

## Slutrapport H0850396

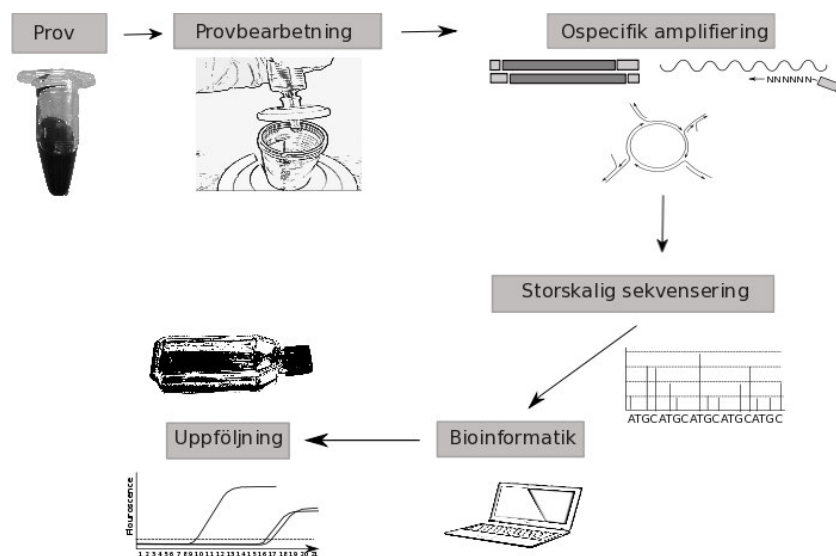
### Nya virus påvisade hos gris – pilotundersökningar om deras kliniska betydelse

#### Bakgrund

I samband med att den nya grissjukdomen postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) konstaterades i Sverige inleddes grundläggande och applicerade studier för att kartlägga förekomsten och genotypen av porcint circovirus typ 2 (PCV2) i svenska grisbetsättningar. Under provinsamlingen och analysen av materialet som till en del finansierades av SLF (se slutrapport projekt H0750371) genererades en stor provbank med organmaterial från djur med väl dokumenterade kliniska fynd och obduktionsresultat. Eftersom infektion med PCV2 är nödvändigt men inte tillräckligt för att PMWS ska uppstå har betydelsen av saminfektion med en rad olika virala och bakteriella infektiösa ämnen studerats epidemiologiskt och experimentellt utan att ge några entydiga resultat. Det var därför angeläget att förutsättningslöst söka efter tidigare okända infektiösa ämnen som förklaring till uppkomsten av PMWS. Under ledning av Mikael Berg och Anne-Lie Blomström vid SLU's virologiska avdelning och i samarbete med Prof Gordon Allan vid Queen's University, Belfast inleddes därför metagenomiska studier för att påvisa okända virus i det arkiverade materialet. Preliminära resultat visade på förekomst av sekvenser av Torque Teno virus (TTSuV) och porcint bocavirus (poBoV) tillsammans med PCV2 i lymfknotor från svenska grisar med PMWS.

#### Material och metoder

Metodikerna som applicerats av M. Berg och A-L. Blomström vid virologiska avdelningen återges schematiskt nedan.



Den storskaliga sekvenseringen utfördes med 454-metoden på SciLifelab i Uppsala.

### *Prevalens och genetisk karakterisering av TTSuV-1, -2 och bocavirus*

För att undersöka förekomsten av TTSuV och poBoV i svenska grisar extraherades DNA ifrån lymfknotor från 58 grisar, varav 34 hade diagnostiserats med PMWS och de resterande 24 grisarna var friska.

Då det hos gris finns två stycken genotyper av TTSuV (TTSuV-1 och 2) så användes genotyp specifika primers (Segales et al 2009) riktade emot UTR regionen av genomet. För porcint bocavirus (PoBoV) designades primers utifrån 454-sekvensdata från den virala metagenomiska studien som utfördes 2009 av Blomström et al. (1). Efter primerdesign sattes 3 stycken PCRRer upp för detektion. För att bekräfta korrekt amplifiering samt för att kunna utföra genetiska och fylogenetiska studier sekvenserades ett antal positiva PCR produkter med standard Sanger sekvensering. Sekvenserna editerades efter sekvenseringen med SeqMan (Lasergene); Bioedit och Mega4 användes sedan för sekvensjämförelse samt för skapande av fylogenetiska träd.

