

Utveckling av multiplex realtids PCR metod för detektion av kalvdiarrévirus hos nöt

Bakgrund

Diarré hos nötkreatur är ett av de viktigaste sjukdomskomplexen i industrialiserade länder, inklusive Sverige. Sjukdomen orsakar förluster under kött djursuppfödning såväl som under uppfödning av mjölkkraskalvar i konventionella och ekologiska besättningar. Det föreligger ett behov av snabba och känsliga metoder för detektion av etiologiska agens, för möjlighet till utformning och applicering av profylaktiska åtgärder.

Många infektiösa agens har associerats med diarré sjukdom hos nötkreatur och flera agens hittas ofta i kombination. Virus såsom bovint corona virus (BCoV), bovint adenovirus (BAdV) och bovint viralt diarré virus (BVDV) är involverade under svenska förhållanden. De kan i vissa fall ensamma orsaka fatal sjukdom, men anses oftare predisponera för sekundära bakteriella infektioner, vilka försvårar sjukdomsförloppet. BCoV detekteras även vid utbrott av vinterdysenteri på vuxna nötkreatur. 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 BCoV (Clark 1993), är antigena skillnader bland BCoV-stammar ofta beskrivna. 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. HE-genen är konserverad mellan olika stammar av BCoV.

För närvarande är BAdV klassifierad i två olika genera: *Mastadenovirus* med BAdV typ 1, 2, 3, 9, 10 och den nyligen fastställda *Atadenovirus* med BAdV typ 4, 5, 6, 7 och 8 (Virus Taxonomy, 2000). Dessutom föreligger stora variationer i nukleotidsekvenser mellan olika BAdV i *Mastadenovirus* genus (Dan et al., 2001; Benko, Harrach, 2003). BAdV typ 2 är nära besläktat med ovina adenovirus (OAdV) typ 2 och 5 (Ovina A mastadenovirus), BAdV-9 tillhör Humana C mastadenovirus och BAdV-1 och 3 grupperas under bovina A och B Mastadenovirus. BAdV-10 är mycket avlägset genetiskt besläktat med de tidigare kända BAdV och utgör ensam bovint C Mastadenovirus.

BVDV är ett pestivirus som tillsammans med klassisk svinpest virus (CSFV) och border disease virus (BDV) tillhör familjen Flavivirus. BVDV är ett virus med stor ekonomisk

betydelse. Baserat på genetiska egenskaper kan BVDV klassificeras i två separata genotyper (Fulton and Burge, 2001; Avalos-Ramirez et al., 2001).

Målet med detta projekt var att utveckla en snabb och känslig real-tids PCR för direkt detektion av virus involverade i diarré hos svenska nötkreatur.

Material och metoder

Prover samlades in från kalvar och vuxna nötkreatur i svenska besättningar med och utan sjukdomsutbrott. För att utvärdera den analytiska specificiteten hos testen inkluderades även BCoV, BAdV och BVDV från Sverige, Danmark, Nederländerna, Storbritannien, Ungern och USA. BCoV-proverna utgjordes av cellkultur, nössvabbar och träck, BVDV av cellkultur och sperma och BAdV endast av cellkultur. Sekvensdata för realtids-system design samlades in från GenBank med hjälp av NCBI Blast och bearbetades i Lasergene 2005 mjukvara (DNASTAR, v.5.03). BCoV och BVDV RNA extraherades från 250 µl provmaterial (cellkultur, nässvabb, och homogeniserad träck) med TRI REAGENT LS (Sigma) enligt tillverkarens instruktioner. I endel fall användes Genovision M48 extraction robot med MagAttract Virus Mini M48 kit (Qiagen). BAdV DNA extraherades från 250 µl cellkultur using Phenol-Chloroform-Isoamil Alcohol (Sigma) enligt tillverkarens instruktioner. Primers och TaqMan probes valdes ut med hjälp av Primer Express 1.0 mjukvara (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Baserat på konserverade regioner av hemagglutininesteras genen (HE) i BCoVs genom, hexongen i BAdVs genom och 5'UTR av BVDVs genom, valdes primers och TaqMan probes. Alla primers syntetiserades av Cybergreen (Huddinge, Sweden) och proberna av Biosearch Technologies (Novato, CA, USA).

