

Utveckling av en realtids PCR för detektion av porcint circovirus-2 med PriProET-metodik

Det finns ett flertal PCR-metoder beskrivna för detektion av porcint circovirus typ 2 (PCV-2; Allan et al., 1999; Larochelle et al., 1999; West et al., 1999; Mankertz et al., 2000; Kim et al., 2001; Kim and Chae, 2001). Men eftersom PCV-2 är vanligt förekommande i svinpopulationer är kvalitativ PCR inte lämpligt som diagnosverktyg. Kvantitativa realtids PCR metoder har beskrivits (Rovira et al., 2002; Brunborg et al., 2004; Olvera et al., 2004), men de flesta av dessa är TaqMan baserade. Detta system kräver en exakt överensstämmelse mellan proben och den virala målsekvensen, vilket gör att punktmutationer i PCV-2 genomet kan leda till falska negativa resultat. Med den mer robusta men ändå känsliga primer-probe energi överföringsmetoden- (PriProET-metoden; Rasmussen et al., 2003) kan detta problem lösas. PriProET-metoden är en asymmetrisk PCR som utförs med en 5'FAM inmärkt primer samt med en vanlig primer i proportionerna 8:1. I annealing-steget hybridiserar en 3' TexasRed inmärkt probe till amplikonet vilket resulterar i en fluorescerande energiöverföring som kan mätas i realtid under PCR reaktionen (Fig. 1).

I. Amplifikation (asymmetric PCR)

5'FAM



II. Detektion

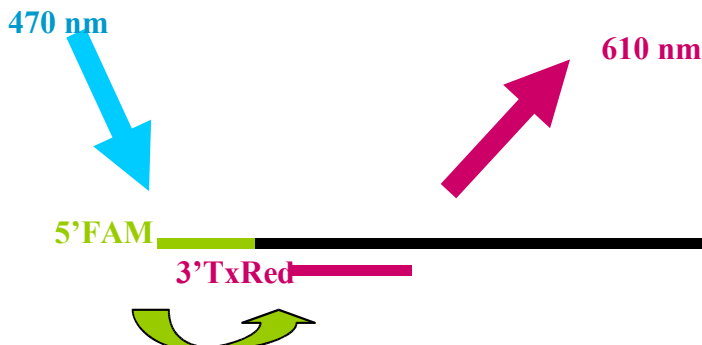


Fig. 1. PriProET PCR princip

En PriProET PCR har beskrivits för PCV-1 och PCV-2 (Ladekjaer-Mikkelsen et al., 2002), men i detta system är endast proben PCV-1 alt PCV-2 specifik medan primrarna amplifierar båda genotyperna. Eftersom PCV-1 är närvarande i nästan 100 % av grispopulationen kan kvantifiering med detta system leda till falska positiva resultat.

Vårt mål var att utveckla en robust kvantitativ PriProET PCR i vilken såväl primers som probe endast hybridiserar till PCV-2. Primers och probe designades utifrån den välkonserverade ORF1 genen (PCV-2) för att amplifiera ett stort urval av olika PCV-2 isolat. Den valda regionen skiljer sig signifikant mellan PCV-1 och PCV-2 (Fig 2).

