

Spanska sjukans virus uppväckt från de döda



FREDRIK ELGH, docent och specialitläkare, Laboratoriemedicin, Norrlands universitetssjukhus, Umeå
 fredrik.elgh@medbio.umu.se

ANDERS TEGNELL, med dr och medicinalråd, Smittskydds-enheten, Socialstyrelsen, Stockholm

Influensa är en återkommande akut respiratorisk infektionssjukdom som följt mänskligheten under lång tid. Sjukdomen orsakas av virus ur familjen *Orthomyxoviridae* [1]. Influensa A-virus uppvisar, till skillnad från influensavirus B och C, en mycket stor variabilitet, och en mängd subtyper är kända.

Influensa A-virus har återfunnits hos en rad däggdjur och fåglar men är till allra största delen ett virus hos fåglar (främst vattenfåglar). Det är bara influensa A-virus som i modern tid har kunnat orsaka världsomspännande influensaepidemier, s k pandemier.

Spekulationer om en ny pandemi

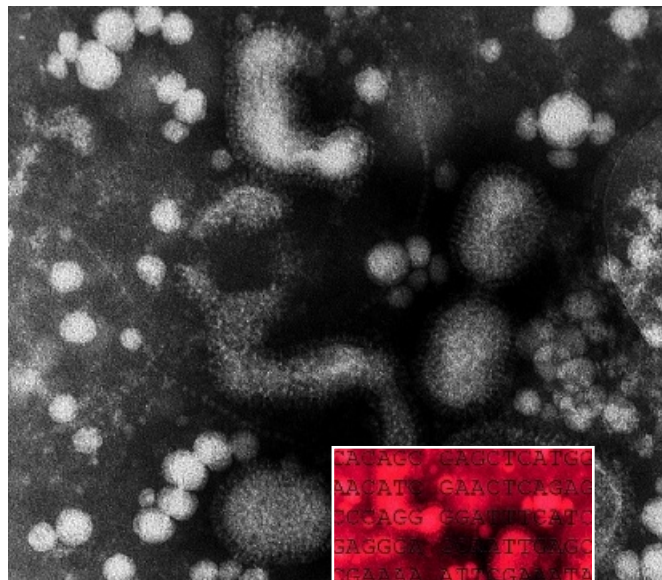
Man klassar virus genom identifiering av två ytproteiner, hemagglutinin (H) och neuraminidas (N). 16 varianter av H och 9 av N är hittills kända. Majoriteten av dessa har man funnit hos fåglar. För närvarande cirkulerar ett högpätagent influensa A H5N1-virus bland fåglar och orsakar ett stort antal sjukdomsutbrott i fjäderfäbesättningar. H5N1-virus har också orsakat sjukdom och död hos ett begränsat antal människor som kommit i direktkontakt med sjuka fåglar. Detta har gett upphov till spekulationer om att virus skulle kunna anpassas till människa och därmed eventuellt utgöra ett hot om en ny, globalt förlöpande influensapandemi [2, 3].

Influensavirusets gener återfinns på 8 separata segment. Olika gensegment kodar för H och N. Den gängse uppfattningen har varit att nya typer av influensa uppstår när ett djur (eller en människa) får en samtidig infektion med två typer av virus. Då finns förutsättningarna för gensegmentutbyten och för att nya kombinationer av virusgener ger upphov till nya virus. När världens befolkning inte har ett immunologiskt skydd mot dessa nya varianter uppstår förutsättningar för en global, snabbt förlöpande smittspridning och sjukdom. Under de senaste 300 åren har ett drygt tiotal pandemier orsakade av influensavirus svept över världen [4].

