

## **Slutrapport SLF Dnr 060/00 ” Multiplex detektion av virus hos nötkreatur med hjälp av nya molekylära metoder (Projektnr. 0030021”.**

### **Bakgrund**

För att vidmakthålla en god djurhälsa och därmed en god mjölkproduktion bland Sveriges mjölkbesättningar är det viktigt att ha bra verktyg för att snabbt och kraftfullt detektera bl a virus. Virus orsakar bl a respiratoriska, reproduktiva och tarmproblem. Dessa sjukdomstillstånd påverkar givetvis djurets produktionsförmåga och leder därför alltid till ekonomiskt bortfall för den enskilde mjölkbonden. När ett djur uppvisar något eller flera av dessa symptom är det inte helt enkelt att snabbt ställa en korrekt diagnos då ett stort antal virus kan orsaka liknande symptom. Dagens analysmetoder grundar sig på att mäta immunsvaret (serologiska tester ex ELISA), detektera virus med antikroppar mot virusproteiner, virusisolering eller att detektera virusets arvs massa (PCR). Dessa metoder detekterar i regel endast ett eller ett fåtal virus i taget och det kan vara svårt för veterinären att veta vilket test som skall genomföras. Värdefull tid går till spillo och i värsta fall drabbas flera djur i besättningen.

PCR (Polymerase Chain Reaction) är en väl etablerad metod för att detektera virus hos en mängd olika djurslag inklusive människan. Sedan tekniken utvecklades 1985 har tusentals artiklar publicerats som belyser användbarheten hos denna metod att mångfaldiga specifika DNA regioner med hjälp av två specifika startsekvenser sk ”primers”. PCR tekniken är mycket känslig och kan detektera så lite som arvs massan från en enda viruspartikel. Denna känslighet medför också en del problem. För att maximera känslighet och specificitet använder man i regel sk ”nested” PCR för att detektera virus. Med ”nested” PCR menas att man efter en vanlig PCR reamplifierar den produkt som genereras i ytterligare en PCR. För att utföra en ”nested” PCR behöver man öppna och hantera rör innehållande PCR produkt vilket medför betydande risker för kontaminering (dvs negativa prover förefaller positiva för att de har kontaminerats med PCR produkter från tidigare experiment). Dessutom är det svårt att göra en multiplex (=detektera flera olika virus samtidigt) PCR. Rätt använd är ”nested PCR” mycket kraftfull och tillförlitlig men tekniken kräver tid och blir därmed dyrare och mer arbetskrävande.

De senaste två till tre åren har nya PCR metoder utvecklats. Med hjälp av fluorescensmärkta prover kan PCR produkten detekteras i realtid. Genom att mäta hur mängden fluorescens ökar i en PCR reaktion kan man påvisa en ökande mängd PCR produkt dvs att det virus man testat för finns i provet.

Detta system kan använda sig av flera olika fluorescerande färger och kan därmed detektera flera olika virus i samma PCR genom att dessa tilldelas en egen, specifik, färg. Denna sk multiplexa PCR teknik gör det möjligt att designa kraftfulla och snabba test och det är denna teknik som kommer att avhandlas i denna ansökan.

### **Material och metoder**

#### *Utvecklingsarbetet*

Utveckling av realtids PCR system är betydligt mer komplicerat och kräver planering och god metodik jämfört med utvecklandet av "vanliga" PCR system. Vi har i det här projektet och även i andra projekt kommit att arbeta på ett sätt som vi finner adekvat.

