

Backgrund

Syftet

Det huvudsakliga syftet med projektet var att utveckla en ny, snabb och sensitiv molekylär metod för direkt detektion av bovina coronavirus (BCoV) i Sverige, samt genetisk karaktärisering av enteriska och respiratoriska BCoV stammar från svenska nötkreatur.

Sjukdomen

BCV rapporterades för första gången under tidigt sjuttital och är nu ansett som den främsta orsaken till diarré hos nötkreatur. Viruset ger upphov till avsevärda ekonomiska förluster världen över. BCV replikerar i tarm och luftvägar och orsakar diarré och/eller luftvägsinfektion hos seronegativa djur i alla åldrar. Vuxna kor har visats kunna bli kroniska smittbärare (Clark, 1993). Morbiditeten är vanligen hög, medan mortaliteten är låg i en drabbad besättning. De kliniska symtomen hos ett djur infekterat med BCV kan inte skiljas från de orsakade av bovin rotavirus-infektion. BCV har i upprepade studier detekterats från svenska nötkreatur och satts i samband med allvarliga sjukdomsproblem hos olika grupper av djur i Sverige (Alenius et al., 1991; Tråven et al., 1998; Tråven, 2000).

Viruset

Bovint coronavirus tillhör grupp II i familjen Coronaviridae, tillsammans med human coronavirus OC43, murine hepatitis virus (MHV), porcine hemagglutinating encephalomyelitis virus (PHEV) och rat coronavirus (RCV). Även om det bara finns en enda serotyp av BCV (Clark 1993), är antigena skillnader bland BCV-stammar ofta beskrivna (Benfield, Saif, 1990; Michaud, Dea, 1993; Tsunemitsu, Saif, 1995). Grupp II coronavirus har en unik genomuppsättning. Ett karaktärsdrag för dessa virus är närvaron av en gen som kodar för proteinet hemagglutininesteras (HE). Denna gen finns inte hos virus i grupp I och III (Vlasak et al., 2002). HE-genen är konserverad mellan olika stammar av BCV.

Material och Metoder

Kliniska prover

Totalt 117 prover från nötkreatur från olika delar av Sverige analyserades med nested och TaqMan real-tids PCR. Även prover från vävnad infekterad med avian infectious bronchitis virus (IBV), feline coronavirus (FCoV), murine hepatitis virus (MHV) och rat coronavirus (RCV) testades. Sammanlagt 43 respiratoriska och enteriska BCoV-isolat från svenska och danska djur med respiratorisk sjukdom och/eller diarré användes för fylogenetiska studier (Tabell 1.)

RNA extraherades från cell-kultur, nässvabbar, lunga och träck med TRI REAGENT LS extraktions-kit (Sigma) enligt tillverkarens instruktioner.

cDNA syntes

En blandning av 5 µl RNA, 1 µl av random hexamers (Pharmacia) och 5 µl av DMPC vatten denaturerades vid 65°C i 10 min och kylades sedan på is. Blandningen för reverse transcription innehöll 4.5 µl av DMPC vatten, 5 µl av 5x First Strand buffer (Invitrogen), 2.5 µl av 2 mM dNTP mix (Amersham Biosciences), 32U av RNAGuard (Amersham Biosciences) och 200 U

av Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Invitrogen). Blandningens totala volym var 25 µl. Reverse transcription utfördes vid 37°C i 90 min, följt av inaktivering av enzymet vid 95°C i 5 min.

Nested och real-tids PCR.

Oligonukleotid primers och probe för BCoV nested och real-tids PCR designades från den publicerade sekvensen av HE genen från en stam kallad "Quebec" (GeneBank accession Nr. AF239307) med hjälp av mjukvaran Primer Express (Applied Biosystems, USA). Sekvenserna för nested PCR primers var som följer: PCR 1, yttre forward primer: ACT GAA ACC ATT ACC ACT GGT TTT G, yttre reverse primer: GCA TCA TGC AGC CTA GTA CCA TT; PCR 2, inre forward primer: AAC TGT TCC TAC KAA AGC AAT CTG T, inre reverse primer: TGA CCG CRA CAC CCA AAA. Den förutsedda storleken för produkten i PCR 1 var 560 bp och för produkten i PCR 2, 407 bp.