Amplifikation och detektion av viralt RNA/DNA genomfördes på ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) eller RotorGene3000 (Corbett Research, Australia). En tiofaldig spädningsserie av positiva RNA/DNA templates användes för att generera en standardkurva och beräkna PCR analysernas effektivitet (E), genom formeln $E=10^{(-1/a)}-1$, där a är kurvans lutningsvärde.

Resultat och Diskussion

BCoV, BAdV and BVDV TaqMan realtids PCR utvecklades och optimerades. Optimeringen inkluderade primers, probe, MgCl₂, primers (annealing) fästtemperatur samt sensitivitet och specificitets tester.

Sensitiviteten utvärderades genom jämförelser av tiofaldiga spädningsserier av virus. Detektionsgränsen för BCoV real-time PCR var 10⁻⁵ (Fig. 1) och PCR effektiviteten var 95% (data ej redovisade). Sensitiviteten för realtids PCR analysen var 10³ högre än för virus isolering och på samma nivå som för nested PCR när cellkulturer testades. Fem BCoV isolat från Danmark, Skottland, Sverige, Storbritannien och USA amplifierades korrekt i specificitets tester (Fig. 2). Olika representanter ur familjen Coronaviridae analyserades dessutom. 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 (data ej redovisade). BCoV prover, nossvabbar och speciellt träck innehåller inhiberande substanser som ofta hämmar PCR och påverkar känsligheten. För att undvika hämmande processer är det nödvändigt att späda originalprovet. Enligt våra data skall nossvabbar spädas 1:10 och träck 1:25 för att detektera BCoV nukleinsyror.

BAdV TaqMan real-time PCR för *Atadenovirus* typer (BAdV 4-8) optimerades och testades. Detektionsgränsen var 10⁻⁷ när BAdV-8 cellkulturer testades (Fig. 3) och PCR effektiviteten var 95% (Fig. 4). I den optimerade PCR analysen detekterades alla BAdV typer 4-8 (Fig. 5A) och PCR produkten hade en korrekt storlek när den visualiserades i en 2% agarose gel (Fig. 5B). Eftersom primers och probe designades för att detektera en konserverad del av hexongenomen i BAdVs genom kunde samma TaqMan-system användas för detektion av Mastadenovirus (BAdV typer 1-3, 9 och 10). Efter vidare optimering av PCR analysen (fästtemperaturen höjdes till 55°C, och MgCl₂ koncentrationen minskades till 3 mM) kunde två av tre Mastadenovirus typer amplifieras (BAdV 1 och 10), utan att specificiteten för *Atadenovirus* typer (BAdV 4-8) gick förlorad (Fig. 6).

Vi kommer att optimera BAdV real-time PCR analysen för att dessutom detektera BAdV 2, 3 och 9 i genus *Mastadenovirus*. Det finns två sätt att utföra denna uppgift. En av dem är att justera fäst-temperaturen (T_a) genom att använda "touch-down" PCR. Med denna metod minskas T_a med 1°C varannan PCR cykel till ett "touch-down" T_a, vilket därefter används under

ca 10 cykler. Idén med detta är att varje skillnad i smälttemperatur mellan korrekt och inkorrekt annealing (infästning) ger en 2-faldig skillnad i produktmängd per cykel (4-faldig per grad C). Därefter är det möjligt att optimera till de värden som ger korrekta produkter. Ett ytterligare sätt är att optimera $MgCl_2$ koncentrationen. Dessa optimeringar kan i kombination leda till detektion av alla tio BAdV typer i en och samma reaktion. Om ovanstående justeringar inte hjälper kommer en ny TaqMan real-time PCR analys att utvecklas för BAdV 2, 3 och 9 typer. Denna kommer att användas antingen i en duplex PCR eller i en särskild master mix, med samma termodynamiska profil, i en single PCR.