- Steg 1:** Genomgång av publicerad litteratur samt publicerade sekvenser gällande det virus som vi vill utveckla en test för.
- Steg 2:** Utifrån steg 1 väljer vi lämplig region i genomet som uppfyller de krav som vi ställer oftast att den är tillräckligt konservativ för att medge detektion av samtliga stammar av viruset i fråga.
- Steg 3:** Med hjälp av lämplig mjukvara designar vi ett realtids PCR system.
- Steg 4:** Kontroll av det utvecklade systemet innan det tas i bruk. Sekvenser kontrolleras mot publicerade sekvenser (BLAST) för att undvika potentiella problem (t ex andra agens med liknande sekvenser, upptäckt av varierande virusstammar av det virus som testen skall detektera etc.)
- Steg 5:** Om steg 1-4 ser ut att fungera går vi vidare med det praktiska arbetet. Primers och probe syntetiseras och praktiska laborieförsök tar vid. Systemet optimeras och karakteriseras (sensitivitet och specificitet) preliminärt.
- Steg 6:** Om testet skall ingå i en multiplex PCR fortsätter optimeringsarbetet och andra tester läggs till.
- Steg 7:** När ett test har tagit sig igenom steg 1-6 börjar arbetet med att validera testen för att undersöka och dokumentera dess lämplighet att användas i rutindiagnostik. Steg 7 ligger utanför den här ansökan.

De virus som är aktuella i detta projekt är: Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV I), Bovine Herpes Virus-1 (BHV-1), Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), Bovine Corona Virus (BCV), Bovine Adenovirus (BAdV) och Parainfluenza III. Dessa kan samtliga orsaka respiratoriska problem hos nöt.

Sekvensdata för realtids-system design samlades in från GenBank med hjälp av NCBI Blast och bearbetades i Lasergene 2005 mjukvara (DNASTAR, v.5.03). RNA och DNA extraherades från provmaterial (cellkultur, nässvabb, och homogeniserad träck) med en Genovision M48 extraction robot med MagAttract Virus Mini M48 kit (Qiagen). Primers och TaqMan prober valdes ut med hjälp av Primer Express 1.0 mjukvara (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Baserat på konserverade regioner hos respektive virus. Alla primers och prober syntetiserades av Optigen Ltd. (USA) och proberna av Biosearch Technologies (Novato, CA, USA).

Amplifikation och detektion av viralt RNA/DNA genomfördes en RotorGene 3000 (Corbett Research, Australien).

## **Resultat och diskussion**

### *Steg 1-5*

Samtliga virus som ingår i projektet har passerat steg 1-5. Realtids-PCR system finns utvecklade för Bovine Viral Diarrhea Virus (BVDV I), Bovine Herpes Virus-1 (BHV-1), Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV), Bovine Corona Virus (BCV), Bovine Adenovirus (BAdV) och Parainfluenza III.

### *Sensitivitet*

Normalt är realtids PCR en mycket känslig metod och rutinmässigt detekterar man 10 viruskopior. Samtliga utvecklade system uppvisar en sensitivitet som ligger inom det förväntade (dvs >100 viruskopior detekteras)

### *Specificitet*

Specificiteten testades genom att så många stammar av respektive virus analyserades. Dessutom testade vi också närbesläktade virus som vi inte vill detektera med respektive system. Av resultatet att döma finns det inga problem med specificiteten i de utvecklade testerna.

### *Steg 6*

Syftet med projektet var att dels utveckla detektionssystem för respiratoriska virus hos nöt men också att sätta samman dessa till mer komplicerade tester, sk multiplexa tester där flera virus detekteras samtidigt i samma reaktionsrör.

I likhet med flera andra projekt där vi har tittat på möjligheten att analysera prover med en multiplex metod är resultaten samstämmiga. Det går oftast utmärkt att sätta ihop multiplexa tester men i regel sjunker känsligheten allt för mycket för att den multiplexa testen ska kunna användas i ett diagnostiskt syfte. De i projektet ingående analyserna har testats i flera olika multiplexa kombinationer men resultatet skiljer sig inte från andra projekt. Sensitiviteten minskar i allt för stor grad för att kunna vara användbart i ett diagnostiskt syfte.

Alternativt kan man köra de ingående testerna i separata provrör och istället automatisera provuppsättning och analys. Detta är något som vi har gjort för t ex respiratoriska virus hos häst där ett system finns uppsatt för rutindiagnostiskt bruk som detekterar fem olika virus från nässvabbar från häst. Det finns inget som hindrar att ett liknande system sätts upp för nöt om näringen så önskar.