EMCV. Provernas sekvenser var till 97-100 % identiska med denna region. I studien har därmed EMCV påvisat hos husmus och råtta i Sverige.

Prov 112 och 114 från grisbesättning, samt 146 från värphönsbesättning hade alltför svaga positiva band för att kunna analyseras vidare. Banden var inte möjliga att skära ut från gelen då de inte kunde synliggöras vid UV-bestrålning. Nested PCR var inte aktuell på grund av att den ospecifik amplifieringen var alltför omfattande och skulle ha stört PCR-analysen. Vidare så var prov nr 109

positiv vid gelelektrofores men föll ifrån vid efterföljande reningssteg. Prov nr 55 var negativ efter cDNA-steget.

Grisbesättningarna C, D, G och H hade respektive 22, 16, 11 och 16 gnagare. Hos dessa gårdar var andelen gnagare med positiva resultat 13,6 %, 18,8 %, 9,1 % respektive 18,8 %. I undersökningen ingick totalt åtta grisbesättningar positiva gnagare från fyra, vilket innebär att 50 % av besättningarna hade gnagare med EMCV. Tre av dessa fyra besättningar (75 %) hade >1 positiv gnagare.

Hos gård J, en värphönsbesättning, var antalet analyserade gnagare fem. Detta gav en andel positiva på 20 %.

Positiv kontroll fanns med för att kontrollera att PCR-analyserna fungerade. Alla positiva kontroller blev positiva med tydliga band. På grund av risken för kontamination av övriga prover cykelsekvenserades inte den positiva kontrollen.

DISKUSSION

I Europa har EMCV orsakat sjukdomsutbrott i grisbesättningar (Maurice *et al.*, 2006). Några kliniska fall kopplade till EMCV har ännu inte beskrivits i Sverige. Dock påvisade Widén (1994) en prevalens av antikroppar mot EMCV på 16,8 % bland undersökta svenska grisar. I den här studien gjordes ett försök att påvisa viruset med PCR hos gnagare, då råttor och möss har visat sig kunna vara bärare av viruset (Spyrou *et al.*, 2004; Psalla *et al.*, 2006 a, b).

För första gången i Sverige har encefalomyokarditvirus genom den här studien direkt påvisats bland gnagare i grisbesättningar. I 50 % av de undersökta grisbesättningarna hittades gnagare positiva för EMCV. Andelen positiva gnagare i besättningar som testats positivt varierade mellan 18,8 och 9,1 %, vilket innebär att majoriteten av de positiva besättningarna hade >1 positiv gnagare. Någon könsskillnad kunde inte ses. Samtliga gårdar med positivt resultat ligger i Mälardalen, där majoriteten av proverna även är insamlade.

Av de 28 proverna som fångades i annan lokal än grisbesättning var ett prov positivt för EMCV. Detta positiva prov kom från en värphönsbesättning i Stockholm och var ett av totalt fem prover från denna besättning.

Resultaten ger indikation på att EMCV är ett vanligt eller mycket vanligt förekommande infektionsagens bland gnagare i Sverige och att det finns även i gnagarpopulationer utanför grisbesättningar.

I Europa har det visat sig att EMCV från gnagare och grisar varit genetiskt identiska, då de isolerats från samma land (Koenen *et al.*, 1999). Liknande undersökningar har inte kunnat genomföras i den här studien eftersom tillgång till provmaterial från de olika besättningarnas grisar i form av organ, avföring, serum eller foder saknades från aktuell tidsperiod.

Enligt studier gjorda av Spyrou *et al.*, (2004) och Psalla *et al.*, (2006 a, b) är gnagarna motståndskraftiga mot infektion med EMCV. Detta gör att

gnagarmaterialet bör vara representativt. Infekterade råttor och möss dör förmodligen inte utan har möjlighet att ta sig till fällorna och infångas.

Problemet vid analysen var den lilla mängd hjärtvävnad som var tillgänglig. Den erhållna provmängden och dess innehåll av RNA var därför liten. Det ledde till en begränsad mängd DNA som gav svaga band vid gelelektroforesen vilket försvårade efterföljande steg som krävde relativt mycket DNA och det var därför inte möjligt att cykelsekvensera alla proverna. Den positiva EMCV-kontrollen reagerade starkt i alla PCR-analyser men risken för kontamination av övriga prover gjorde att denna inte sekvenserades.