Sekvenserna primers och probe för TaqMan real-tids PCR var (5'-3'): BCoV-HE-226F, ATT ACA CAG GCG AAG GTC AAC A (forward), BCoV-HE-384R, CAA GCC TTT ATT CTG CAT CCA A (reverse), BCoV-HE-317, CGC CTT ATC ATG CCT TTA AAT GC (probe). Proben märktes med en 6-carboxytetra-methylrodamine (TAMRA) fluorophore i 5'-ändan och en BHQ quencher i 3'-ändan (BHQ, Biosearch Technologies, Novato, CA, USA). Den förutsedda storleken för produkten var 119 bp. Amplifikation och detektion utfördes i ABI PRISM 7700 sequence detection system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Varje reaktion innehöll 25 µl 2 µl RNA, 0.3 µM forward primer, 0.9 µM reverse primer, 0.4 µM probe, 0.5 mM 4X dNTPs, 2.5 mM Mn(AOAc)₂, 2.5 U/µl av rTth polymerase (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 5X EZ buffer, 1 mg/ml of BSA och DMPC-vatten. Den termodynamiska profilen var: 42°C i 5 min (data collected), 60°C i 30 min (RT) och 95°C i 30 sek (initial denaturation), följt av 40 amplifikations-cykler: 94°C i 30 sek, 50°C i 30 sek (data dokumenteras) och 72°C i 45 sek. Realtids PCR analysen optimerades med spädningsserier av primers, probes och mangan. Tiofaldiga spädningsserier av RNA analyserades dessutom (fem analyser av varje spädning), för att på så sätt generera en standardkurva och räkna ut analysens effektivitet. Effektiviteten kalkylerades med hjälp av formeln $E=10^{(-1/a)}-1$, där E är effektiviteten och a är lutningen på standardkurvan. Analysens sensitivitet var vidare jämförd med nested PCR och virusisolering genom analyser av tiofaldiga spädningsserier av BCoV i cellkultur.

Primers och PCR amplifikation av S genen

Publicerade primer-sekvenser användes för amplifiering och sekvensanalys av en region av S-genen i BCoVs genom (Hasoksuz et al., 2002). Den analyserade regionen innehöll ett 624-nukleotiders fragment mellan nukleotid 23 656 till 24 279 (aminosyra, as, nr. 6 to 213 inom S genen) av BCoV stammen Mebus (GenBank nr: U00735). Denna region innehåller två av tre kluster där gensekvensen varierar betydligt mellan stammar. Blandingen för reaktionen innehöll 24 µl sterilt avjoniserat vatten, 5 µl av 10x PCR buffer, 1 µl av 10 mM dNTP mix, 5 µl av 1 mg/ml BSA, 1.5 µl av varje primer (10 µM), 5 µl av 25 mM MgCl₂, 1U av Taq DNA polymerase (AmpliTaq, Perkin-Elmer) och 5 µl av cDNA. Två droppar mineralolja täckte lösningen för att hindra avdunstning. Den termodynamiska profilen initierades med denaturering av cDNA vid 94°C i 2 min, följt av 35 cykler med denaturering vid 94°C i 45 sek, annealing vid 50°C i 60 sek, extension vid 72°C i 90 sek och slutlig extension vid 72°C i 7 min.

Sekvensanalyser och fylogenetiska studier

Det 624-bp långa fragmentet av S-genen sekvenserades. Automatisk sekvensering utfördes på en ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, USA). Sekvenser analyserades med multipla program av Lasergene package (DNASTAR v5.0.3, Madison, WI, USA). Ett PAUP program (version 4.0b10 för Macintosh; Swofford, 1998) användes för att generera ett fylogenetiskt träd.

Resultat

En nested reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) har utvecklats under det första året av studien. Genom att använda nested RT-PCR, med två primerpar i två oberoende amplifikationer, erhöles en mycket hög sensitivitet och specificitet. Dessa primers designades utifrån den konserverade HE-genen. Specificitets- och sensitivitets-studier har visat en lyckad applicering av metoden för detektion av nukleinsyror i kliniska prover från olika delar av Sverige och Danmark. Utförandet av testen, samt den termodynamiska profilen i PCR-reaktionen optimerades under det att BCV-positiva prover analyserades. Testens sensitivitet bevisades i spädningsserier av positiva prover. PCR 1 detekterar virus i ett prov spätt tiotusen gånger och PCR 2 - tio miljoner gånger. Detta kunde visas genom erhållandet av starka band i agarosgel.