En pan-pestivirus TaqMan realtids PCR har utvecklats i vårt laboratorium, vilken detekterar alla tre typer i genus *Pestivirus* (BVDV, CSVF, BDV). Analysen optimerades genom att använda en liknande procedur som för den som beskrivits ovan. Pan-pestivirus realtids PCR analysen detekterar men differentierar ej de båda genotyperna av BVDV (Fig. 7).

Sammanfattningsvis utvecklades tre TaqMan realtids PCR analyser – BCoV, BAdV och BVDV. För närvarande används alla tre system separat. Vi ser inga problem att använda BVDV och BCoV realtids PCR parallellt, med samma termodynamiska profil och två reaktions mixer. Ett separat protokoll måste användas för att amplifiera BAdV nukleinsyror eftersom det är ett DNA virus. Dessa nya diagnostiska analyser kommer att främja en ökad förståelse för BCoV, BAV och BVDV i den svenska nötkreaturs- populationen. Genom ökad kunskap kan djurhälsan förbättras och ekonomiska förluster minskas.

Referenser

- Avalos-Ramirez, R., Orlich, M., Theil, H.-J., Becher, P., 2001. Evidence for the presence of two novel pestivirus species. *Virology* 286: 456-465.
- Benko, M., Harrach, B., 2003. "Molecular evolution of adenoviruses." *Curr Top Microbiol Immunol* 272: 3-35.
- Clark, M.A., 1993. Bovine coronavirus. *Br Vet J* 149: 51-70
- Dan, A., Elo, P., Harrazs, B., Zadori, Z., Benkö, M., 2001. "Four new inverted terminal repeat sequences from bovine adenoviruses reveal striking differences in the length and content of the ITRs. *Virus Genes* 22: 175-179.
- Fulton, R.W., Burge, L.J., 2001. BVDV types 1 and 2 antibody response in calves receiving modified live virus or inactivated vaccines. *Vaccine* 19: 264-274.
- Virus Taxonomy, 2000. The Classification and Nomenclature of Viruses. The Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Virus Taxonomy. San Diego, Academic Press.