Längden på den RNA sekvens som valdes ut för amplifiering var 602 baspar. Den valda regionen är väl konserverad i virusgenomet. Likheter mellan de amplifierade sekvenserna och övriga i databaser tidigare deponerade EMCV-sekvenser konfirmerar den positiva PCR-diagnosen och visar att det verkligen är EMCV som påvisats. Att regionen är konserverad gör också att det inte går att skilja mellan olika stammar av EMCV med hjälp av de erhållna sekvenserna.

Analys av antikroppar mot EMCV hos levande eller kastade grisfoster kan användas för att indirekt påvisa viruset (Koenen *et al.*, 1994; Joo *et al.*, 1988). Påvisande av antikroppar hos foster är diagnostiskt viktigt. Grisfoster har förmågan att börja producera egna antikroppar från dag 70 under dräktigheten (Straw *et al.*, 1999). Kultingarna lever normalt i en steril miljö i livmodern och kommer därför inte i kontakt med något som den kan producera antikroppar mot. Antikroppar kan inte passera över placentan från modern till fostret. Har griskultingarna då inte ätit råmjölk innehållande antikroppar måste de ha varit i kontakt med agenset inne i livmodern. Om man misstänker att EMCV är orsaken till reproduktionsstörningar bör man även undersöka om kastade och dödfödda foster har antikroppar mot EMCV.

Råttor och möss utgör en risk för smitta till grisar eftersom de utsöndrar virus i avföringen (Psalla *et al.*, 2006 a, b). Smitta från gnagare till grisar sker bland annat genom kontamination av grisarnas foder (Murnane *et al.*, 1960; Psalla *et al.*, 2006 a). Många gårdar har idag en aktiv gnagarbekämpning vilket är viktigt för att begränsa smittspridningen.

Förutom spridning mellan gnagare och mellan gnagare och grisar finns en mängd vägar för EMCV att sprida sig i en besättning. Har grisarna väl blivit smittade kan smittan spridas genom att döda infekterade grisar blir uppätta av andra i boxen (Maurice *et al.*, 2002). Smittade äldre djur har visat sig mer motståndskraftiga än yngre individer. Dock finns risken att dessa äldre djur uppförökar och sprider viruset (Billinis *et al.*, 2004). Yngre djur utsöndrar också mest virus i infektionens akutstadium (Billins *et al.*, 1999). Dock leder infektionen till att vissa grisar dör så fort till följd av sjukdomen att de inte ens hinner börja utsönda viruspartiklar (Maurice *et al.*, 2002). Betydelsen av eventuella subkliniska infektioner av EMCV är okänd (Maurice *et al.*, 2002), men Brewer *et al.*, (2001) fann att EMCV kunde persistera hos grisarna. Griskultingar kan också bli persistent infekterade men efter att ha blivit transplacentalt smittade under fosterlivet (Koenen *et al.*, 1994). Åtgärder för att minska infektionstrycket i en drabbad besättning är därför att snabbt isolera misstänkta och sjuka djur, avlägsna döda djur från gruppen och

identifiera persistent infekterade individer. Studier av möss visar också att placentan infekteras av viruset (Nakayama *et al.*, 2004). Med hänsyn till detta bör placentan avlägsnas så fort som möjligt vid grisning för att undvika kontakt och spridning till andra individer i besättningen. För desinfektion kan klorbaserade preparat användas (Taylor 2006). Virusets utsöndras även via nässekret. En tänkbar, ej tidigare beskriven, spridningsväg mellan grisar skulle också kunna vara via öron- och svansbitning.

De symtom som ses vid infektion av encefalomyokarditvirus, plötsliga dödsfall och reproduktionsproblem, är inte specifika vilket gör det svårt för en kliniker att ställa rätt diagnos. Därför är övervakning och genomförandet av mer omfattande studier över virusets förekomst i landet av stor vikt.

Att viruset kunnat infektera primater har varit känt sedan länge. Enligt Quinn *et al.*, (2002 b) kan viruset även smitta människa. Försök genomförda av Brewer *et al.*, (2001) visade att grisar kan vara persistent infekterade med EMCV och ha virus i organ utan att vara seropositiv. Då prov har genomförts med att transplantera organ från gris till människa är detta fynd ytterst allvarligt. Det gör att EMCV är ett infektionsämne som måste studeras vidare.

Då möss kan vara bärare av EMCV bör även laboratoriemöss undersökas över förekomsten av viruset.