Alla DNA proverna screenades även för PCV2 – här användes tre stycken kvantitativa SYBR-green PCRRer som är specifika mot de tre svenska genogrupperna av PCV2: SG1, SG2 och SG3.

### *In situ proximity ligation assay (PLA) för detektion av virus DNA i vävnad*

För att detektera respektive virus i vävnad valdes en konserverad region (ca 30 nukleotider) ut från respektive virus (PCV2, TTSuV-1, -2, och PoBoV) för att användas som en virusspecifik probe-sekvens. Denna sekvens inkorporerades därpå i respektive hänglås- (padlock) probe. För respektive hänglås-probe gjordes även en hänglås-probe mot den komplementära sekvensen för att kunna detektera och skilja på genomet och den replikativa strängen. För att utvärdera metodologin samt för att göra en tidsstudie infekterades PK-15A celler med PCV2 och infektionen stoppades sedan vid olika tidpunkter. Cellerna fixerades, PCV2 hänglås-proben tillsattes och tilläts hybridisera varpå en ligering utfördes av hybridiserade prober. Ej hybridiserade prober tvättades bort medan de hybridiserade/ligerade hänglås-proberna amplifierades med rolling circle amplification (RCA). Amplifierings-produkten detekterades med fluorescerande oligonukleotidsekvenser riktade mot en detektionsregion i hänglås-proben och detektionen visualiserades sedan med fluorescensmikroskopi. Bilderna analyserades därpå med programvaran Blobfinder. Även vävnad från lymfknotor användes i denna studie och detta utfördes enligt samma procedur som ovan.

### *Utökad viral metagenomik*

Till den virala metagenomikstudien utvaldes 4 grisar med PMWS och 4 grisar utan PMWS. Alla lymfknotorna homogeniserades, filtrerades och nukleas-behandlades för att reducera mängden nukleinsyra från värdjuret medan den virala nukleinsyran behölls intakt. Därpå extraherades såväl RNA som DNA från proverna och märktes in med en specifik tag-sekvens för att användas som målsekvens för primrarna i en slumpmässig PCR. De slumpmässiga PCR produkterna renades fram och sekvenserades därpå med 454-storskalig sekvensering på SciLifelab i Uppsala. 454 sekvenserna assemblades i CLC genomik workbench innan blastn och blastx användes för att identifiera vilket virus respektive sekvens tillhörde. Primrar baserade på 454 sekvenserna designades mot några av de identifierade virusen och PCRanalyser sattes upp för detektion.

## Resultat

### Prevalens och genetisk karakterisering av TTSuV-1, -2 och bocavirus

Med hjälp av de uppsatta PCRerna kunde vi påvisa en hög förekomst av alla dessa tre virus. Totalt sett var 78% av grisarna positiva för TTSuV-1, 90% för TTSuV-2 och 71% för PoBoV (Fig 1a). Jämförelse mellan grisar med och utan PMWS (Fig 1b) visar ingen större skillnad i prevalens av TTSuV-1 och 2 mellan de två grupperna (77% respektive 79% för TTSuV-1 och 94% respektive 83% för TTSuV-2). För PoBoV var skillnaden större och PoBoV detekterades i 88% av grisarna med PMWS men endast i 33% av de friska grisarna. Sammanställning av alla resultat (Fig 1c) visar på en saminfektion med alla tre virus i 77% av grisarna med PMWS medan detta endast var fallet i 33% av grisarna utan PMWS.

