

- Projekttitlel:** Molekyläpidemiologisk övervakning av BVDV under BVD-programmets slutfas
- Huvudsökande:** Sandor Belák, Professor, VMD, Avdelningen för parasitologi och virologi, BVF, SLU. Avdelningschef, Avdelningen för virologi, Sekt. för forskning och utveckling, SVA
- Medsökande:** Ann Lindberg, leg. vet., VMD, Svensk Mjolk
- Karl Ståhl, leg. vet., VMD, Avdelningen för parasitologi och virologi, BVF, SLU. Avdelningen för virologi, Sektionen för forskning och utveckling, SVA
- Claudia Baule, Forskare, VMD, Avdelningen för virologi, Sektionen för forskning och utveckling, SVA
- Stefan Alenius, Professor, VMD, Institutionen för kliniska vetenskaper, SLU
- Jorge Moreno-López, Professor, VMD, Avdelningen för parasitologi och virologi, BVF, SLU.
- Djurslag:** Nötkreatur

1. Bakgrund

1.1 BVDV

Bovint virusdiarrévirus (BVDV) är ett viktigt sjukdomsagens som ger upphov till stora ekonomiska förluster i nötkreatursbesättningar världen över. BVDV tillhör genus *Pestivirus* i familjen *Flaviviridae* och kan genetiskt delas upp i två genotyper, BVDV typ 1 och BVDV typ 2 [10]. I allmänhet anses de två genotyperna ge upphov till likartade sjukdomsspektra [11], även om typ 2 framför allt i USA och Canada, också har förknippats med mycket allvarliga utbrott med hög mortalitet och morbiditet [4, 9]. Förekomst av högvirulent BVDV typ 2 i Europa rapporterades första gången 1999 från Holland i samband med ett utbrott orsakat av vaccinering mot IBR med vaccin kontaminerat med BVDV [2]. Dessutom har mindre virulenta stammar av typ 2 isolerats i ett flertal länder i Europa [3, 5] men Sverige är ännu så länge fritt. BVDV typ 1 förekommer över hela Sverige och sedan 1993 pågår ett bekämpningsprogram som nu befinner sig i slutfasen [7, 8].

Akuta infektioner hos immunokompetenta seronegativa nötkreatur förlöper oftast subkliniskt eller med milda kliniska symptom såsom feber, näsflöde, diarré och erosioner i munhålan. Viruset ger även upphov till immunosuppression vilket ger ökad mottaglighet för andra infektionsagens. Infektion hos seronegativa dräktiga djur kan resultera i transplacent infektion med fosterdöd och missbildningar som följd. Infektion under tidig dräktighet (första trimestern) kan även resultera i födsel av immunotoleranta, persistent infekterade (PI) kalvar [1]. Dessa kalvar saknar förmåga att bilda antikroppar mot det persisterande viruset och utsöndrar därför konstant stora mängder virus. De utgör därigenom den viktigaste och effektivaste smittkällan för BVDV. Identifiering och eliminering av PI-djur utgör därför grunden för de bekämpningsstrategier som tillämpas i det svenska BVD-programmet [7, 8].

Trots övervakning och regelbunden provtagning förekommer nyinfektioner i friförklarade besättningar utan att dessa bryter mot BVD-programmets strikta smittskyddsregler. Indirekta smittvägar via exempelvis besökare, veterinärer, seminörer och andra personer som rör sig mellan besättningar utgör idag -i slutfasen av programmet - relativt sett en större risk, dels för att konventionella smittvägar är väl kontrollerade och dels för att en större del av besättningspopulationen är mottaglig. På grund av BVDs epidemiologi och BVD-programmets upplägg blir det ofta en fördröjning mellan infektionstillfälle och upptäckt. Källan till nyinfektion klargörs därför aldrig i många av dessa fall. En nyinfektion i en friförklarad besättning får stora ekonomiska konsekvenser för såväl producent som näring, dels genom sänkt produktion och ökade veterinära kostnader, dels genom en fördröjning av programmets avslutande, och därigenom fortsatt provtagningsintensitet på dagens nivå. Genom att i varje fall av nyinfektion på ett effektivt sätt klargöra smittans ursprung kan risker och riskbeteende förebyggas. Därigenom ökas möjligheten att reducera antalet icke-friförklarade besättningar till ett minimum inom de närmsta åren.