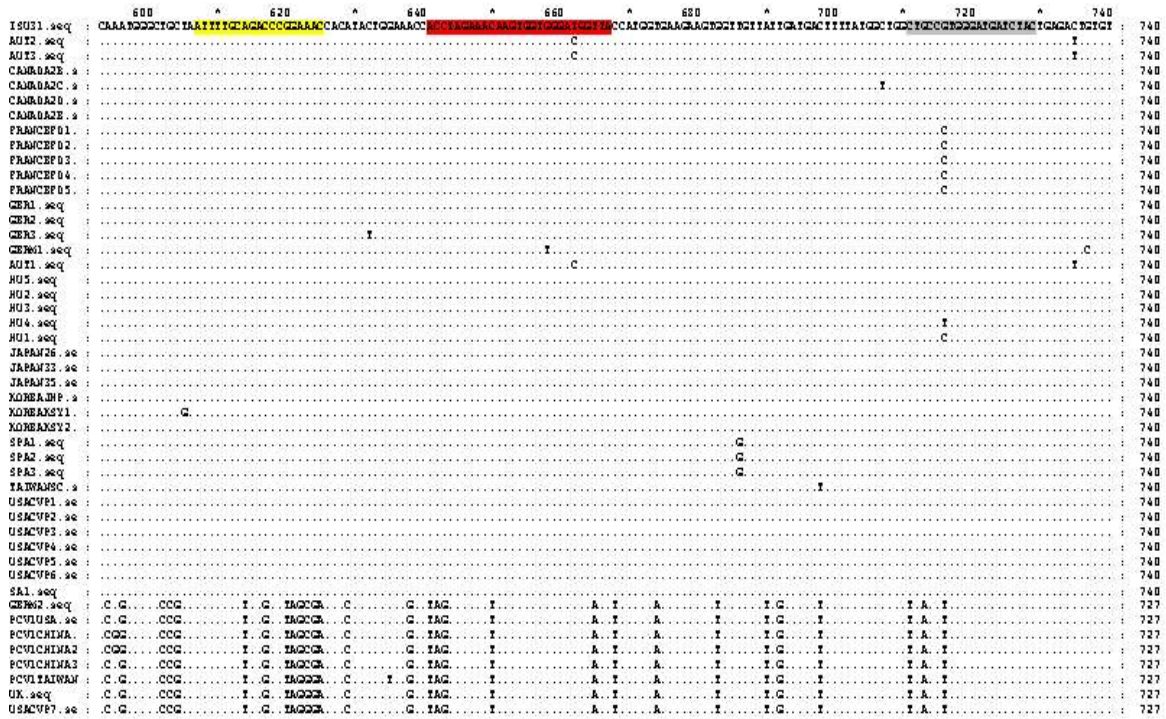


Fig. 2. Primer och probe lokalisation i PCV-2 genomet

DNA renades fram från vävnad och blod med High Pure Viral Nucleic Acid Purification Kit (Roche).

Reaktionsmix:

- 2.5 µl Titanium Taq polymerasbuffer (BD Biosciences)
- 1.25 µl dNTP
- 1.25 µl Texas Red inmärkt probe
- 1 µl FAM inmärkt F primer
- 0.125 µl R primer
- 0.5 µl Titanium Taq polymeras (BD Biosciences)
- 2 µl DNA
- H₂O up to 25 µl

Reaktionen utfördes i en RotorGene3000 realtids PCR maskin (Corbett Research).

Reaktionsförhållande:

Initial denaturering: 2 min at 94°

Cykler (45X):










Denaturering: 15 sek 94°

Annealing: 15 sek 54°C (excitation vid 470, detektion vid 610 nm)

Extension: 20 sek 72°C

Efter cykelstegen utförs en smältanalys vid 50-90°C: 10 sekunder vid varje grad.

Systemets känslighet och specificitet undersöktes med en spädningsserie av en plasmid innehållande ORF1 genen (PCV-2 strain Stoon) (vänligen tillhandahållen av Caroline

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)	% Var
A1		10 ⁹	Standard	13.49	2.00E+09	2.81E+09	40.4%
A2		10 ⁸	Standard	18.11	2.00E+08	1.74E+08	12.9%
A3		10 ⁷	Standard	21.51	2.00E+07	2.24E+07	12.0%
A4		10 ⁶	Standard	25.68	2.00E+06	1.82E+06	8.8%
A5		10 ⁵	Standard	29.61	2.00E+05	1.71E+05	14.7%
A6		10 ⁴	Standard	33.90	2.00E+04	1.29E+04	35.5%
A7		10 ³	Standard	37.29	2.00E+03	1.68E+03	16.1%
A8		10 ²	Standard	40.25	2.00E+02	2.81E+02	40.6%
B1		10	Standard	44.29	2.00E+01	2.47E+01	23.6%

Fossum). Känsligheten var 10 kopior och systemet kunde detektera PCV-2 DNA i ett linjärt spektra från 10¹-10¹⁰ (Fig. 3). Assayens specificitet bekräftades med smältkurvsanalysen: den förväntade toppen vid 66°C erhöles och genom att testa ett flertal andra grispatogen med negativa resultat (PRRS-virus, porcint parvovirus, Mycoplasma hyopneumoniae, pseudorabiesvirus).