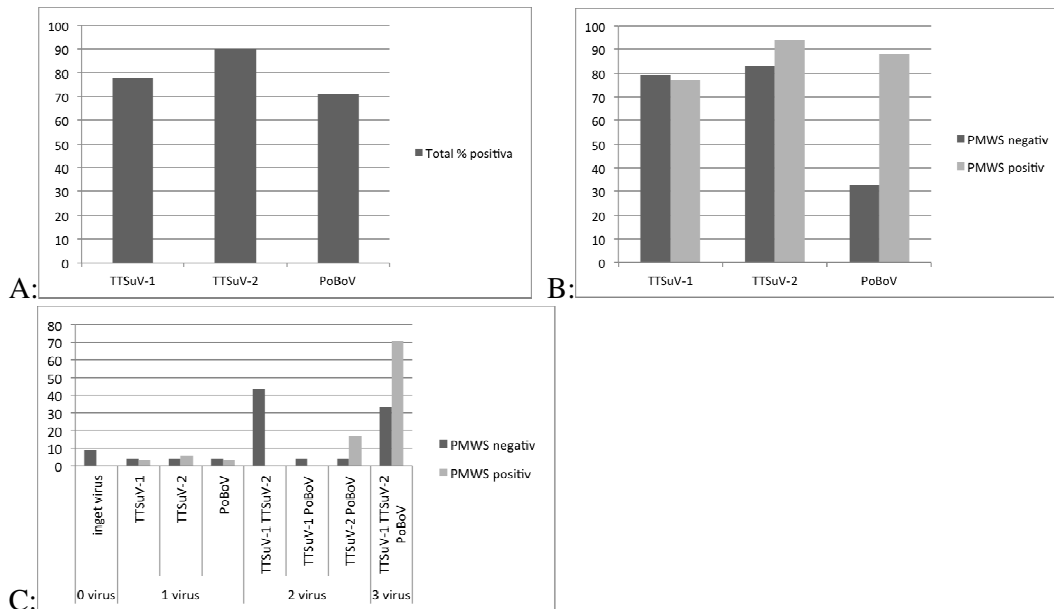


Fig. 1: Sammanställning av TTSuV-1, -2 och PoBoV prevalensstudien.

A. Förekomst (prevalens, %) av respektive virus i alla 58 undersökta grisar. B. Jämförelse av prevalensen (%) av respektive virus hos grisar med och utan PMWS. C. Saminfektion med de olika virusen (%) hos grisar med och utan PMWS.

Som förväntat detekterades PCV2 i höga till medelhöga nivåer i prover från alla grisar med PMWS, här dominerade genogruppen SG3 som kunde detekteras i samtliga grisar med PMWS. Vissa av PMWS-grisarna hade även en låg koncentration av SG2. Även i material från de friska grisarna kunde PCV2 detekteras men då i en lägre koncentration. Hos de friska grisarna dominerade SG3 men såväl SG1 som SG2 kunde påvisas. Endast i fem av grisarna kunde inte något PCV2 detekteras.

Sekvensjämförelse respektive den fylogenetiska studien visade att de TTSuV som påvisades i denna studie hade en hög likhet med sekvenserna som publicerats tidigare från andra länder. TTSuV-1 uppvisade en 91-95% likhet med övriga sekvenser och TTSuV-2 var 89-98% likt. Sekvenserna grupperade också som förväntat med respektive genogrupp i den fylogenetiska studien. Sekvensanalys av PoBoV visade att de olika sekvenserade produkterna uppvisade 98,5-99,6% likhet sinsemellan. Den fylogenetiska studien placerade de sekvenserade PoBoV tillsammans med bocavirus från andra djurslag snarare än tillsammans med porcina parvovirus (Fig 2).