Eftersom två oberoende ampifikations-rundor med olika primerpar inkluderas är nested PCR en mycket känslig metod. För RNA virus kräver testen dock transkription till cDNA, termocykling, gel-elektrofores och fotografering. Den totala tidsåtgången för denna process är omkring sju timmar. För att korta tiden för processning av prover utvecklade vi under det andra året av projektet en TaqMan Realtids PCR för detektion av BCoV. Fördelarna med denna metod är a) resultat kan erhållas inom tre timmar; b) testen inkluderar reverse-transcription till cDNA, ett separat sådant steg behöver således inte göras; c) testen kräver inget steg av gel-elektrofores eller fotografering; d) risken för kors-kontamination mellan prover är drastiskt minskad genom användandet av slutna provrör. Dessa fördelar gör TaqMan Realtids PCR överlägsen nested PCR. TaqMan-analysen kommer lätt att kunna appliceras i kliniska laboratorier.

Totalt analyserades 117 prover från olika delar av Sverige. BCV detekterades i 40 av dessa prover. De positiva proverna sparades för nukleotidsekvensering och fylogenetiska analyser på gennivå. Olika representanter ur familjen *Coronaviridae* analyserades för att mäta testens specificitet. Avian infectious bronchitis virus (IBV), feline coronavirus (FCoV), murine hepatitis virus (MHV) och rat coronavirus (RCV), testades. Primerparen amplifierade inte någon av dessa heterologa virus och visade sig därigenom vara specifika för BCoV.

PCR resultat från kliniska utbrott av BCV har jämförts med ELISA resultat, avseende antikroppar för viruset, från samma djur. Testerna stämde väl överens; virusutsöndring påvisades i högre grad och under längre period hos djur som tidigare inte stött på viruset. Dessa data säkrar tillförlitligheten för PCR metoden.

Optimering av TaqMan PCR har utförts och resultaten har visat att real-tids PCR metoden är sensitiv och specifik (Fig. 1 och 2). BCoV Realtids PCR analysens effektivitet beräknades till

105%. Gränsen för detektion visade sig vara samma som för nested PCR (10^{-5} spädning) och 10^3 gånger högre än virusisolering VI (10^{-2} spädning). I en del fall hade dock nested PCR en högre känslighet än realtids PCR vid analys av kliniska prover, speciellt träck.

Phylogenetiska studier

Nukleotidsekvenser baserade på HE-genen från BCoV isolat insamlade från utbrott i Sverige och Danmark jämfördes. Resultaten från dessa analyser avslöjade inga signifikanta skillnader mellan olika stammar. Eftersom HE-genen är den mest konserverade delen av coronavirusets genom passar denna del mycket bra för diagnostiskt syfte, men sämre när det gäller att jämföra släktskap mellan stammar. Därför beslutade vi att studera fylogenetiska släktskap baserade på den mer varierande S-genen i BCOVs genom.

Ett fylogenetiskt träd konstruerades med 1000 bootstrapping-replikationer, baserat på sekvenser amplifierade från S-genen. De svenska och danska isolaten föll i två subgrupper. Grupp I innehöll sekvenser från alla svenska och åtta danska besättningar och grupp II från fem danska besättningar (Fig. 3). Grupp I delades in i två subgrupper (Ia and Ib). De respiratoriska (LSU 94LSS 0512, and OK 0514 3) och enteriska (Quebec BCQ.1523, and Quebec BCQ. 7373) refsstammarna formade två separata kluster enligt de kliniska symtomen, men en enteriska prototypstammen Mebus separerades från dessa kluster.

Discussion

Den konventionella laboratoriediagnostiken för detektion av BCoV baseras på olika metoder, såsom virusisolering, elektronmikroskopi, antigen/antikropps ELISA, immunofluorescens och PCR. Den känsligaste metoden är nested PCR, därför denna analys inkluderar två amplifieringsrundor med två distinkta uppsättningar av primers, vilket drastiskt ökar sensitiviteten. Även om BCoV nested PCR är effektiv i de flesta fall så är det dess praktiska användbarhet komplicerad och tidskrävande. Detta beror delvis på att post-PCR analyser måste utföras. Den andra amplifieringsrundan försenar resultaten, ökar risken för korskontamination och komplicerar automatisering. Fem steg krävs för slutliga resultat: reverse transcription, två amplifieringsrundor, gel electrofores and fotografering.