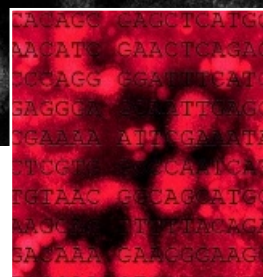
Spanska sjukan dödade huvudsakligen unga

Den pandemi som föregick »asiaten« och »Hongkong« var »spanskan« 1918–1919 som inföll under slutfasen av första världskriget. Sjukdomsorsakande virus (H1N1) spreds snabbt över hela jorden, orsakade influensa hos en tredjedel av världens befolkning och skördade 20–50 miljoner människoliv på kort tid [5]. I Sverige landade den officiella dödssiffran på drygt 34 000 [6]. Spanskan skördade långt fler liv än första världskriget och är en av de allvarligaste infektionssjukdomar som drabbat världen sedan digerdöden på 1300-talet.

Ett flertal av de senaste influensaepidemierna har orsakat en



Spanska sjukans virus gick att väcka till liv med idogt molekylärarkeologiskt arbete. Den genetiska koden är nu känd i sin helhet.



sjuklighet som omfattat 20–40 procent av befolkningen [7, 8]. Kliniskt skilde sig inte spanskan nämnvärt från andra influensainsjuknanden. Sjukdomen drabbade nästan uteslutande luftvägarna och uppvisade ett relativt lindrigt förlopp hos flertalet insjuknade.

Vad som gjorde denna pandemi unik var i stället att en stor andel unga patienter utvecklade allvarliga lungkomplikationer, vilket medförde en kraftigt förhöjd letalitet jämfört med andra influensor. En stor del av dem som dog var mellan 16 och 35 år gamla. Sjukdomen sparade de äldre, som vanligen riskerar att få sätta livet till vid en influensapandemi [9]. Mer än 99 procent av dem som dog i spanskan var under 65 år [10].

De flesta som dog fick sekundära bakteriella infektioner, något som var svårbehandlat eftersom antibiotika inte fanns tillgängligt vid denna tid. Unikt för spanska sjukan var dock den relativt stora andel patienter som dog av direkta viruseffekter i lungorna, vilka orsakade lungödem och hemorragiska förändringar i lungparenkymet. Vidare såg man också svår bronkiolit och alveolit. Dessa allvarliga lungförändringar kunde ända pa-

SAMMANFATTAT

Den genetiska koden för spanska sjukans influensavirus är nu känd i sin helhet. **Gensekvensen** visar att virus sannolikt inte uppstod som en ny kombination av gensegment, vilket varit fallet i de andra pandemierna på 1900-talet. **Viruset** liknar fågelinfluensavirusets, men ursprunget till dess gensekvens är ännu höljt i dunkel. **Virus som orsakat** senare pandemier består till största delen av genetiskt material

med ursprung i spanska sjukans virus. **Spanska sjukans virus** har återskapats och visar extraordinära sjukdomsframkallande egenskaper i försöksdjur. **De nyvunna kunskaperna** ger förbättrade möjligheter att möta en ny, allvarlig influensapandemi. **Vad gäller pandemiutveckling** är dock vår kunskap fortfarande inte heltäckande, och det är mycket svårt att förutse nästa influensapandemis förlopp och allvarlighet.

Foto: Kjell-Olov Hedlund, Smittskyddsinsitutet. Infäild bild: Jonathan Elgh

tientens liv redan fyra dagar efter insjuknandet [11]. De flesta dödsfallen skedde 6–11 dagar efter insjuknandet.

Molekylärarkeologisk isolering av spanska sjukans gener

Inflensavirus isolerades första gången 1930 från gris [12] och 1932 från människa [13]. Sedan dess har mängder av influensavirus isolerats från människor, djur och fåglar, och deras gener och genprodukter har karakteriserats. Spanska sjukans virus har dock inte kunnat undersökas förrän ett forskarlag vid amerikanska arméns patologiska laboratorium, ledda av Jeffrey Taubenberger, i mitten av 1990-talet inledde ett molekylärarkeologiskt arbete med det yttersta syftet att kartlägga spanska sjukans influensavirus genetiska sammansättning [14].

För det genetiska karakteriseringsarbetet utnyttjade man formalinfixerad, paraffinbäddad lungvävnad från amerikanska soldater som insjuknat och dött i spanska sjukan i september 1918 och från influensapatienter som dog i London i februari 1919. Små fragment av influensaspecifikt RNA isolerades med PCR-teknik och kunde sekvenseras. När man senare också fick tillgång till fixerat lungmaterial från en kvinna som dog i spanskan och begravdes i permafrosten i norra Alaska underlättades arbetet väsentligt.