Appendix

Figurer och Figur texter

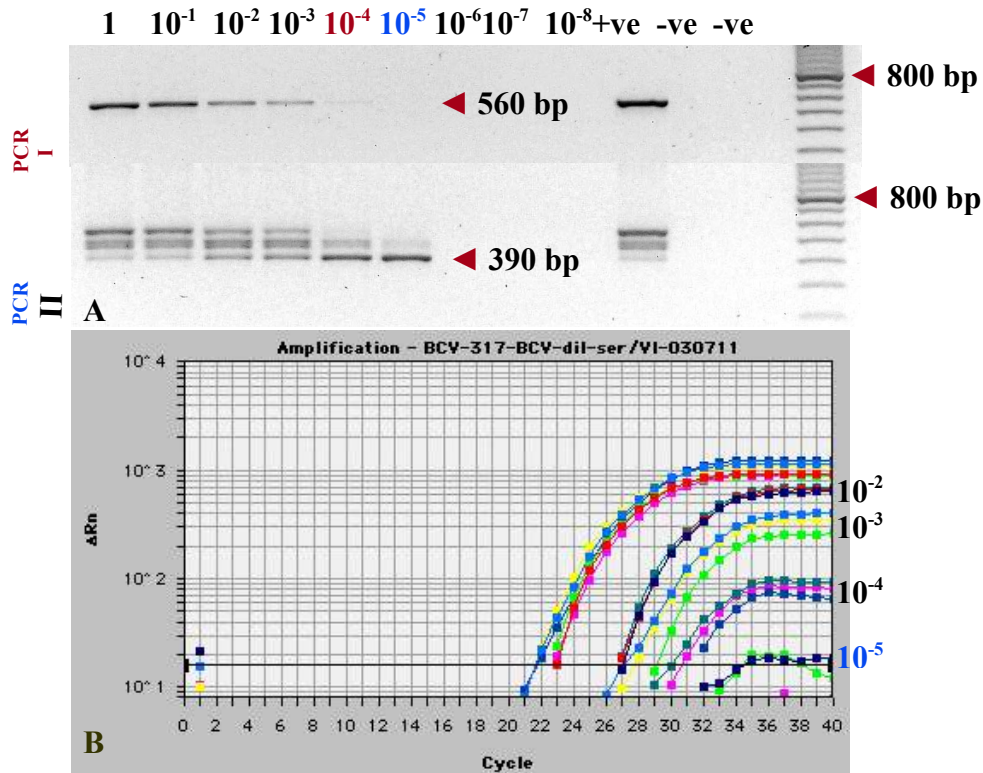


Figure 1. BCoV nested (A) och realtids (B) PCR. Sensitivitets test genom tiofaldiga spädningsserier av virus. Detektionsnivån hos den första amplifikationsrundan för nested PCR (PCR I) var 10⁻⁴ och för den andra rundan (PCR II) 10⁻⁵. Detektionsnivån för BCoV TaqMan realtids PCR var 10⁻⁵.

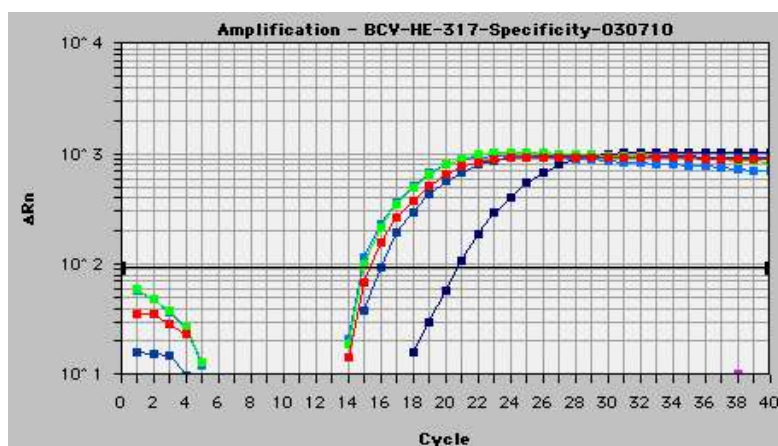


Figure 2. Specificitets test för BCoV realtids PCR. Använda isolat härstammade från Danmark, Skottland, Sverige, Storbritannien och USA.

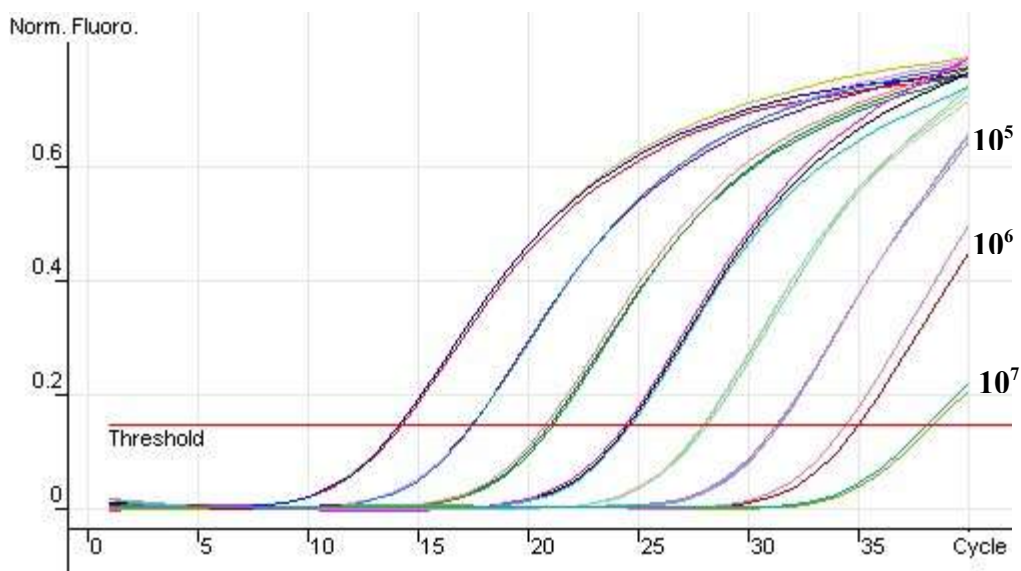


Figure 3. Decimala spädningsserier av BAdV-8, från ospädd prov till spädning 10^{-9} . Tre replikat av varje spädning. Detektionsgränsen är spädning 10^{-7} .

