

Ny subtyp av molluscipoxvirus påvisad

MODERN TEKNIK IDENTIFIERAR NYA OCH OVANLIGA PATOGENER SNABBARE

Molluscum contagiosum eller mollusker, som sjukdomen vanligen kallas, är en harmlös infektion i epidermis som oftast självläker utan komplikationer inom 1 till 1,5 år. Sjukdomen orsakas av ett poxvirus, *Molluscum contagiosum-virus* (MCV) [1], som smittar vid nära kroppskontakt. Diagnosen ställs kliniskt på den karaktäristiska symtombilden (1-8 millimeter stora hudfärgade eller rosa navlade papler). Endast i undantagsfall krävs laboratorieanalys för att verifiera diagnosen. Barn med atopiskt eksem samt patienter med nedsatt immunförsvar kan ibland utveckla ett långvarigt förlopp med mollusker [2-5]. I sällsynta fall, framför allt hos immunsupprimerade personer, kan atypiska varianter i form av en enda stor lesion ses, jättemollusk (giant *Molluscum contagiosum*) [5-6]. Vi beskriver ett fall av jättemollusk hos ett litet barn och hur diagnosen verifierades.

FALLBESKRIVNING

I december månad kom en knappt treårig flicka till hudmottagningen som patient. Modern berättade att det under de sista två månaderna hade utvecklats en hudförändring på vänster hands ringfinger. Flickan var för övrigt frisk och hade inte utsatts för någon skada mot fingret. Det fanns inga husdjur i hemmet och inte heller något akvarium. Familjen var av utländsk härkomst men inga resor till utlandet hade skett de senaste åren. Modern uppgav att det började som en liten hudfärgad upphöjning som sedan tillväxte och rodnade med inslag av att det vätskade sig något. I status noterades en välmående flicka utan någon smärta. Vid närmare undersökning av vänster hand sågs på dorsalsidan av proximala falangen digitus IV en kupolformad tämligen slät och rodnad nodulus, cirka 2 cm stor i diameter, med en central sårkrusta (Figur 1). Förändringen var inte palpationsöm och inga andra efflorescenser fanns att se på resten av kroppen.

Differentialdiagnostiskt funderade man på stafylokok-, mycobacterium- och herpesinfektion. Vanlig bakteriologisk odling togs efter att man lyft på sårkrustan, och likaså herpesvirusisolering. En stansbiopsi togs och vävnadsprovet skickades till mikrobiologisk avdelning för odling, mikroskopi och PCR av mykobakterier. Samtliga dessa undersökningar var negativa. Emellertid togs vid samma tillfälle även en virusisolering för poxvirus med tanke på orf, ett ovan-

Anna-Lena Hammarin, med lic, mikrobiolog, avdelningen för mikrobiologi, Folkhälsomyndigheten, Stockholm
 ● anna-lena.hammarin@folkhalsomyndigheten.se

Yvonne Eklund, överläkare, hudkliniken, Skånes universitetssjukhus, Malmö

Maria Karlberg, docent, molekylärbiolog, avdelningen för mikrobiologi, Folkhälsomyndigheten, Stockholm

Morten Bogh, PhD, specialistläkare, hudkliniken, Skånes universitetssjukhus, Malmö

Per Sikora, PhD, bioinformatiker, laboratoriemedicin, Sahlgrenska universitetssjukhuset, Göteborg



Figur 1. Status vid första besöket.

ligt poxvirus som kan orsaka ulcererande lesioner. Detta då flickan hade en påtaglig avgränsning av det infektiösa med lokalisation på ett finger, samt knappt några subjektiva besvär.

Poxvirus

Familjen Poxviridae är en stor och mångfasetterad virusfamilj som omfattar alltifrån molluscipoxvirus till smittkoppsvirus. *Molluscum contagiosum-virus* är stora, cirka 320 × 250 × 200 nm, höljeförsedda dubbelsträngande DNA-virus. Genomet, som omfattar cirka 190 kilobaser (kb), kodar för drygt 160 proteiner. Med restriktionsanalys har fyra subtyper av *Molluscum contagiosum-virus* identifierats (MCV I-IV), varav typ I och IV är de vanligast förekommande [1].

Sedan WHO 1980 förklarade världen fri från smittkoppsvirus är *Molluscum contagiosum-virus* det enda naturligt förekommande poxvirus som är strikt humant. Övriga poxvirus är zoonotiska och orsakar endast i sporadiska fall infektion hos människa; undantaget är apkoppsvirus, som har visats kunna ge upphov till omfattande utbrott, vilka framför allt har drabbat centrala och västra delarna av Afrika [7].