BCoV realtids PCR analysen som utvecklats i vårt laboratorium har många fördelar jämfört med BCoV nested PCR. Realtids PCR ger en möjlighet att objektiva kvantifiera virusmängden i ett prov. Genom att använda enzymet rTth DNA Polymerase, som kan verka både som ett termoaktivt reverse transcriptase och ett termostabilt DNA polymeras, kan RT och PCR utföras i samma behållare. Detta förkortar analystider och minskar risken för korskontamination.

Våra fynd indikerar att TaqMan-baserad realtids PCR erbjuder snabb och specifik detektion av BCoV. När det gäller träckprover kan analysen fungera effektivt när rätt spädning av provet analyseras. En utspädning av träckprover minskar koncentrationen av inhibitoriska substanser, vilka kan interferera med analysen. I fall med tveksamma resultat bör nested PCR användas för konfirmering av diagnosen.

Baserat på fylogenetiska analyser undersökte vi den spatiala distributionen av virus. Troligtvis initierades infektionen i en given besättning på en given tidpunkt av ett dominant virus som fortsatte att cirkulera i besättningen under ett utbrott. Liknande fynd har gjorts för

bovint virusdiarré virus (Vilcek et al., 1999) och bovint syncytialt virus (Larsen et al., 2000; Valarcher et al., 2000), men det epideimologiska infektionsmönstret för BCoV har, enligt vår vetenskap, inte tidigare dokumenterats.

Med avsikt att undersöka om virus kan överleva i miljön från år till år eller om nya utbrott orsakas av nyintroduktion av virus samlades provmaterial från en besättning (R) in under en 4,5-års period. Som visas i Fig. 3, hamnade virus från besättning R i två subgrupper: det tidigaste isolatet från 1999 (Rc1N-99) i subgrupp Ib och de övriga i subgrupp Ia. Detta indikerade att virus var nyintroducerat i besättning R. Denna nyintroduktion kan förklaras med det faktum att kalvar samlades från ett stort antal besättningar och hölls under mindre än ett år i ett "all in-all out" system. En annan möjlighet är introduktion via indirekta smittvägar, såsom via människor, gnagare eller fåglar.

Baserad på studier av S-genen, virus från Sverige och Danmark visade en stor genetisk likhet (> 95.7%). Jämförelser av gensekvenser indikerade att ett dominant virus fortsatte cirkulera i besättningen åtminstone åtta dagar och att samma virus kan utsöndras simultant via luftvägar och tarm. Utbrott i fyra danska besättningar var antagligen orsakade av virus transmission i flera steg. BCoV utbrott i Danmark under våren 2003 involverade minst två virusstammar. Dessa data visar att jämförande nukleotidsekvensanalys är ett användbart instrument att utröna BCOVs epidemiologi.

Referenser

- Alenius S, Niskanen R, Juntti N and B Larsson. 1991. Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: Serological evidence. *Acta Vet Scand.* 32:163-170.
- Benfield, D. A., and L. J. Saif. 1990. Cell culture propagation of a coronavirus isolated from cows with winter dysentery. *J Clin Microbiol* 28:1454-7.
- Clark MA. 1993. Bovine Coronavirus. *Br Vet J.* 149(1):51-69.
- Larsen, L. E., K. Tjornehoj, and B. Viuff. 2000. Extensive sequence divergence among bovine respiratory syncytial viruses isolated during recurrent outbreaks in closed herds. *J. Clin. Microbiol.* 38:4222-4227.
- Michaud, L., and S. Dea. 1993. Characterization of monoclonal antibodies to bovine enteric coronavirus and antigenic variability among Quebec isolates. *Arch Virol* 131:455-65
- Reynolds, D.J., Debney, T.G., Hall, G.A., Thomas, L.H. Parsons, K.R. 1985. Studies on the relationship between coronaviruses from the intestinal and respiratory tracts of calves. *Arch Virol* 85, 71-83.
- Swofford, D. 1998. PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods), Version 4.0. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tråven M, Björnerot L and B Larsson. 1998. Nation-wide survey of antibodies to bovine coronavirus in Swedish dairy herd bulk milk. *Vet Rec.* 144:527-529.
- Tsunemitsu, H., and L. J. Saif. 1995. Antigenic and biological comparisons of bovine coronaviruses derived from neonatal calf diarrhea and winter dysentery of adult cattle. *Arch Virol* 140:1303-11.
- Tråven M. 2000. Winter dysentery caused by bovine coronavirus: No rule without exception. Ph.D. Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.
- Vilcek, S., S. Alenius, D. J. Paton, C. Mittelholzer, and S. Belák. 1999. Genetic clustering of bovine viral diarrhoea viruses in cattle farms: genetic identification and analysis of viruses directly from cattle sera. *Vet. J.* 158:33-38.