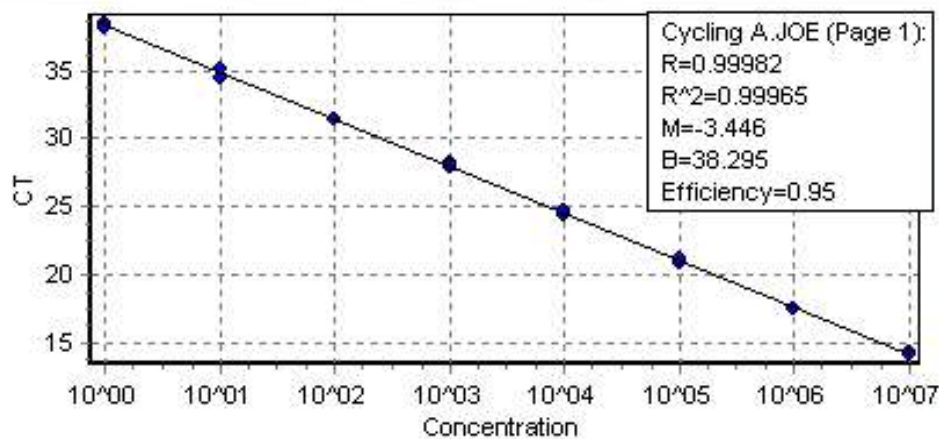


Figure 4. BAdV standard kurva, baserat på en 10-faldig spädningsserie av BAdV-8. R^2 – korrelation koefficient; M – lutning, E – PCR amplifikations effektivitet, vilken är 95%.

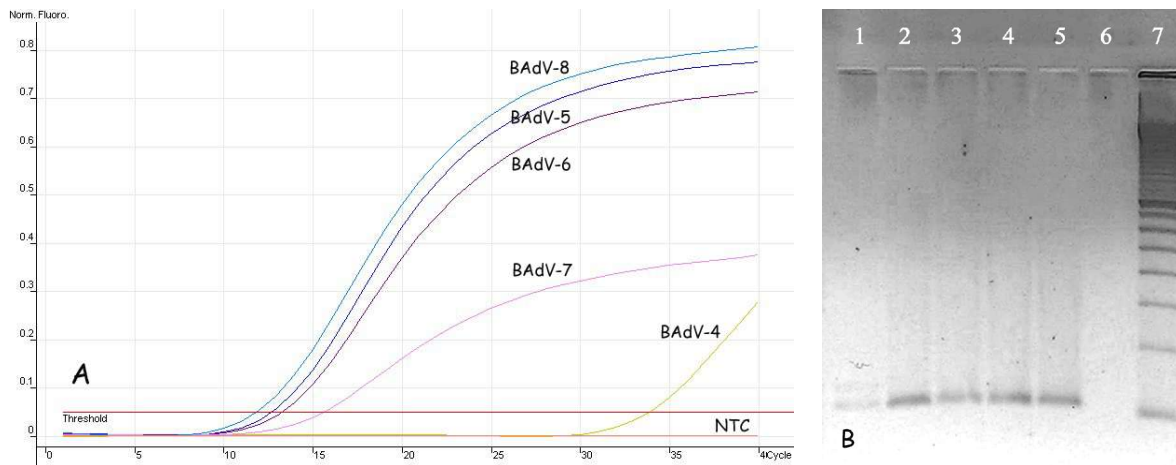


Figure 5. A. Realtids PCR av BAdV Atadenovirus. Alla BAdV typer detekterades efter PCR optimering. NTC är en negativ kontroll som stannar under tröskelvärde. **B.** Produkten av realtids PCR envisas på gelen, nummer 1-5 motsvarar BAdV typ 4-8, nummer 6 är den negativa kontrollen. Den förväntade produktstorleken är 106 bp.