BVD-programmet

Inom BVD-programmet provtas samtliga anslutna besättningar med mellan 4 och 12 månaders intervall. Proverna utgörs av mjölk (tank- eller samlingsprov) eller blod (individprov) och provtyp liksom provtagningsintervall avgörs av besättningstyp och av respektive besättnings status i programmet. Proverna analyseras med indirekt ELISA med avseende på förekomst av specifika antikroppar mot BVDV. Vid konstaterad nyinfektion tas individuella prover från samtliga djur över 12 veckors ålder inom ett kort tidsintervall för att identifiera potentiella PI-djur. Därefter provtas samtliga kalvar under ca ett års tid, så snart de

Slutrapport, SLF

Proj.nr 0330007

uppnått 12 veckors ålder. Detta görs för att finna eventuella PI-djur som ännu inte var födda vid den initiala provtagningen. Prover där antikroppar inte kan påvisas analyseras vidare med avseende på förekomst av virus med immunoperoxidastest (IPX). All diagnostik i programmet sker vid avdelningen för virologi, SVA, Uppsala.

Projektets syfte var att med moderna molekylärbiologiska metoder genetiskt karaktärisera alla BVDV-isolat från svenska besättningar för att uppnå:

- a) effektiv smittspårning för att kunna identifiera och förebygga potentiella smittvägar och riskfaktorer
- b) effektiv övervakning av det svenska BVDV-läget för att snabbt kunna upptäcka och minska konsekvenserna av eventuella introduktioner av nya BVDV-stammar.

Målsättningen var att påskynda slutfasen av BVD-programmet för att på sikt officiellt kunna förklara den svenska nötkreaturspopulationen fri från BVDV.

2. Material och metoder

2.1 BVDV-bank

Sedan oktober 2002 har serum från samtliga djur som påvisats som infekterade inom BVD-programmet sparats vid -20°C. Ett eller flera serumprover från varje nyinfekterad besättning har sedan valts ut för vidare hantering. Dessa prover har inokulerats på cellkultur (bovina turbinatceller) för att isolera och propagera virus. Inokulaten har sparats vid -70° C och utgör grunden för en svensk BVDV-bank.

2.2 Svensk Mjölks BVDV-databas

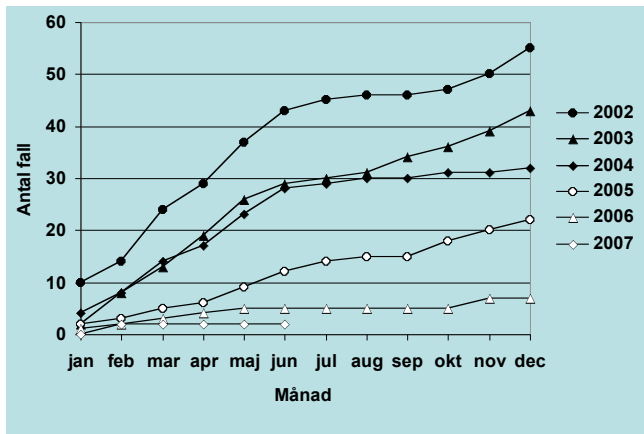
Parallellt med BVDV-banken har en databas med information om viruspositiva djur och besättningar, samt i förekommande fall smittspårningsrapporter från BVDV-programmet, byggts upp. Dessutom har geografiska koordinater för flertalet besättningar tagits fram.

2.3 Molekylärepidemiologisk analys

En konserverad region, den s.k. icke-kodade 5'-ändan (5'NCR), av BVDV-genomet från samtliga isolat har amplifierats med RT-PCR, följt av sekvensanalys [13]. Sekvenser har sedan jämförts genom fylogenetisk analys och vid dessa jämförelser har sekvenser från internationellt beskrivna BVDV-stammar använts som referenser. Svensk Mjölks BVDV-databas med smittspårningsrapporter har använts för att koppla samman misstänkta smittvägar med funna fylogenetiska samband, dvs likheter mellan BVDV-stammar. Sedan 2005 har funna fylogenetiska samband använts för att rikta smittspårningarna. Dessutom har kartmaterial och geografiska koordinater använts för att koppla samman fylogenetiska och geografiska samband.