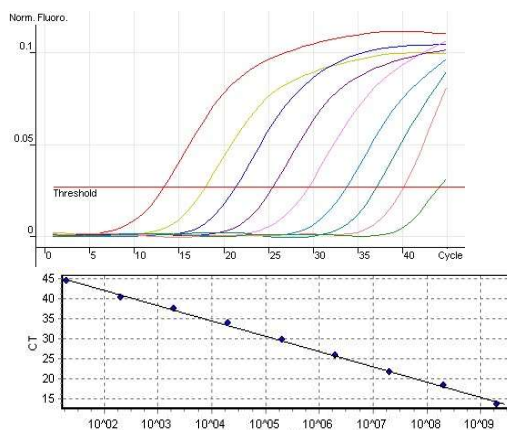
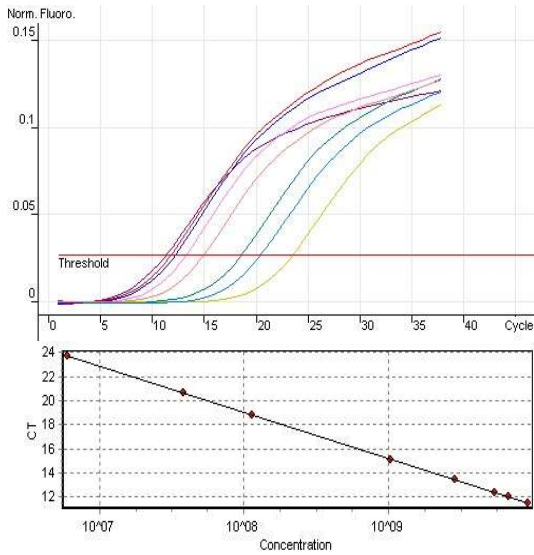


Fig. 3. PriProET PCR resultat: spädningsserie av ORF1 plasmid (PCV-2)

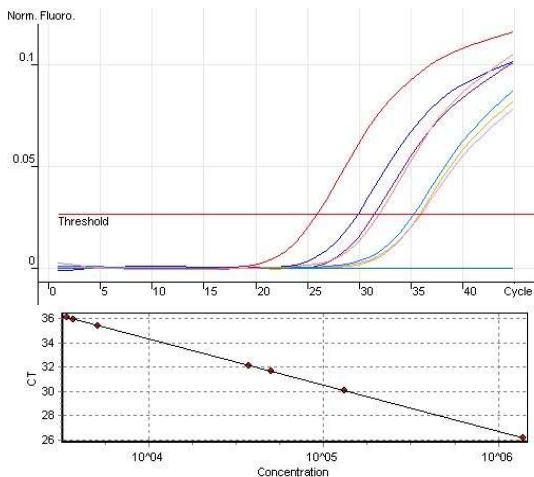
I nästa steg undersöktes serum och vävnad från griskultingar som uppvisade tydliga symptom för PMWS. Resultaten korrelerade med tidigare beskrivna d.v.s. virusmängden i 1 ml plasma och i 500 ng vävnad ska överträda 10⁷ viruspartiklar om PMWS ska diagnostiseras. I vårt experiment var virus mängden 10¹¹-10¹² i lymfoid vävnad, 10¹⁰ i lunga och lever, 10⁹ blod (Fig. 4) (p.g.a. DNA spädningarna i PCR reaktionerna ska alla värdena som indikeras i de följande figurerna multipliceras med 100).



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
A1	Red	tonsill	Unknown	12.00		6907526168.01962	
A2	Yellow	blod	Unknown	23.69		6022789.05257716	
A3	Blue	peribronch lymph n	Unknown	12.37		5511458270.74674	
A4	Purple	mesenteric lymph n	Unknown	11.50		9329685260.00915	
A5	Pink	lunga	Unknown	13.44		2902364799.67486	
A6	Light Blue	lever	Unknown	20.61		38504450.9093486	
A7	Teal	njure	Unknown	18.81		114150901.446625	
A8	Light Red	mjälte	Unknown	15.13		1045761100.819	