Vlasak R., Rinninger A., Wurzer W., et al. 2002. The sialate-4-O-acetylsterases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus – a proposal to recognize Group 2 Coronaviridae. 6th International Congress of Veterinary Virology, 24-27th August 2003, St. Malo, France, p. 93-94.

Valarcher, J. F., F. Schelcher, and H. Bourhy. 2000. Evolution of bovine respiratory syncytial virus. *J. Virol.* 74:10714-10728.

Publicationer

Resultat från BCoV nested and real-time PCR presenterades på the 6th International Congress of Veterinary Virology in Saint Malo, France i Augusti 2003:

Hakhverdyan M, Willman S, Thorén P, Larsen L-E, Alenius S, Belák S. (2003). Detection of bovine respiratory syncytial virus and bovine coronavirus using multiplex real-time PCR. 6th International Congress of Veterinary Virology, 24-27th August 2003, St. Malo, France, p. 60.

Ett manuskript med titeln “Molecular epidemiology of Bovine Coronavirus based on comparative analyses of the S gene” skickades till *Journal of Clinical Microbiology* i September 2005.

Liu L., Hägglund S., Hakhverdyan M., Alenius S., Larsen L-E., Belák S. “Molecular epidemiology of Bovine Coronavirus based on comparative analyses of the S gene”. *J Clin Microbiol.* Submitted.

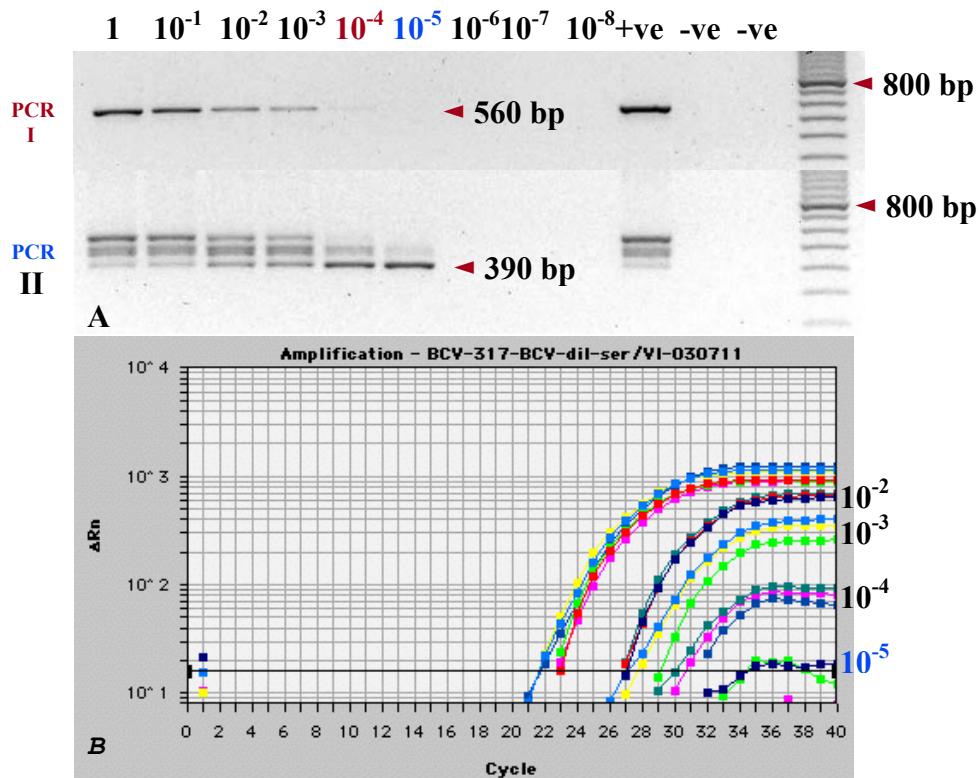


Fig. 1. BCoV nested (A) och realtids (B) PCR. Sensitivitets test genom tiofaldiga spädningsserier av virus. Detektionsnivån hos den första amplifikations rundan för nested PCR (PCR I) var 10⁻⁴ och för den andra rundan (PCR II) 10⁻⁵. Detektionsnivån för BCoV TaqMan realtids PCR var 10⁻⁵.