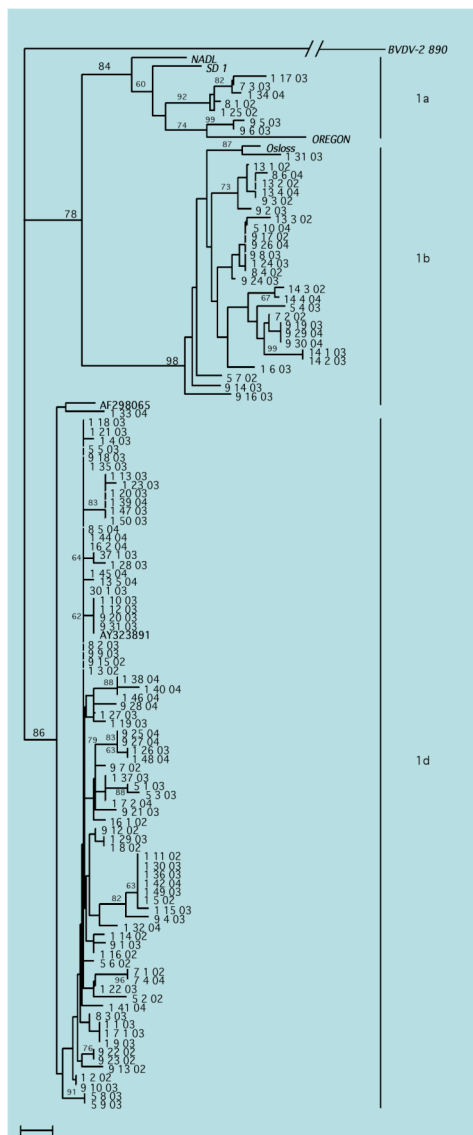
3. Resultat och diskussion

Till dags dato har mer än 500 viruspositiva individprover från 150 besättningar sparats och katalogiserats. Proverna härrör från besättningar från hela landet med en dominans från Skånesemin och Skara semins områden (n=110). Antalet nyinfekterade besättningar har successivt minskat (figur 1). I skrivande stund (26 september 2007) har endast två nyinfekterade besättningar påvisats under året.



Figur 1
 Ackumulerade antalet nyinfekterade besättningar påvisade inom BVDV-programmet mellan 2002 och 2007

Den fylogenetiska analysen av sekvenser från de 150 isolaten visar att Sverige fortfarande är fritt från virulenta BVDV typ-2-stammar, och inga andra inte tidigare påvisade typer/subtyper av BVDV har påvisats. De stammar som har cirkulerat i Sverige under projektets gång tillhör samtliga genogrupp 1: subtyp 1a, 1b och 1d, med en stark dominans av subtyp 1d (figur 2).



Figur 2
 Fylogenetiskt träd baserat på ett 237 baspar lång fragment av en konserverad region av genomet (5' NCR) från svenska BVDV stammar isolerade inom projektet. Sekvenser från referensstammar (*kursiv, fet stil*) och andra tidigare beskrivna isolat (*fet stil*) hämtades från GenBank och inkluderades som jämförelse. De svenska stammarna är kodade efter förening, besättningsnummer och år.