Fig. 4. PriProET PCR resultat vid tydlig PMWS

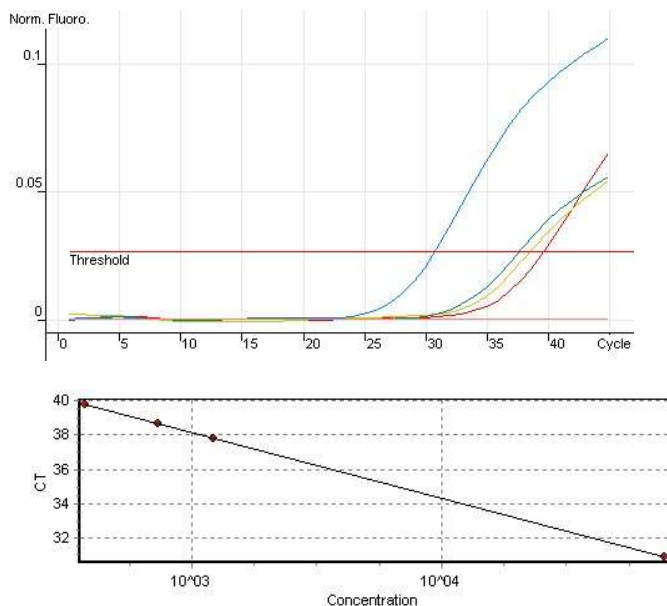
Griskultingar med svaga PMWS-symptom visade en liknande viral distribution men där var virusmängden endast 10% jämfört med den som påvisades hos grisar med tydlig PMWS, dvs PCV2-mängden var en 10-potens lägre (Fig. 5).



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
A1	Red	tonsill	Unknown	26.14		1382844.06522153	
A2	Yellow	blod	Unknown	35.96		3722.63018570092	
A3	Blue	peribronch lymph n	Unknown	30.03		132393.152683516	
A4	Purple	mesenteric lymph n	Unknown	31.63		50489.8053758412	
A5	Pink	lunga	Unknown	36.10		3419.56706995616	
A6	Light Blue	lever	Unknown	35.43		5140.30885566189	
A7	Teal	njure	Unknown				
A8	Light Red	mjälte	Unknown	32.13		37493.1901262236	

Fig. 5. PriProET PCR resultat vid mild PMWS

Den kvantitativa PCR-profilen hos kultingar utan symptom på PMWS gav ytterligare en tusenfaldigminskning av virusmängden. Endast leverproverna uppvisade en signifikant virusmängd vilket kanske kan ge en vägledning till hur sjukdomen utvecklas (Fig. 6).

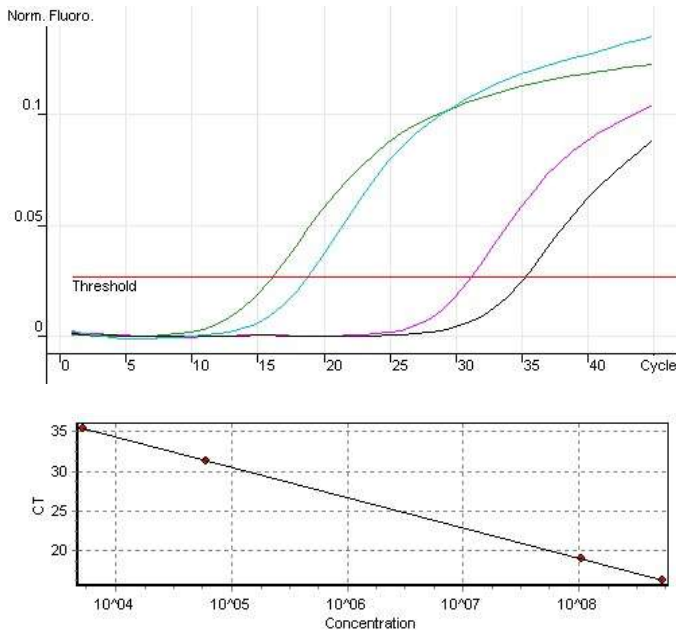


No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
A1	Red	tonsill	Unknown	39.78		372.614420692777	
A2	Yellow	blod	Unknown	38.66		730.854997652737	
A3	Blue	peribronchial lymph n	Unknown				
A4	Purple	mesenteric lymph n	Unknown				
A5	Pink	lunga	Unknown				
A6	Light Blue	lever	Unknown	30.91		78201.8739710227	
A7	Teal	njure	Unknown	37.81		1224.3727131444	