Två tänkbara differentialdiagnoser i det aktuella fallet var pseudokokoppor och orf. Pseudokokoppor, även kallat mjölkarknutor (milkers nodules), smittar via infekterad nötboskap och börjar som en röd hemisfärisk papel som mognar ut till en blårod nodu-

HUVUDBUDSKAP

- Jättemollusker är en atypisk form av den hos barn allmänt förekommande hudåkomman mollusker.
- Diagnosen kan vara svår att ställa kliniskt då flera behandlingsbara differentialdiagnoser är tänkbara.
- Nya generationens sekvensering (NGS-teknik) kan med fördel användas för snabb identifiering av nya eller ovanliga patogener i kliniskt prov.

FALLBESKRIVNING

lus som kan bli uppåt 2 cm i diameter. Knutan, som vanligtvis inte är smärtsam, kan kvarstå i upp till sex veckor. Orfvirus smittar via direktkontakt med infekterade får och getter. Ingången är ofta sår på fingrar och händer, men även smitta till ansikte finns beskrivet [8]. Kliniken liknar den vid mjölkarknutor.

Diagnostik

Vid de flesta poxvirusinfektioner finns gott om virus i blåsskrap eller biopsimaterial, vilket gör att elektronmikroskopi lämpar sig väl som förstahandsalternativ vid val av diagnostisk metod. Tekniken är snabb, och oftast kan svar lämnas inom någon timme efter provets ankomst till laboratoriet. I det aktuella fallet kunde rikligt med molluscipoxvirusliknade viruspartiklar påvisas med elektronmikroskopi (Figur 2), men då den kliniska bilden inte var förenlig med mollusker beslutades att gå vidare med massiv parallellsekvensering, så kallad NGS-teknik (nya generationens sekvensering) för att verifiera virusstillhörighet.

Med NGS-teknik kan den exakta ordningen av nukleotider i miljontals DNA-molekyler bestämmas parallellt, vilket medför att metoden lämpar sig väl vid analys av komplexa prov med blandningar av DNA från olika organismer. Den teknik som användes i det aktuella fallet baseras på framtagandet av en bibliotekspreparation, det vill säga att allt DNA i provet fragmenteras till lagom stora bitar som sedan sekvenseras. Därefter analyseras alla sekvensdata metagenomiskt för att identifiera vilka organismer erhållna DNA-fragment tillhör. Den totala tiden från DNA-preparationen till färdig analys är cirka 2 dagar.

Såväl elektronmikroskopi som NGS-tekniken finns tillgänglig vid Folkhälsomyndigheten (<https://www.folkhalsomyndigheten.se/mikrobiologi-laboratorieanalyser/laboratorieanalyser-och-tjanster/information-for-bestallare/>). Elektronmikroskopi ingår i basutbudet av analyser, medan NGS-teknik endast utförs efter kontakt med laboratoriet.

I det aktuella fallet kunde totalt 14 ng DNA isoleras varav 11 ng användes för att skapa en bibliotekspreparation. Biblioteket amplifierades med PCR och erhållet DNA renades och kvantifierades. Därefter utfördes massiv parallellsekvensering på ett Ion Torrent PGM-instrument (Figur 3), vilket resulterade i cirka fem miljoner sekvenser där de flesta omfattade cirka 380 baser. Sekvenserna bearbetades sedan med en datoriserad analysväg kallad PathFinder, utvecklad på Folkhälsomyndigheten. Först grupperades de erhållna DNA-sekvenserna efter intern likhet (s k klustring), och därefter jämfördes en representativ sekvens från varje grupp med publicerade sekvenser i fem olika databaser via automatiserade BLAST (basic local alignment search tool)-sökningar: Humant rRNA, humant DNA, virus-RNA/DNA, bakteriellt RNA/

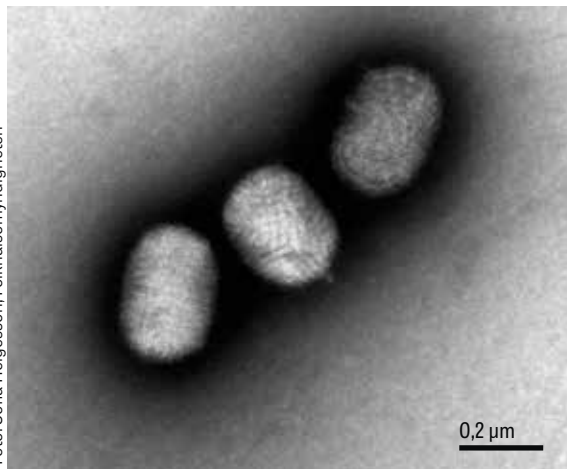
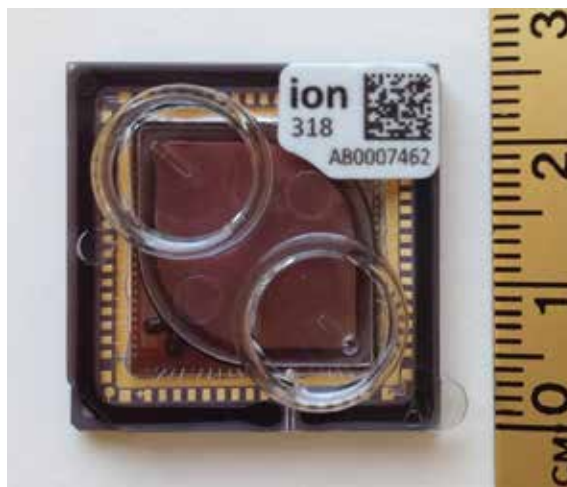