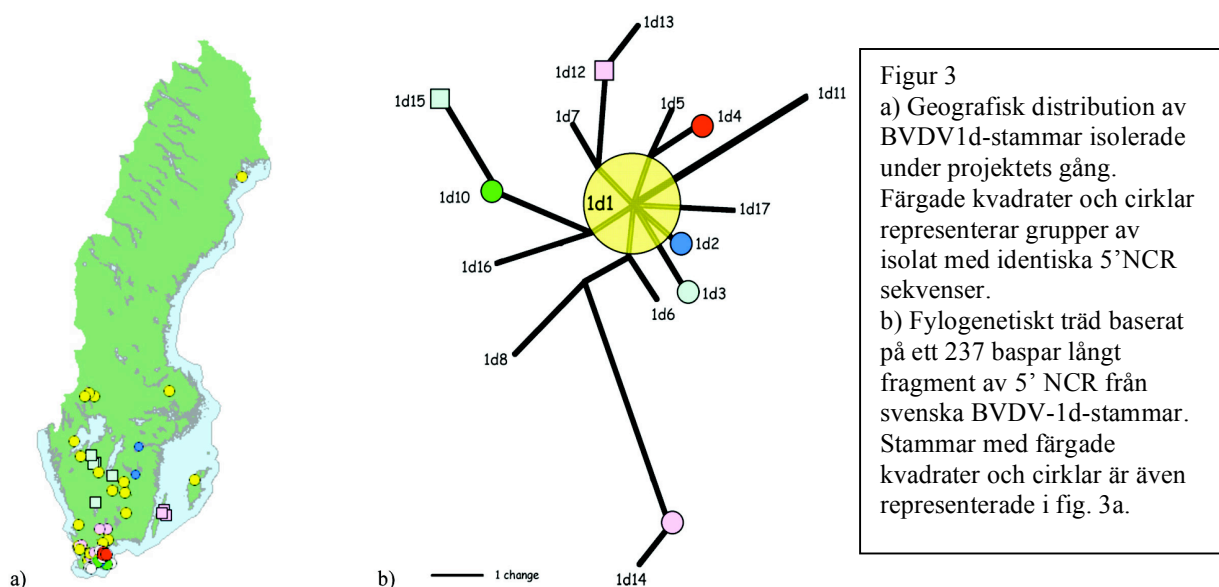
Slutrapport, SLF

Proj.nr 0330007

Subtyp 1a har inte påvisats sedan 2004 och cirkulerar sannolikt inte längre i den svenska nötkreaturspopulationen. Molekylärepidemiologisk analys har i många fall (~80% av alla fall mellan 2004-2007) gett upphov till information som varit värdefull för vidare smittspårning, d.v.s. information som kunnat stärka eller avfärda misstänkta smittvägar, eller leda smittspårningen i ny riktning. Mellan 2004 och 2007 har andelen uppklarade smittspårningar ökat från 46-67%. Genom att majoriteten av alla BVDV-stammar som cirkulerat i den Svenska nötkreaturspopulationen under de senaste åren finns representerade i BVDV-banken (vilket möjliggör en effektiv och säker övervakning) har vi dessutom vid fall av importerad misstänkt BVDV-kontaminerad sperma kunnat förkasta att kontamineringen skett i Sverige med svenska virusstammar.

En tydlig besättningspecifik distribution av stammar (i.e. de stammar som cirkulerar inom en besättning är identiska, baserat på den analyserade regionen), vilket har observerats vid tidigare studier av mer begränsad omfattning, kunde bekräftas i de flesta fall. Även i de fall där virus isolerats vid flertal tillfällen i en och samma besättning och med flera års mellanrum, var stammarna identiska i den analyserade regionen. Detta visar hur stabilt viruset är när det cirkulerar inom en bestämd besättning.

Från de 150 besättningarna har 78 unika stammar (baserat på den analyserade regionen) identifierats, varav 50 unika för enskilda besättningar och 28 grupper bestående av identiska stammar härrörande från mellan 2 och 17 olika besättningar. Vid vidare analys av den geografiska distributionen av ett urval av BVDV-1d, vilka representerar >50% av alla stammar som isolerats under projektets gång, konstaterades en tydlig tendens till geografisk anhopning av dessa grupper av identiska stammar, med ett tydligt undantag. En stam (här kallad 1d1), som isolerats från 17 olika besättningar, var spridd över stora delar av landet (figur 3a). En fylogenetiska analys av de utvalda stammarna visade vidare att stammen 1d1 var det mest sannolika gemensamma ursprunget till övriga stammar (figur 3b).



Sammantaget antyder den geografiska distributionen och resultatet av den fylogenetiska analysen att en stor andel av alla BVDV stammar som cirkulerat i landet under senare år härrör från en enstaka introduktion, möjligen av en stam av typen 1d1. Denna stam har cirkulerat i landets nötkreaturspopulation i många år och spritts över landet. Detta resultat visar inte bara att BVDV kan cirkulera under längre tid utan att genetiskt förändras även då det sprids mellan besättningar, vilket framför allt är av vetenskapligt intresse. Det visar dessutom med pedagogisk tydlighet (figur 3) vad som kan ske ifall import och handel sker

utan tillräcklig kontroll, det vill säga hur en enskilda oförsiktig import kan få återverkan på stora delar av näringen.