Jämförelser av dessa olika virus gensekvenser visar en överensstämmelse på 99 procent trots att de härrör från platser som ligger upp till 12 000 km åtskilda och att fem månader skiljer infektionstillfällena åt [15]. Idén att återfinna influensa från avlidna i permafrosten är inte ny. Den svenskättade patologen Johan Hultin gjorde fruktlösa försök med vävnad från sådant material redan 1951. Han övertygade Taubenberger och medarbetare att göra om dessa experiment med modern molekylärbiologisk teknologi.

Oklart ursprung till spanska sjukans virus

I oktober 2005 presenterades den fullständiga sekvensen, som kodar för det virus som orsakade spanska sjukan [16]. Av gensekvensjämförelserna i detta och tidigare arbeten framgår att asiatens och Hongkongs virus H2N2 respektive H3N2 båda till största delen är sprungna ur spanska sjukans H1N1-virus. Det har gått till så att en dubbelinfektion med humanvirus och fågelvirus har medfört gensegmentutbyten av både H och N samt med det gensegment som kodar för ett av influensa A-virus RNA-polymerasgener (PB1). I båda virus har således fem av de åtta gensegmenten sitt ursprung i spanskan.

Vid sekvensjämförelserna står det också klart att spanska sjukans virus gensegment kodar för proteiner som mest av allt liknar fågelinfluensavirus. Genetiskt är det dock mycket osäkert vad som är 1918 års virus ursprung, och nukleotidsekvensen i virusets gensegment är klart skild från den i hittills kända influensavirus [17].

Oxford och medarbetare publicerade nyligen ett arbete som föreslår möjligheten att virus framgångsrikt anpassades och överfördes till människa från fåglar i överfyllda militärläger bakom stridslinjen i norra Frankrike redan vintern 1916 [18]. Här fanns en rad förutsättningar för ett sådant skeende i form av soldater som bodde mycket tätt in på varandra i tält och att det bland dem fanns många skadade, nedgångna patienter. Vidare fanns där fjäderfåhållning.

Mellan december 1916 och mars 1917 hade man ett allvarligt utbrott av akut respiratorisk sjukdom med symptomologi och letalitet som i mycket liknade det som skulle komma att kallas spanska sjukan.

En liknande epidemi utbröt ungefär samtidigt i ett härläger i södra England. Även här beskrivs en symtombild som är mycket lik spanska sjukans, och infektionens letalitet angavs som mycket hög (25–50 procent) [19]. Enligt Oxford och medar-



Paraffinklossar med bevarad lungvävnad från personer som fallit offer för spanska sjukan.



Doktor Terrence Tumpey under arbete med influensavirus i säkerhetslaboratorium. Tumpey har lett experimenten med levandegjort virus från spanska sjukan.

Foto: Science Photo Library

tare finns det även opublicerade uppgifter om liknande utbrott i tyska härläger 1917.

Reverse genetics

Sedan en längre tid har det varit möjligt att återskapa levande influensavirus med hjälp av DNA-sekvenser som införs i levande celler [20]. Denna teknik kallas reverse genetics och går till så att man isolerar det genetiska materialet för virusets alla gensegment. Dessa gener införs sedan i enskilda celler i en cellkultur så att de dels kommer att producera virusets gensegment och proteiner, dels kan sammanfoga dessa till funktionella influensaviruspartiklar.

Denna teknik är oerhört kraftfull när det gäller att förstå molekylära aspekter på virusreplikation och patogenetiska samband, eftersom man i provröret kan ändra de ingående segmenten genetiskt och sedan i detalj studera dessa modifieringar på gen- och proteinnivå i levande virus. Tekniken förbättras kontinuerligt, och nyligen publicerades ett arbete som visar att framtagande av nya influensavirus för vårt vaccinationsbehov kan underlättas och snabbas upp betydligt med förfinad reverse genetics-metodologi [21].