Foto: Sofia Helgesson, Folkhälsomyndigheten

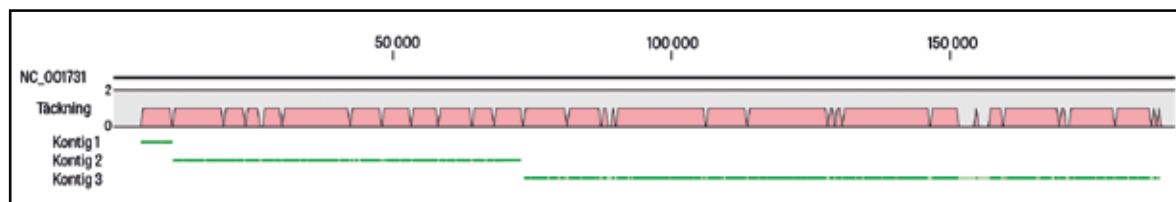
Figur 2. Molluscipoxliknande viruspartiklar påvisade med elektronmikroskopi i sårsekret taget vid första läkarbesöket.



Figur 3. Massiv parallellsekvensering utfördes i ett chip (318 chip) som innehåller totalt 12 miljoner brunnar. I de flesta av brunnarna sekvenseras ett DNA-fragment, och därefter överförs sekvenseringsdata elektroniskt till en dator för vidare dataanalys.

DNA samt en slutlig sökning mot hela den nukleotida databasen i NCBI (National Center for Biotechnology Information). I varje steg eliminerades träffar för att på så vis reducera datamängden. Resultatet visade att en fjärdedel av de erhållna sekvenserna var specifika för molluscipoxvirus, men inga övriga för symtomen relevanta patogener kunde påvisas.

Efter att förekomst av *Molluscum contagiosum*-virus verifierats genomfördes en så kallad »de novo assembly« där sekvenserna sammanfogas blint med målet att skapa en komplett genomsekvens. Detta utfördes enligt ett tidigare publicerat protokoll för sammanfogning av sekvenser från komplexa prov [9]. Sammanfogningen resulterade i tre kontiger (ihopsatta genomsekvenser baserade på flera mindre överlappande DNA-sekvenser) med en sammanlagd längd av 181 kb, vilket motsvarar 95 procent av den förväntade genomstorleken på 190 kb (Figur 4).



Figur 4. Jämförelse mellan sammanfogade kontiger (kontig 1, 2, 3) och det enda existerande referensgenomet för *Molluscum contagiosum*-virus (NC 1731). De röda staplarna motsvarar identiska sekvenser mellan kontigerna och referensgenomet. Tillsammans täcker de tre kontigerna in 95 procent av det publicerade genomet.

Figur 5. Den med NGS-tekniken erhållna sekvensen (Molluscum contagiosum-virus, MCV, ny subtyp) jämfördes med samtliga 20 publicerade sekvenser för »major envelope protein«. Röda baser visar polymorfier.

MCV – Ny subtyp GTTGCCTGCG ACGCTGCCGC TGGCACTGCC TACTGGCAGC ATGCTCACGT

Det sammanfogade genomet jämfördes med tidigare publicerade sekvenser för »major envelope protein« som används för typning inom MCV-släktet. Här identifierades ett flertal enbaspolymorfier (SNP) som inte överensstämde med några tidigare publicerade gen-data från MCV, vilket föranleder oss att klassificera detta virus som en ny subtyp av MCV (Figur 5).