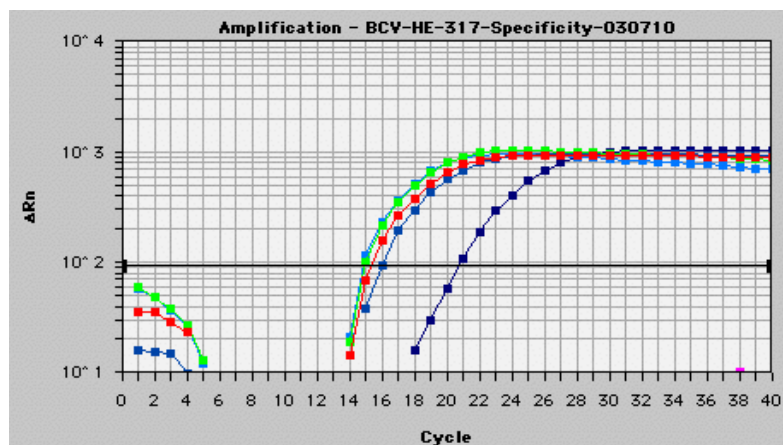


Fig. 2. Specificitets test för BCoV realtids PCR. Använda isolat härstammade från Danmark, Skottland, Sverige, Storbritannien och USA.