No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
A8	Red	mjälte	Unknown				

Fig. 6. PriProET PCR resultat av prov från kulingar utan symptom av PMWS

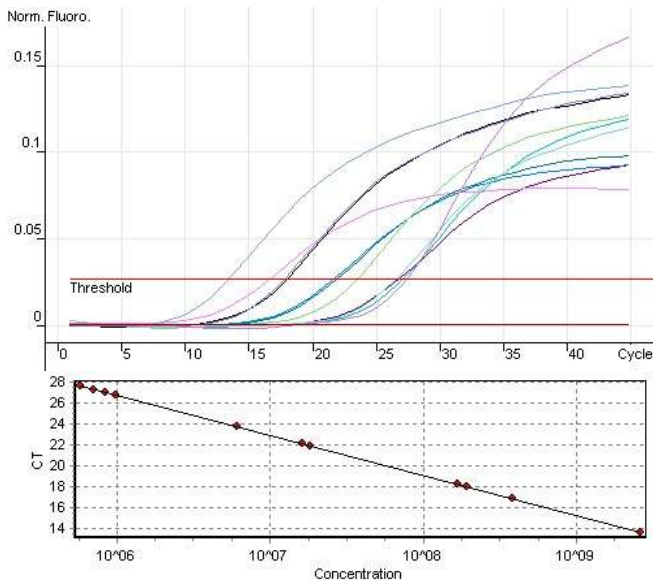
En vuxen gris som uppvisande symptom på Porcine Dermatitis and Nephritis syndrome (PDNS) undersöktes också. Profilen över PCV2-mängden liknade den som kulingarna med starka PMWS-symptom uppvisade. Detta kan antyda att den virala distributionen orsakar olika kliniska förlopp vid olika åldrar, men PDNS är en mycket ovanlig sjukdom även om den relateras till PCV2. Möjligen bidrar immunkomplex som uppstår till sjukdomsutvecklingen (Fig. 7).



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
B1	Green	lymph n	Unknown	16.27		525874473.651121	
B2	Magenta	lunga	Unknown	31.33		60443.7725856874	
B3	Black	njure	Unknown	35.41		5198.83918294064	
B4	Cyan	mjälte	Unknown	18.96		104334841.242444	

Fig. 7. PriProET PCR resultat vid PDNS

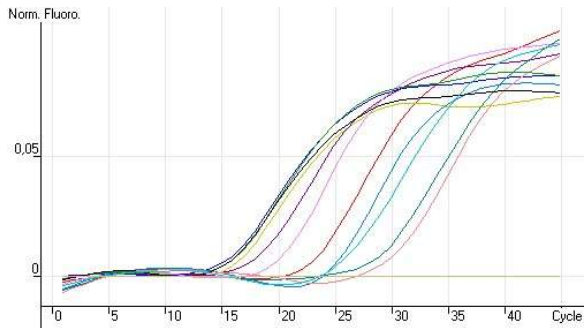
I nästa steg undersöktes arkiverade ungerska prover från grisar med kliniskt PMWS.. Realtids PCRen visade på en hög virus mängd hos dessa djur vilket styrker teorierna om på PCV-2s roll ived utvecklingen av PMWS (Fig. 8).



No.	Colour	Name	Type	Ct	Given Conc (Copies)	Calc Conc (Copies)	% Var
A4		Unknown	Unknown	26.97		836877.009647343	
A5		Unknown	Unknown	16.80		382383287.230381	
A6		Unknown	Unknown	21.85		18276278.5480154	
A7		Unknown	Unknown	22.06		16110033.944535	
B3		Unknown	Unknown	18.19		165837242.163049	
B4		Unknown	Unknown	27.26		703027.568097913	
B6		Unknown	Unknown	23.67		6123923.01536458	
B7		Unknown	Unknown	26.72		971937.894196099	
B8		Unknown	Unknown	13.62		2596441540.55427	
C1		Unknown	Unknown	17.95		191204411.087366	
C2		Unknown	Unknown	27.59		577829.834945712	
C4		Unknown	NTC				

Fig. 8. PriProET PCR resultat av arkiverade Ungerska PMWS fall

Nya prover från svenska PMWS utbrott testades också med PriProET PCR. Resultaten konfirmerade att detta test även kan detektera virus i formalinfixerade, paraffin inbäddade prover. (fig. 9.)