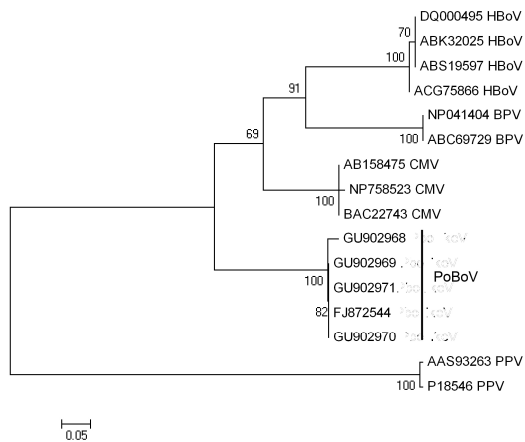


Fig 2. *Fylogenetiskt träd (neighbor-joining träd med 1000 i bootstrap) baserat på en 218 lång aminosyrasekvens. PoBoV är de virus som sekvenserats i denna studie. HBoV – humant bocavirus, BPV – bovin parvovirus (tillhör bocavirus), CMV – canine minute virus (tillhör bocavirus) och PPV – porcint parvovirus.*

#### *In situ PLA för detektion av virus DNA i vävnad (2)*

In situ PLA utvärderas i ett första stadie på PCV2-infekterade celler. Efter att cellerna infekterades fixerades de vid 4 olika tidpunkter (24, 30, 48 och 72h), även oinfekterade celler fixerades som en negativ kontroll. I denna tidsstudie kunde redan vid 24h såväl den genomiska som den replikativa strängen av PCV2 detekteras och allteftersom infektionen fortlöpte sågs en ökad signal. Den genomiska strängen ses i större mängd i jämförelse med den replikativa (Fig. 3). Den genomiska strängen påvisades i ett begränsat antal kärnor men i gengäld kunde ett mycket stort antal signaler detekteras från dessa kärnor. Även i cytoplasman hos dessa celler fanns en stor mängd genomsträngssignaler. Den replikativa strängen var mera spridd över olika celler (men med en preferens för celler där den genomiska strängen detekterats) men kunde ses i ett mycket färre antal jämfört med den genomiska strängen.

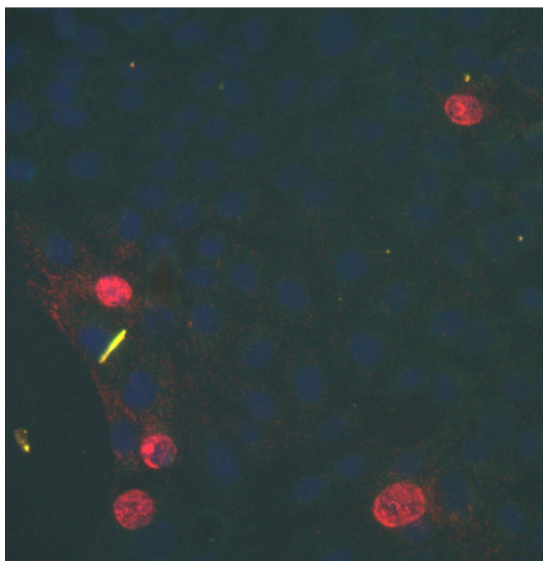


Fig.3 *isPLA detekation av PCV2 i celler 48h efter infektion. Blått är infärgade kärnor, rött är signal för den genomiska strängen och gul/grön är den replikativa strängen.*

För att testa metoden i vävnad användes fryssnitt av lymfknutor. PCV2 kunde detekteras även i dessa vävnader och uppvisade ett liknande spridningsmönster vilket beskrivits för cellerna. Hänglås-prober designades även för TTSuV-1, -2 och PoBoV. För dessa virus kunde vi dock inte utvärdera hänglås-proberna i ett cellsystem då virusisolat saknas. Analyserna utfördes därför direkt på vävnad som var PCR positiv för TTSuV-1, -2 och/eller PoBoV. I dessa analyser uppkom dock problem med hög bakgrund och ibland helt negativa resultat – troligen på grund av den låga koncentration som dessa virus förekommer i och metoden måste därför utvecklas ytterligare.