4. Konklusion

Detta projekt är det första där man systematiskt tillämpat molekylärepidemiologisk metodik inom ett bekämpningsprogram mot BVDV. Projektet anses mycket lyckat och har rönt stor uppmärksamhet då resultat har presenterats vid internationella konferenser (se resultatförmedling nedan). Tack vare projektet har vi nu en mycket god uppfattning om vilka virusstammar som cirkulerar i landet, vilket i sin tur möjliggör en effektiv och säker övervakning. Introduktioner av icke tidigare beskrivna stammar kommer snabbt att kunna upptäckas och spridning förhindras. Våra resultat har visat att metoden är ett mycket användbart komplement till systemet med smittspårningsrapporter som används inom programmet. I de fallen misstankar om smittvägar finns, kan dessa stärkas eller förkastas återopande fylogenetiska likheter eller skillnader. Tack vare detta kan vi, för producenter, veterinärer och andra berörda parter, belysa vikten av strikta smittskyddsrutiner och illustrera betydelsen av den mänskliga faktorn för utgången av ett kontrollprogram. Den direkta nyttan för näringen kan sammanfattas:

- Genom informationsspridning till veterinärer, producenter och övriga berörda personalkategorier, har vikten av strikta smittskyddsrutiner i djurhushållningen belysts. Den höjda medvetandegraden i hela produktionsledet kan förväntas ha reducerat risken för indirekt smitta och har på så sätt lett till sänkt frekvens av nyinfektioner.
- Karaktäriseringen och kartläggningen av samtliga BVDV-stammar i landet har inneburit en unik möjlighet till smittspårning och övervakning av det svenska BVDV-läget. Genom ett molekylärepidemiologiskt tillvägagångssätt kan BVD-programmets slutfas förväntas ha påskyndats.
- Som en följd av minskad BVDV förekomst kan projektet förväntas ha gett upphov till miljökonsekvenser vilka först och främst inbegriper förbättrad djurhälsa inom nötkreaturspopulationen. Dels genom sänkt incidens av sjukdom och symptom direkt orsakad av BVDV, dels genom sänkt frekvens av sekundära infektioner. En sänkt frekvens av sekundära infektioner bör som konsekvens ha fört med sig en minskad användning av antibiotika inom svensk mjölk- och köttproduktion. Med tanke på en alltmer utbredd antibiotikaresistens är detta en förtjänst av högsta vikt.

5. Resultatförmedling

Under projektets gång har resultat från detta projekt förmedlats nationellt och internationellt till forskare, veterinärer och producenter enligt följande:

5.1. Publikationer

Ståhl K, Kampa J., Baule C, Isaksson M., Moreno-López J., Belak S., Alenius S and Lindberg A. (2005). Molecular epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Prev Vet Med*, 72 (1-2), 103-108.

Ståhl K, Kampa J., Baule C, Belak S., Alenius S and Lindberg A. (2005). Bovine Viral Diarrhoea Virus strains circulating in Sweden originate from one single introduction- a geographical and phylogenetic analysis of BVDV-strains isolated during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. (Manuskript)

Slutrapport, SLF

Proj.nr 0330007

Ståhl K, Lindberg A. (2004) Nytt projekt påskyndar BVD-programmet. Svensk Mjölks Forskning Special, 2004-05-10.

Ståhl K. (2005) Molekylärepidemiologisk övervakning av BVDV under BVD-programmets slutfas. Svensk Mjölks Forskning Special, 2005-03-24.

Ståhl K. (2006) Bovine Viral Diarrhoea Virus and Other Reproductive Pathogens-Epidemiological Studies in Peruvian Cattle. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Acta Universitatis Agriculturae Sueciae, 2006: 53, 29-31. <http://diss-epsilon.slu.se/archive/00001146/01/thesis.pdf>

5.2. Internationella kongresser

Ståhl K, C. Baule, S. Alenius, A. Lindberg, S. Belak (2004). Molecular epidemiology and surveillance of BVDV during the last phase of the Swedish BVD-programme. SVEPM, Martigny, Schweiz, Mars 2004.

Ståhl K, Kampa J., Baule C, Isaksson M., Moreno-López J., Belak S., Alenius S and Lindberg A. (2004). Molecular epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. In proceedings of the 2nd International Symposium on BVDV Control, Porto, Portugal, 20-22 October 2004.