Uppföljning av patienten

I det aktuella fallet återkom patienten efter fyra veckor för en planerad uppföljning (Figur 6). Hudkliniken hade några veckor innan fått besked om att Molluscum contagiosum-virus hade återfunnits i provet, och därmed kunde behandlande läkare välja att enbart expertera. Vid återbesöket berättade mamman att förändringen redan efter en veckas tid efter provtagningen hade minskat i storlek och nästan läkt ut. På ringfingret återfanns enbart en diskret makulär post-inflammatorisk rodnad, och upphöjningen var helt borta. I stället hade patienten fått nya mindre hudfärgade förändringar på kroppen. På magen, i pannan och runt munnen hade flickan fått ett flertal 1-2 mm stora hudfärgade mollusker med klassisk indragning centralt. Huden var för övrigt torr och ställvis diskret fjällande som vid lindrigt eksem. Förmodligen hade biopsitagningen vid flickans första besök på kliniken åstadkommit en inflammation som bidrog till utläkningen. Om de nytillkomna molluskerna var relaterade till lesionen på ringfingret är omöjligt att säga utan att ha provtagit och typat virus. Dock gjordes ingen fortsatt utredning/provtagning i och med att flickan för övrigt var frisk med enbart benägenhet för atopiskt eksem. Efter cirka 4 månader hade alla mollusker läkt ut.

Behandling av mollusker är i de flesta fall enbart expektans. Hos personer med atopiskt eksem kan vanlig lokal eksembehandling ofta skynda på utläkningen. Vid större mollusker kan det bli aktuellt med kyrottage efter till exempel lokalbedövningskräm. Dock ska risken för ärrbildning alltid has i åtanke vid mekanisk borttagning.

KONKLUSION

NGS-teknik är ett effektivt verktyg för identifiering och klassificering av nya eller ovanliga patogener, och utgör ett viktigt komplement till traditionella analysmetoder. Fördelen med tekniken är att man kan sek-



Figur 6. Status vid uppföljning, fyra veckor senare.

vensera och detektera nukleinsyra utan att först använda någon specifik anrikningsmetod. I det aktuella fallet kunde diagnosen snabbt fastställas med traditionell rutindiagnostik (elektronmikroskopi), men för att verifiera specificiteten hos påvisat virus utfördes massiv parallellsekvensering. Analysen visade även att påvisat virus kan klassas som en ny subtyp av molluscipoxvirus. ○

● Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.

Citera som: *Läkartidningen*. 2016;113:D33M

REFERENSER

- Chen X, Anstey AV, Bugert JJ. Molluscum contagiosum virus infection. *Lancet*. 2013;13(10):877-88.
- de Carvalho CH, de Andrade AL, de Oliveira DH, et al. Intraoral molluscum contagiosum in a young immunocompetent patient. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2012;114(1):e57-60.
- Charteris DG, Bonshek RE, Tullo AB. Ophthalmic molluscum contagiosum: clinical and immunopathological features. *Br J Ophthalmol*. 1995;79(5):476-81.
- Wynniss T, Fallon Friedlander S. Poxvirus Infections. In: Wolff K, Goldsmith LA, Katz SI, et al (editors). *Fitzpatrick's Dermatology in general medicine*. 7th ed. New York: McGraw Hill Medical; 2008. p. 1911-3.
- Vozmediano JM, Manrique A, Petraglia S, et al. Giant molluscum contagiosum in AIDS. *Int J Dermatol*. 1996;35(1):45-7.
- Vardhan P, Goel S, Goyal G, et al. Solitary giant molluscum contagiosum presenting as lid tumor in an immunocompetent child. *Indian J Ophthalmol*. 2010;58(3):236-8.
- Damon I. Poxviruses. I: Fields BN, Knipe DM, Howley PM, editors. *Field's Virology*. 5th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins; 2007. p. 2947-75.
- Lederman ER, Austin C, Trevino I, et al. ORF virus infection in children: clinical characteristics, transmission, diagnostic methods, and future therapeutics. *Pediatr Infect Dis J*. 2007;26(8):740-4.
- Andersson S, Sikora P, Karlberg ML, et al. It's a dirty job - a robust method for the purification and de novo genome assembly of *Cryptosporidium* from clinical material. *J Microbiol Methods*. 2015;113:10-2.

SUMMARY

Molluscum contagiosum is a viral infection of the epidermis characterized by skin-colored papules or nodules frequently with a central depression. Atypical variants may occur, primarily in immunosuppressed individuals. We here report a case of »giant Molluscum contagiosum« in an immunocompetent child. The patient was presented with a fairly smooth nodule of 2 cm in diameter on the ring finger. Molluscipoxvirus-like virus particles were detected by electron microscopy from the nodule, but since the clinical picture was not compatible with MC, next generation sequencing was performed in order to verify the diagnosis. Of the total number of obtained sequences, 25% belonged to molluscipoxvirus (MCV) and de novo assembly revealed three contigs corresponding to 95% of the MCV genome. The assembled genome was compared to previously published sequences of the »major envelope protein« used for genotyping of MCV genus. Several unique single nucleotide polymorphisms were identified, which led us to classify this virus as a new subtype of MCV.