#### *Utökad viral metagenomik*

Då vi i vår tidigare virala metagenomiska studie endast letade efter DNAvirus gjordes en utökad studie där såväl RNA som DNA virus detekterades. Vi utökade även antal prover och studerade åtta grisar – 4 med PMWS och 4 utan. Den storskaliga sekvenseringen (454-sekvenserings teknologi) producerade totalt omkring 1,1 miljoner sekvenser med en medellängd på 280 baspar. Dessa sekvenser assemblades sedan och blast-sökningar utfördes för att hitta homologier till sekvenser publicerade i genbank (NCBI). Analyserna av dessa sekvenseringsresultat pågår och därför kan endast preliminära data lämnas. Som väntat ser vi hos PMWS grisarna en avsevärt större mängd PCV2 jämfört med grisar utan PMWS. I en av fyra PMWS grisar finner vi även en ansevärt mängd PoBoV vilket tyder på en aktiv replikation av viruset i just denna gris. Detta ses dock inte hos övriga grisar. Från dessa data är det inte möjligt att bedöma att något annat virus än PCV2 finns i en ökad mängd i PMWS grisar jämför med friska grisar. I såväl de friska som sjuka grisarna finns en bakgrundsflora av diverse virus, främst olika cirkulära DNAvirus men mängden sekvenser från dessa är få vilket tyder på att de åtminstone ej i dessa prover är särskilt aktiva. Ytterligare studier kommer att göras för att verifiera och karakterisera dessa virus för att få en ökad kunskap om den komplexa virala flora som existerar hos grisarna.

#### **Diskussion**

Saminfektioner med olika mikroorganismer är inte ovanligt och det är väl känt att virala infektioner ofta banar väg för sekundära bakteriella infektioner. Det är dock mindre känt hur saminfektion med olika virus påverkar den kliniska sjukdomsbilden. Tidiga in vitro studier beskrev hur infektion med ett virus kunde inducera ett ”anti-viralt stadie” i närliggande celler. Vi vet idag att det är den virus-inducerade produktionen av interferon som kan göra celler motståndskraftiga mot virusreplikation men vi vet också att vissa virus modifierar cellens förmåga att producera cytokiner till sin egen fördel. I det här sammanhanget är det ofta olika former av viral nukleinsyra som reglerar cellerna genom att interagera med olika receptorer som initierar olika signaleringsvägar i cellerna. Den nya metodiken att förutsättningslöst uppformera och påvisa nukleinsyra från hittills okända virus är därför ett viktigt redskap för att bättre kunna påvisa förekomsten av infektionsämnen och koppla dem till eventuella sjukdomstillstånd i besättningen.

#### **Publikationer**

- (1) Blomström AL, **Belák S**, **Fossum C**, McKillen J, Allan G, **Wallgren P**, Berg M. 2009. Detection of a novel porcine boca-like virus in the background of porcine circovirus type 2 induced postweaning multisystemic wasting syndrome. *Virus Res.*146: 125-9.
- (2) Blomström AL, **Belák S**, **Fossum C**, Fuxler L, **Wallgren P**, Berg M. 2010. Studies of porcine circovirus type 2, porcine boca-like virus and torque teno virus indicate the

presence of multiple viral infections in postweaning multisystemic wasting syndrome pigs. *Virus Res.* 152: 59-64.

- (3) Henriksson S, Blomström AL, Fuxler L, **Fossum C**, Berg M, Nilsson M. 2011. Development of an in situ assay for simultaneous detection of the genomic and replicative form of PCV2 using padlock probes and rolling circle amplification. *Virology* 53:37.

#### **Övrig resultatförmedling till näringen**

Veterinärer inom Svenska Djurhälsovården liksom grisproducenterna har varit mycket engagerade och till ovärderlig hjälp in insamlandet av relevant klinisk material som använts för att bygga upp biobanken. En direkt kommunikation med veterinärerna och djurägarna har också varit en förutsättning för att lyckas. De vetenskapliga publikationer har också varit av sådan kvalitet och nyhetsvärde att våra resultat presenterades som plenarföreläsning vid 21st International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Vancouver, Canada. July 18-21, 2010 (**Fossum, C.** Porcine circovirus type 2 – success and failure).