Spanska sjukans virus gick att återuppväcka

Man har gjort patogenitetsstudier med 1918 års influensas H- och N-gener och lyckats visa att de har betydelse för virulens

och sjukdomsförlopp hos infekterade möss [22-25]. H och N från spanska sjukans influensavirus tillsammans med övriga gener från nutida H1N1- och H3N2-influensavirus är kraftigt sjukdomsframkallande men orsakar letala infektioner bara hos infekterade möss om man använder höga smittdoser.

Ytterligare ett arbete baserat på denna sekvens beskriver hur man med hjälp av reverse genetics lyckats rekonstruera ett levande virus med alla genetiska delar från det virus som orsakade spanska sjukan [26]. Man infekterade möss intranasalt och erhöll fyra dagar efter inokulationen 39 000 gånger mer levande virus i lungvävnad från möss inokulerade med 1918 års H1N1-virus än med H1N1-virus isolerat från människa 1991. Man jämförde också med de H1N1-influensavirus som cirkulerar idag (virus isolerat 1991 respektive 1999) med rekombinanta virus, bestående av 1991 års virus med H- och polymerasgener från 1918 års virus i olika kombinationer, och fann tydliga skillnader i virulens.

Det här arbetet visade att både virusets polymerasgener och generna som kodar för H och N är av betydelse för virulensen hos det virus som orsakade spanska sjukan. I den använda musmodellen var virus med alla åtta gensegment från 1918 års virus 100 procent letalt för djuren. Det var även rekombinanta virus av 1991 års typ som innehöll 1918 års virus H-, N- och polymerasgener. Rekombinanta virus med H- och N-gener från 1918 års virus men inga polymerasgener därifrån orsakade inte dödligt förlöpande sjukdom hos djuren, och det gjorde inte heller H1N1-vildtypsvirus från modern tid.

Möss infekterade med 1918 års virus uppvisade också en mycket tidig förekomst av lunginfektion och sjukdomspåverkan i form av tidig, kraftig viktneigung. Djur infekterade med detta virus uppvisade kraftiga inflammatoriska förändringar i lungorna som liknade de histopatologiska fynden i lungvävnad från patienter som dog av primär virusinfektion i lungorna 1918 och som beskrivits ovan. Redan dag 4 efter smittotillfället uppvisade mössen nekrotiserande bronkiolit och bronkiolit tillsammans med alveolit, i många fall uttalad sådan, samt alveolära ödem och blödningar. 1918 års H-gen visade sig vara nödvändig för uppkomsten av dessa förändringar hos möss. Samtidig förekomst i virus av N- och polymerasgener från 1918 års virus ökade komplikationernas svårighetsgrad. Tecken på systemisk influensavirusinfektion i övriga organ kunde man inte finna.

Nutida humana influensavirus behöver luftvägsspecifika proteaser för att aktivera H och uppnå fullständig replikativ förmåga. I det aktuella arbetet visas att 1918 års virus aktiveras oberoende av sådana proteaser och har proteolytisk förmåga inbyggd i det egna N. Vidare har virus från 1918 års pandemi visat sig kunna skilja sig i specificitet när det gäller bindning till den huvudsakligen humana influensavirusreceptorn α 2,6-sialinsyra och den huvudsakligen aviära receptorn α 2,3-sialinsyra genom en enda aminosyraförändring [27, 28]. Detta visar att släktskapet mellan det virus som orsakade spanska sjukan och fågelinfluensavirus är stort och att mycket små genetiska förändringar kan påverka virus värdspecificitet.

Publicering eller inte

Det var inte alldeles självklart att informationen i Taubenbergers och Tumpeys arbeten skulle publiceras [16, 26]. Efter terrorattackerna den 11 september 2001 har man i USA haft en livlig diskussion om lämpligheten av allmän spridning av information som potentiellt skulle kunna användas i terrordsyften. Det har medfört att det amerikanska hälsodepartementet (Department of Health and Human Services) har tillsatt en särskild kommitté (National Science Advisory Board for Biosecurity), som ska ta ställning i sådana ärenden.