Lindberg A. (2005). Investigating New Cases of BVDV. In Proceedings of a BVDV Symposium. FCE Publication No. 241: 34.1, 79-84. <http://www.sciquest.org.nz/default.asp?pageid=69&pub=3&vol=34.1&iss=>

Ståhl K, Kampa J., Baule C, Isaksson M., Moreno-López J., Belak S., Alenius S and Lindberg A. (2005). Molecular epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. In proceedings of the 6th Pestivirus Symposium, Thun, Switzerland, 13-16 September 2005. **Pris för näst bästa muntliga vetenskapliga presentation.**

Ståhl K., Lindberg A., Baule C, Isaksson M., Kampa J., Belak S. and Alenius S. (2006). Molecular epidemiology of Bovine Viral Diarrhoea Virus during the Swedish BVD eradication programme. In proceedings of the 11th Symposium of the International Society for Veterinary Epidemiology and Economics, Cairns, Australia: ISVEE 11, 285, 2006.

5.3. Övriga möten och seminarier

Resultaten har dessutom förmedlats till kolleger och veterinärstudenter vid interna möten och seminarier på SLU, SVA och Svensk Mjolk.

6. Referenser

1. Baker, J.C., The clinical manifestations of bovine viral diarrhoea infection. Vet Clin North Am Food Anim Pract, 1995. 11(3): p. 425-45.
2. Barkema, H.W., C.J. Bartels, L. van Wuijckhuise, J.W. Hesselink, M. Holzhauser, M.F. Weber, P. Franken, P.A. Kock, C.J. Bruschke, and G.M. Zimmer, [Outbreak of bovine virus diarrhoea on Dutch dairy farms induced by a bovine herpesvirus 1 marker

Slutrapport, SLF

Proj.nr 0330007

- vaccine contaminated with bovine virus diarrhoea virus type 2]. *Tijdschr Diergeneeskde*, 2001. 126(6): p. 158-65.
3. Beer, M., G. Wolf, and O.R. Kaaden, Phylogenetic analysis of the 5'-untranslated region of German BVDV type II isolates. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health*, 2002. 49(1): p. 43-7.
 4. Corapi, W.V., R.D. Elliott, T.W. French, D.G. Arthur, D.M. Bezek, and E.J. Dubovi, Thrombocytopenia and hemorrhages in veal calves infected with bovine viral diarrhoea virus. *J Am Vet Med Assoc*, 1990. 196(4): p. 590-6.
 5. Drew, T.W., T. Sandvik, P. Wakeley, T. Jones, and P. Howard, BVD virus genotype 2 detected in British cattle. *Vet Rec*, 2002. 151(18): p. 551.
 6. Gard, J.A., M.D. Givens, and D.A. Stringfellow, Bovine viral diarrhoea virus (BVDV): epidemiologic concerns relative to semen and embryos. *Theriogenology*, 2007. 68(3): p. 434-42.
 7. Hult, L. and A. Lindberg, Experiences from BVDV control in Sweden. *Prev Vet Med*, 2005. 72(1-2): p. 143-8; discussion 215-9.
 8. Lindberg, A.L. and S. Alenius, Principles for eradication of bovine viral diarrhoea virus (BVDV) infections in cattle populations. *Vet Microbiol*, 1999. 64(2-3): p. 197-222.
 9. Pellerin, C., J. van den Hurk, J. Lecomte, and P. Tussen, Identification of a new group of bovine viral diarrhoea virus strains associated with severe outbreaks and high mortalities. *Virology*, 1994. 203(2): p. 260-8.
 10. Ridpath, J., Classification and Molecular Biology, in *Bovine viral diarrhoea virus: diagnosis, management, and control*, S.M. Goyal and J. Ridpath, Editors. 2005, Blackwell Publishing: Ames, Iowa, USA.
 11. Ridpath, J.F., J.D. Neill, M. Frey, and J.G. Landgraf, Phylogenetic, antigenic and clinical characterization of type 2 BVDV from North America. *Vet Microbiol*, 2000. 77(1-2): p. 145-55.
 12. Schirmer, H., G. Strebelow, K. Depner, B. Hoffmann, and M. Beer, Genetic and antigenic characterization of an atypical pestivirus isolate, a putative member of a novel pestivirus species. *J Gen Virol*, 2004. 85(Pt 12): p. 3647-52.
 13. Ståhl, K., J. Kampa, C. Baule, M. Isaksson, J. Moreno-Lopez, S. Belak, S. Alenius, and A. Lindberg, Molecular epidemiology of bovine viral diarrhoea during the final phase of the Swedish BVD-eradication programme. *Prev Vet Med*, 2005. 72(1-2): p. 103-8; discussion 215-9.