Slutsats

Encefalomyokardit virus har i den här undersökningen för första gången i Sverige påvisats med PCR hos gnagare i grisbesättningar. En del besättningar hade inga eller få smittade gnagare samtidigt som vissa andra besättningar var mer drabbade. PCR- analys fungerade bra för att identifiera EMCV.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Acland, H.M., Littlejohns, I.R. (1975) *Encephalomyocarditis virus infection of pigs. I. An outbreak in New South Wales*, Australian Veterinary Journal, 51:409-415
- Aiello, S.E., Mays, A. (1998) The Merck Veterinary Manual, 8th ed, pp. 872-873, MERCK & CO, Whitehouse Station, N.J, USA
- Billinis, C., Paschaleri-Papadopoulou, E., Anastastadis, G., Psychas, V., Vlemmas, J., Leontides, S., Koumbati, G., Kyriakis, S.C., Papadopoulos, O. (1999) *A comparative study of the pathogenic properties and transmission of a Greek and a Belgian encephalomyocarditis virus (EMCV) for piglets*, Veterinary Microbiology, 70:179-192
- Billinis, C., Leontides, L., Psychas, V., Spyrou, V., Kostoulas, P., Koenen, F., Papadopoulos, O. (2004) *Effect of challenge dose and age in experimental infection of pigs with encephalomyocarditis virus*, Veterinary Microbiology, 99:187-195
- Brewer, L.A., Lwamba, H.C.M., Murtaugh, M.P., Palmenberg, A.C., Brown, C., Njenga, M.K. (2001) *Porcine Encephalomyocarditis Virus Persists in Pig Myocardium and Infects Human Myocardial Cells*, Journal of Virology, 75:11621-11629
- Darke, P., Bonagura, J.D., Kelly, D.F. (1996) *Color Atlas of Veterinary Cardiology*, p. 115, Mosby-Wolfe, Turin
- Denis, P., Liebig, H.D., Nowotny, N., Billins, C., Papadopoulos, O., O'Hara, R.S., Knowles, N.J., Koenen, F. (2006) *Genetic variability of encephalomyocarditis virus (EMCV) isolates*, Veterinary Microbiology, 113:1-12
- Gelmetti, D., Meroni, A., Brocchi, E., Koenen, F., Cammarata, G. (2005) *Pathogenesis of encephalomyocarditis experimental infection in young piglets: a potential animal model to study viral myocarditis*, Veterinary Research, 37:15-23
- Helwig, F. C., Schmidt. C. H. (1945) *A filter passing agent producing interstitial myocarditis in arthropoid apes and small animals*, Science, 102:31-33
- Joo, H.S., Kim, H.S., Leman, A.D. (1988) *Detection of antibody to encephalomyocarditis virus in mummified or stillborn virus*, Archives of Virology, 100:131-134
- Kim, H.S., Joo, H.S., Bergeland, M.E. (1989) *Serologic, virologic, and histopathologic observations of encephalomyocarditis virus infection in mummified and stillborn pigs*, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 1:101-104
- Kim, H.S., Joo, H.S., Christiansson, W.T., Morrison, R.B. (1991) *Evaluation of serologic methods for the detection of antibodies to encephalomyocarditis virus in swine fetal thoracic fluids*, Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 3:283-286
- Knowles, N. J., Dickinson, N.D., Wilsden, G., Carra, E., Brocchi, E., De Simone, F. (1998) *Molecular analysis of encephalomyocarditis viruses isolated from pigs and rodents in Italy*, Virus Research, 57:53-62
- Koenen, F., De Clercq, K., Lefebvre, J., Strobbe, R. (1994) *Reproductive failure in sows following experimental infection with a Belgian EMCV isolate*, Veterinary Microbiology, 39:111-116
- Koenen, F., Vanderhallen, H., Papadopoulos, O., Billins, C., Paschaleri-Papadopoulou, E., Brocchi, E., De Simone, F., Carra, E., Knowles, N.J. (1997) *Comparison of the pathogenic, antigenic and molecular characteristics of two encephalomyocarditis virus (EMCV) isolates from Belgium and Greece*, Research in Veterinary Science, 62:239-244