Man bestämde sig slutligen för att nyttan av att publicera de



Foto: Pressens Bild

Interiör från den överfyllda sjukstugan i Sveg under spanska sjukan 1918. I Sverige dog mer än 34 000 människor i denna sjukdom 1918–1920.

ovan beskrivna fynden översteg faran med informationen. Det ansågs viktigt att sprida kunskap om 1918 års virus genetiska egenskaper, dess likhet med fågelinfluensavirus och de specifika virulensegenskaperna för att man ska kunna planera bättre för framtida globala pandemier och för att forskarvärlden ska få bästa tänkbara möjligheter att ta fram nya motmedel i form av antivirala substanser och vacciner [29].

Dessa motiv är också vad de forskare som tagit fram det genetiska materialet och utfört de patogenetiska experimenten anför som huvudsaklig drivkraft till att man nu återuppväckt spanska sjukans virus från de döda. Det slutliga arbetet med att skapa ett levande virus är ett samarbete, mellan ett flertal forskningsinstitutioner. Detta levande virus finns för närvarande bara vid Centers for Disease Control and Prevention (CDC).

Man har nyligen officiellt meddelat att det inte finns planer på att lämna ut virus till intresserade forskare. Dock kvarstår möjligheten att andra laboratorier tar sig an uppgiften att med hjälp av reverse genetics själva återskapa 1918 års influensavirus, eftersom dess gensekvenser nu finns tillgängliga i allmänna gendatabaser.

Konklusion

Spanska sjukans virus återskapande har inneburit nya kunskaper om virus genetiska egenskaper. 1918 års influensavirus har stora likheter med fågelinfluensavirus, och det är möjligt att det kunnat bli pandemiskt förlöpande utan att det blandat gensegment med tidigare existerande humana influensavirus. Man har också kunnat visa att det är starkt sjukdomsframkallande och dödligt förlöpande i en musmodell, där lungkomplikationerna mycket liknar dem som tog livet av många människor under spanska sjukan.

När man jämför de kliniska förloppen för och de kända virologiska egenskaperna hos influensa 1889, 1918, 1957 och 1968 blir det tydligt att spanska sjukan var en annorlunda och speciellt allvarlig pandemi. Det är troligt att risken för en pandemi alltid föreligger men att det sannolikt krävs mycket speciella

förutsättningar för att ett influensavirus med möjlighet till världsomspännande infektion ska kunna utvecklas. Möjligen kunde spanska sjukan uppstå på grund av de stora truppsammansdragningarna i Europa och USA, enligt de teorier som Oxford och medarbetare lagt fram [18]. Förutsättningar för andra pandemier har ansetts vara den täta kontakten mellan stora mängder av virus, fåglar, grisar och människor, som finns i Asien [30].

Med endast några pandemier som referens är det mycket svårt att uttala sig om vad som kan utlösa nästa pandemi och ännu svårare att veta vad som krävs för att ett virus skulle gå direkt från fågel till människa. Med tanke på den mångtusenåriga samexistensen mellan fåglar, virus och människor är det dock uppenbarligen en mycket ovanlig händelse. Att man nu under snart tio år kunnat följa ett fågelvirus med möjlighet att smitta människor utan att det blivit ett mänskligt virus understryker

detta. Förutom att vi inte vet vad som utlöser en pandemi är det också svårt att veta vilka effekterna skulle bli i dagens värld. Ett omfattande resande talar för snabbare spridning. Ett bättre organiserat internationellt smittskydd skulle kunna bidra till att bromsa spridningen, men ett nutida, mer sårbart, samhälle skulle sannolikt påverkas mycket negativt av en omfattande sjukfrånvaro.

Vi bevittnar nu, delvis tack vare den moderna influensadiagnostikens möjligheter, hur en högpatogeten fågelinfluensa uppträder i fåglar på skilda ställen i världen med enstaka humanfall. Denna förmåga till detaljerad övervakning av virusets spridning ger oss unika möjligheter att samla kunskap om hur pandemier kan och inte kan uppstå och skulle kunna ge oss en möjlighet att tidigt stoppa en pandemi [31, 32].