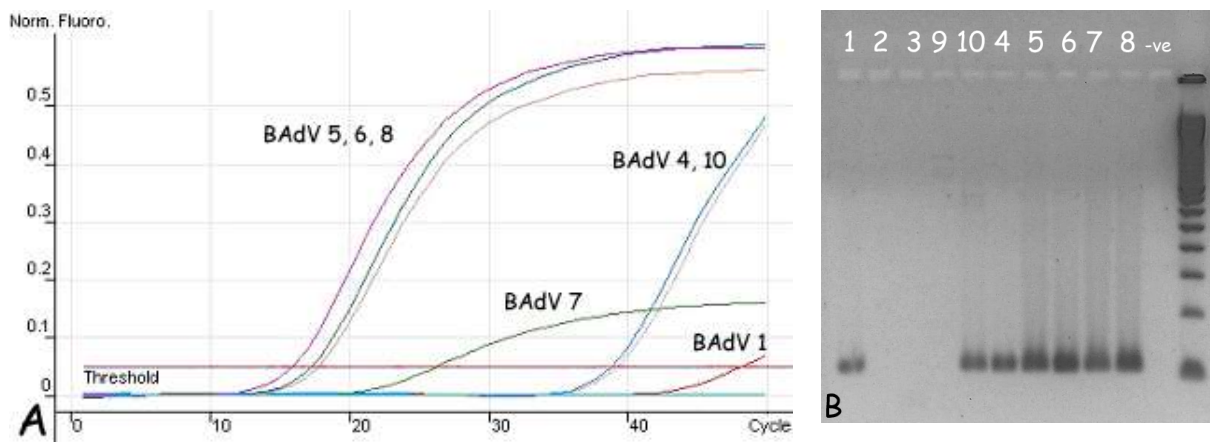


Figure 6. A. Realtids PCR av BAdV Mastadenovirus och Atadenovirus typer efter ytterligare PCR optimeringar. Alla BAdV typer förutom BAdV 2, 3 och 9 amplifierades. Den negativa kontrollen stannade under tröskelvärde. **B.** PCR produkterna visas på en 2% agarosgel. Nummerna på gelen motsvarar BAdV typerna 1-10; "-ve" är en negativ kontroll (vatten). Den förväntade produktstorleken är 106 bp.

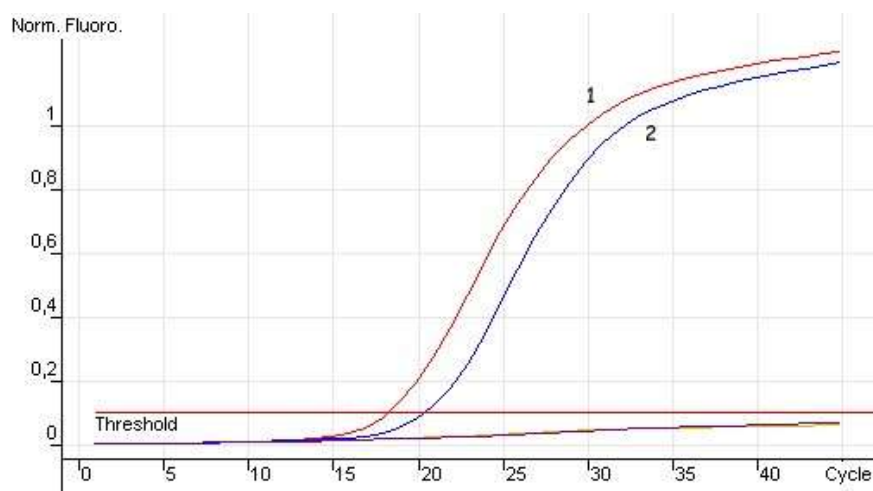


Figure 7. Pan-pestivirus TaqMan realtids PCR analys vilken kan detektera CSFV, BVDV och BDV. Endast amplifikation av BVDV positiva prover visas. Nr 1 är ett BVDV positivt serumprov och Nr 2 är en BVDV PCR positiv kontroll. Den negativa kontrollen ligger kvar under threshold.