- Koenen, F., Vanderhallen, H., Dickinson, N.D., Knowles, N.J. (1999) *Phylogenetic analysis of European encephalomyocarditis viruses: comparison of two genomic regions*, Archives of Virology, 144:893-903
- LaRue, R., Myers, S., Brewer, L., Shaw, D.P., Brown, C., Seal, B.S, Njenga, M.K. (2003) *A Wild- Type Porcine Encephalomyocarditis Virus Containing a Short Poly (C) Tract Is Pathogenic to Mice, Pigs, and Cynomolgus Macaques*, Journal of Virology, 77:9136-9146
- Maurice, H., Nielen, M., Stegeman, J.A., Vanderhallen, H., Koenen, F. (2002) *Transmission of encephalomyocarditis virus (EMCV) among pigs experimentally quantified*, Veterinary Microbiology, 88:301-314
- Maurice, H., Nielen, M., Brocchi, E., Nowotny, N., Bakkali Kassimi, L., Billins, C., Loukaides, P., O'Hara, R.S., Koenen, F. (2006) *The occurrence of encephalomyocarditis virus (EMCV) in European pigs from 1990 to 2001*, Epidemiology and Infection, 133:547-557
- Maurice, H., Nielen, M., Vyt, Ph., Frankena, K., Koenen, F. (2007) *Factors related to the incident of clinical encephalomyocarditis virus (EMCV) infection on Belgian pig farms*, Preventive Veterinary Medicine vol 78:24-38
- Murnane, T., Craighead, J.E., Mondragon, H., Shelokov, A. (1960) *Fatal Disease of Swine Due to Encephalomyocarditis Virus*, Science, New Series (AAAS), 13:498-499
- Nakayama, Y., Su, W., Ohguchi, A., Nakayama, H., Doi, K. (2004) *Experimental encephalomyocarditis virus infection in pregnant mice*, Experimental and Molecular Pathology, 77:133-137
- Psalla, D., Psychas, V., Spyrou, V., Billins, C., Papaioannou, N., Vlemmas, I. (2006 a) *Pathogenesis of Experimental Encephalomyocarditis: A Histopathological, Immunohistochemical and Virological Study in Rats*, Journal of Comparative Pathology, 134:30-39
- Psalla, D., Psychas, V., Spyrou, V., Billins, C., Papaioannou, N., Vlemmas, I. (2006 b), *Pathogenesis of Experimental Encephalomyocarditis: A Histopathological, Immunohistochemical and Virological Study in Mice*, Journal of Comparative Pathology, 135:142-145
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J, Leonard, F.C. (2002 a) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, pp. 305-312, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J, Leonard, F.C. (2002 b) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, pp. 401-407, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Carter, M.E., Donnelly, W.J, Leonard, F.C. (2002 c) *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*, pp. 454-455, Blackwell Science Ltd, Oxford, UK
- Radostits, O.M., Gay, C.C., Hinchcliff, K.W., Constable, P.D. (2007) *Veterinary Medicine, A Textbook of the disease of cattle, horses, sheep, pigs, and goats*, 10th edition, pp. 421-423, Saunders Elsevier Limited, Edinburgh
- Shanley, J.D. (1980) *Enzym-Linked Immunosorbent Assay for Immunoglobulin G Antibody to Encephalomyocarditis Virus*, Journal of Clinical Microbiology. 12: 663-666
- Spyrou, V., Maurice, H., Billins, C., Papanastassopoulou, M., Psalla, D., Nielen, M., Koenen, F., Papadopoulos, O. (2004) *Transmission and pathogenicity of encephalomyocarditis virus (EMCV) among rats*, Veterinary Research 35:113-122

- Straw, B.E., D'Allaire, S., Mengeling, W.L., Taylor, D.J. (1999) *Diseases of Swine*, 8th edition, pp.75-78, Iowa State University Press, Iowa, USA
- Taylor, D.J. (2006). *Pig diseases*, 8th edition, pp. 26-28, St Edmundsbury Press Ltd, Suffolk, UK
- Vanderhallen, H., Koenen, F. (1998) *Identification of Encephalomyocarditis Virus in Clinical Samples by Reverse Transcriptase-PCR Followed by Genetic Typing Using Sequence Analysis*, *Journal of Clinical Microbiology*, 36:3463-3467
- Widén, F. (1994) *Encephalomyocarditis virus in pigs: A serological survey of randomized samples from Swedish pigs*, Project number: 60182, Department of Virology, National Veterinary Institute, Uppsala, Sweden
- Zimmerman, J., Hill, H.T., Beran, G.W., Meetz, M.C (1990) *Serologic diagnosis of encephalomyocarditis virus infection in swine by the microtiter serum neutralization test*, *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2:347-350