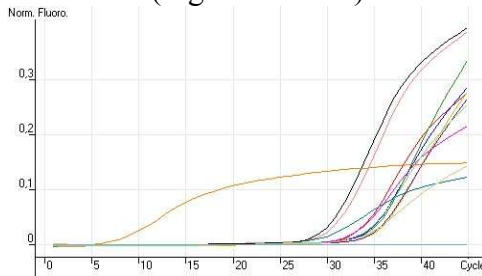


No.	Colour	Name	Type	result
1	Red	p573/05	Unknown	+
2	Yellow	p568/05	Unknown	+
3	Blue	p572/05	Unknown	+
4	Purple	p571/05	Unknown	+
5	Pink	p575/05	Unknown	+
6	Light Blue	p574/05	Unknown	+

No.	Colour	Name	Type	result
7	Teal	824/02a	Unknown	+
8	Light Red	p463/05	Unknown	+
9	Green	p570/05	Unknown	+
11	Black	p569/05	Unknown	+
12	Cyan	ston 1e4	Positive Control	+
13	Gold	NTC	NTC	-

Fig. 9. PriProET PCR resultat av nyare svenska PMWS fall

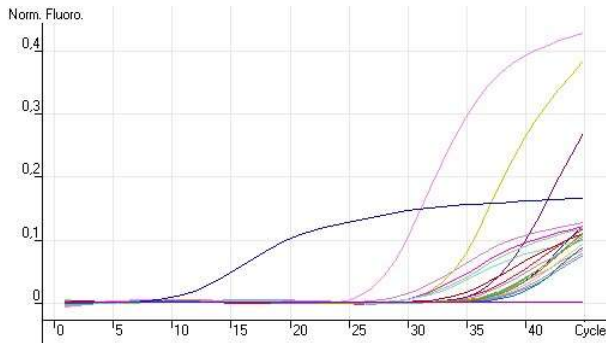
Arkiverade svenska formalinfixerade, paraffin inbäddade lungprover testades också. Dessa resultat bekräftar att viruset fanns närvarande i svenska grisar så tidigt som i mitten av 80-talet (Fig. 10a & 10b).



No.	Colour	Name	Type	result
A1	Red	1447/85	Unknown	+
A2	Yellow	966/85	Unknown	+
A3	Blue	195/85x	Unknown	+
A4	Purple	1390/87	Unknown	+
A7	Teal	236/86	Unknown	+
A8	Light Red	128/86	Unknown	+

B1	Green	1447/85	Unknown	+
B2	Pink	1851/85x	Unknown	+
B3	Black	2706/87	Unknown	+
B5	Gold	904/86	Unknown	+
B6	Light Green	1034/86	Unknown	+
B7	Orange	Ung. tons.	Positive Control	+
B8	Blue	neg	NTC	-

Fig. 10a. PriProET PCR av arkiverade svenska formalinfixerade, paraffin inbäddade lungprover 1



No. Colour Name Type

1	Red	841/87	Unknown	+
2	Yellow	531/87	Unknown	-
3	Blue	1105/87	Unknown	-
4	Purple	1083/87	Unknown	-
5	Pink	605/87	Unknown	-
6	Light Blue	1318/87	Unknown	+
7	Teal	1228/87	Unknown	+
8	Light Red	768/87	Unknown	+
9	Green	69/87	Unknown	+
10	Magenta	769/87	Unknown	+
11	Black	2260/87	Unknown	+
12	Cyan	507/87	Unknown	+
13	Olive	131/87	Unknown	+