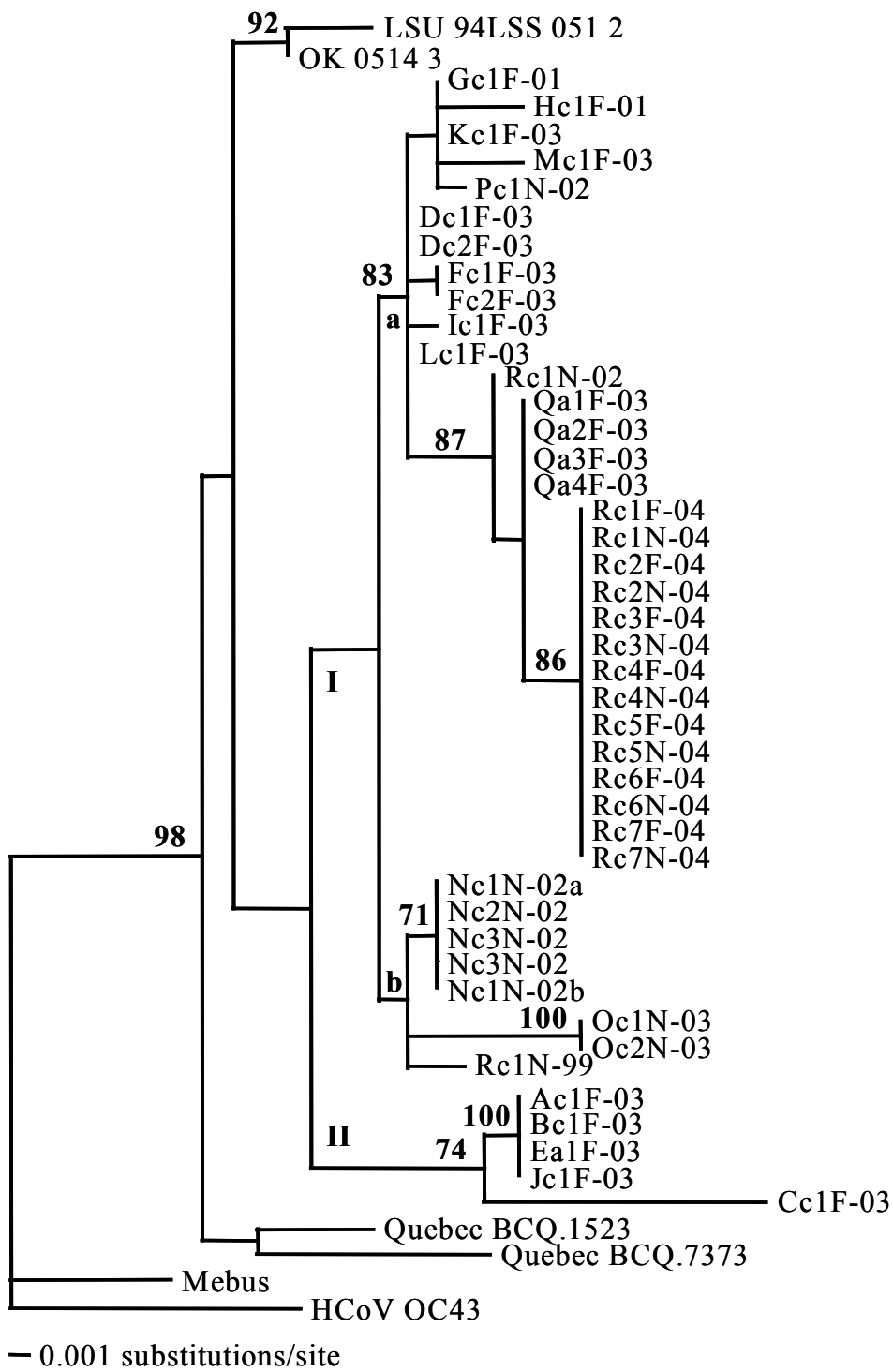


Fig. 3. Fylogenetiskt träd baserat på S genen i BCoVs genom.

Tabell 1. Lista över BCoV positiva prover från Sverige och Danmark.

Besättning	Land	Ålder	Djur nr.	Provtyp	Datum (yyyy-mm-dd)	Benämning
A	Danmark	kalv	1	Träck	2003-03-25	Ac1F-03
B	Danmark	kalv	1	Träck	2003-04-15	Bc1F-03
C	Danmark	kalv	1	Träck	2003-04-23	Cc1F-03
D	Danmark	kalv	1	Träck	2003-04-01	Dc1F-03
		kalv	2	Träck	2003-04-01	Dc2F-03
E	Danmark	vuxen	1	Träck	2003-04-23	Ea1F-03
F	Danmark	kalv	1	Träck	2003-04-23	Fc1F-03
		kalv	2	Träck	2003-04-23	Fc2F-03
G	Danmark	kalv	1	Träck	2001-09-19	Gc1F-01
H	Danmark	kalv	1	Träck	2001-10-24	Hc1F-01
I	Danmark	kalv	1	Träck	2003-05-09	Ic1F-03
J	Danmark	kalv	1	Träck	2003-05-12	Jc1F-03
K	Danmark	kalv	1	Träck	2003-05-15	Kc1F-03
L	Danmark	kalv	1	Träck	2003-03-05	Lc1F-03
M	Danmark	kalv	1	Träck	2003-05-22	Mc1F-03
N	Sverige	kalv	1	Nässvabb	2002-02-22	Nc1N-02a
		kalv	2	Nässvabb	2002-02-19	Nc2N-02
		kalv	3	Nässvabb	2002-02-27	Nc3N-02
		kalv	4	Nässvabb	2002-02-19	Nc4N-02
		kalv	1	Nässvabb	2002-02-27	Nc1N-02b
O	Sverige	kalv	1	Nässvabb	2003-11-13	Oc1N-03
		kalv	2	Nässvabb	2003-11-13	Oc2N-03
P	Sverige	kalv	1	Nässvabb	2002-06-15	Pc1N-02
Q	Sverige	vuxen	1	Träck	2003-03-21	Qa1F-03
		vuxen	2	Träck	2003-03-21	Qa2F-03
		vuxen	3	Träck	2003-03-21	Qa3F-03
		vuxen	4	Träck	2003-03-21	Qa4F-03
R	Sverige	kalv	1	Nässvabb	1999-10-26	Rc1N-99
		kalv	1	Nässvabb	2002-10-09	Rc1N-02
		kalv	1	Nässvabb	2004-02-09	Rc1N-04
				Träck	2004-02-09	Rc1F-04
		kalv	2	Nässvabb	2004-02-09	Rc2N-04
				Träck	2004-02-09	Rc2F-04
		kalv	3	Nässvabb	2004-02-09	Rc3N-04
				Träck	2004-02-09	Rc3F-04
		kalv	4	Nässvabb	2004-02-09	Rc4N-04
				Träck	2004-02-09	Rc4F-04
		kalv	5	Nässvabb	2004-02-09	Rc5N-04
				Träck	2004-02-09	Rc5F-04
		kalv	6	Nässvabb	2004-02-09	Rc6N-04
		Träck	2004-02-09	Rc6F-04		
kalv	7	Nässvabb	2004-02-09	Rc7N-04		
		Träck	2004-02-09	Rc7F-04		