■ *Potentiella bindningar eller jävsförhållanden: Inga uppgivna.*

REFERENSER

- Fleming D. Influenza pandemics and avian flu. *BMJ*. 2005;331:1066-9.
- Patterson KD. Pandemic influenza, 1700-1900: A study in historical epidemiology. Totowa, NJ: Rowman & Littlefield; 1986.
- Johnson NP, Mueller J. Updating the accounts: global mortality of the 1918-1920 »Spanish« influenza pandemic. *Bull Hist Med*. 2002;76:105-15.
- Åman M. Spanska sjukan. Den svenska epidemin 1918-1920 och dess internationella bakgrund. Uppsala: Acta Universitatis Upsaliensis. *Studia Historica Upsaliensia*, Uppsala University; 1990.
- Patterson KD, Pyle GF. The geography and mortality of the 1918 influenza pandemic. *Bull Hist Med*. 1991;65:4-21.
- Sjövall E. Influensans patologiska anatomi. *Allmänna svenska läkartidningen*. 1918;15:1600-12.
- Berglund H. Den s. k. »spanska sjukans« kliniska bild. *Allmänna svenska läkartidningen*. 1918;15:1696-701.
- Taubenberger JK, Reid AH, Janczewski TA, Fanning TG. Integrating historical, clinical and molecular genetic data in order to explain the origin and virulence of the 1918 Spanish influenza virus. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001; 356:1829-39.
- Taubenberger JK, Reid AH, Lourens RM, Wang R, Jin G, Fanning TG. Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. *Nature*. 2005;437:889-93.
- Taubenberger JK, Morens DM. 1918 influenza: the mother of all pandemics. *Emerging Infectious Diseases*. 2006;12:15-22.
- Oxford JS, Lambkin R, Sefton A, Daniels R, Elliot A, Brown R, et al. A hypothesis: the conjunction of soldiers, gas, pigs, ducks, geese and horses in northern France during the Great War provided the conditions for the emergence of the »Spanish« influenza pandemic of 1918-1919. *Vaccine*. 2005;23:940-5.
- Abrahams A, Hallows N, French H. Purulent bronchitis: its influenza and pneumococcal bacteriology. *Lancet*. 1919;1:377-80.
- Kash JC, Basler CF, Garcia-Sastre A, Carter V, Billharz R, Swayne DE, et al. Global host immune response: pathogenesis and transcriptional profiling of type A influenza viruses expressing the hemagglutinin and neuraminidase genes from the 1918 pandemic virus. *J Virol*. 2004;78: 9499-511.
- Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Basler CF. Pathogenicity and immunogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:3166-71.
- Tumpey TM, Garcia-Sastre A, Taubenberger JK, Palese P, Swayne DE, Pantin-Jackwood MJ, et al. Pathogenicity of influenza viruses with genes from the 1918 pandemic virus: functional roles of alveolar macrophages and neutrophils in limiting virus replication and mortality in mice. *J Virol*. 2005;79: 14933-44.
- Tumpey TM, Basler CF, Aguilar PV, Zeng H, Solorzano A, Swayne DE, et al. Characterization of the reconstructed 1918 Spanish influenza pandemic virus. *Science*. 2005;310: 77-80.
- Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, et al. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. *J Mol Biol*. 2006;355:1143-55.
- Sharp PA. 1918 flu and responsible science. *Science*. 2005;310:17.
- Ferguson NM, Cummings DA, Cauchemez S, Fraser C, Riley S, Meeyai A, et al. Strategies for containing an emerging influenza pandemic in Southeast Asia. *Nature*. 2005;437: 209-14.
- Longini IM Jr, Nizam A, Xu S, Ungchusak K, Hanshaoworakul W, Cummings DA, et al. Containing pandemic influenza at the source. *Science*. 2005;309:1083-7.

annons