14	Light Green	3283/87	Unknown	+
15	Light Cyan	3323/87	Unknown	-
16	Light Blue	987/87	Unknown	+
17	Light Purple	3029/87	Unknown	+
18	Light Magenta	799/87	Unknown	+
19	Light Pink	1577/87	Unknown	+
20	Dark Red	2340/87	Unknown	+
21	Dark Olive	510/87	Unknown	+
22	Dark Green	1095/87	Unknown	-
23	Dark Cyan	906/87	Unknown	+
24	Dark Blue	28/87	Unknown	-
25	Dark Purple	stoon orf 1 10x	Unknown	+
26	Dark Magenta	vatten	Unknown	-

Fig. 10b. Fig. 10a. PriProET PCR av arkiverade svenska fomalinfixerade, paraffin inbäddade lungprover 2

Denna PCV-2 PriProET PCR har också framgångsrikt används ett flertal gånger för virus kvantifikation i organ och blodprover tagna från djur under PCV-2 utmaning (resultat visas ej)

Referenser

Allan, G. M., McNeilly, F., Meehan, B. M., Kennedy, S., Mackie, D. P., Ellis, J. A., Clark, E. G., Espuna, E., Saubi, N., Riera, P., Botner, A., Charreyre, C. E., 1999. Isolation and characterization of circoviruses from pigs with wasting syndromes in Spain, Denmark, and Northern Ireland. *Vet. Microbiol.* 66: 115-123.

Brunborg, I. M., Moldal, T., Jonassen, C. M., 2004. Quantitation of porcine circovirus type 2 isolated from serum/plasma and tissue samples of healthy pigs and pigs with postweaning multisystemic wasting syndrome using TaqMan-based real-time PCR. *J. Virol. Methods*, accepted for publication.

Kim, J., Chae, C., 2001. Optimized protocols for the detection of porcine circovirus 2 DNA from formalin-fixed paraffin-embedded tissues using nested polymerase chain

reaction and comparison of nested PCR with in situ hybridization. *J. Virol. Methods* 92: 105-111.

Kim, J., Han, D. U., Choi, C., Chae, C., 2001. Differentiation of porcine circovirus (PCV)-1 and PCV-2 in boar semen using a multiplex nested polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods* 98: 25-31.

Ladekjaer-Mikkelsen, A. S., Nielsen, J., Stadejek, T., Storgaard, T., Krakowka, S., Ellis, J., McNeilly, F., Allan, G., Botner, A., 2002. Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in immunostimulated and non-immunostimulated 3-week-old piglets experimentally infected with porcine circovirus type 2 (PCV2). *Vet. Microbiol.* 89: 97-114.

Larochelle, R., Morin, M., Antaya, M., Magar, R., 1999. Identification and incidence of porcine circovirus in routine field cases in Quebec as determined by PCR. *Vet. Rec.* 145: 140-142.

Mankertz, A., Domingo, M., Folch, J. M., LeCann, P., Jestin, A., Seagles, J., Chmielewicz, B., Plana-Duran, J., Soike, D., 2000. Characterisation of PCV-2 isolates from Spain, Germany and France. *Virus Res.* 66: 65-77.

Olvera, A., Sibila, M., Calsamiglia, M., Segales, J., Domingo, M., 2004. Comparison of porcine circovirus type 2 load in serum quantified by a real time PCR in postweaning multisystemic wasting syndrome and porcine dermatitis and nephropathy syndrome naturally infected pigs. *J. Virol. Methods* 117: 75-80.

Rasmussen, T. B., Uttenthal, A., Stricker, K., Belák, S., Storgaard, T., 2003. Development of a novel quantitative real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of all serotypes of Foot-and-mouth disease virus. *Arch. Virol.* 148: 2005-2021.

Rovira, A., Balasch, M., Seagles, J., Garcia, L., Plana-Duran, J., Rosell, C., Ellerbrok, H., Mankertz, A., Domingo, M., 2002. Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2. *J. Virol.* 76: 3232-3239.

West, K. H., Bystrom, J. M., Wojnarowicz, C., Shantz, N., Jacobson, M., Allan, G. M., Haines, D. M., Clark, E. G., Krakowka, S., McNeilly, F., Konoby, C., Martin, K., Ellis, J. A., 1999. Myocarditis and abortion associated with intrauterine infection of sows with porcine circovirus 2. *Vet Diagn. Invest.* 11: 530-532.