

# **Retrospektiv studie av porcint circovirus typ 2 och postweaning multisystemic wasting syndrome i Sverige**

av

**Maria Hermansson**

**Handledare: Caroline Fossum**

**Institution: MBV, avdelningen för immunologi och virologi**

**Biträdande handledare: Mikael Berg**

**Institution: BVF, avdelningen för parasitologi och virologi**

**Biträdande handledare: Sandor Belák**

**Institution: BVF, avdelningen för parasitologi och virologi**

**Sveriges Lantbruksuniversitet  
Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

**Examensarbete 2005:23  
ISSN:1652-8697  
Uppsala 2005**



## INNEHÅLLSFÖRTECKNING

|                                                                                   |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| SUMMARY .....                                                                     | 4  |
| INLEDNING .....                                                                   | 5  |
| Bakgrund.....                                                                     | 6  |
| Differentialdiagnoser.....                                                        | 7  |
| Syfte.....                                                                        | 7  |
| MATERIAL OCH METODER .....                                                        | 8  |
| Undersökt material .....                                                          | 8  |
| Immunohistokemisk färgning och DNA preparation.....                               | 8  |
| PCR .....                                                                         | 9  |
| Sekvensanalys .....                                                               | 10 |
| RESULTAT .....                                                                    | 10 |
| PCV2 isolat strax före PMWS utbrottet liknar de isolerade från sjuka grisar ..... | 10 |
| Sekvensbestämning av isolat från 2002 och 2003 .....                              | 11 |
| PCV2 DNA ej påvisat i material från svenska grisar 1985-1987 .....                | 12 |
| DISKUSSION.....                                                                   | 12 |
| LITTERATURFÖRTECKNING.....                                                        | 13 |

## SUMMARY

Porcine circovirus type 2 (PCV2) is a common virus present in most parts of the world. PCV2 has been pointed out as the major causative agent to post weaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) that affects pigs after weaning. The clinical symptoms of PMWS are impaired growth, diarrhoea, respiratory problems and increased mortality. At autopsy enlarged lymph nodes with depletion of lymphocytes are commonly found.

Since 1991 PMWS has spread all over the world and was first described among Swedish pigs in 2003. Although PCV2 is widespread, only some pigs develop PCV2-related diseases. Why this is and what other factors that are required in order for the disease to develop is yet unknown. The main theories involve other infections, for example PRRS, and management issues but also genetic differences between pigs and/or virus strains have been suggested. The PCV2 virus genome has four open reading frames (ORF), ORF1 and ORF2 are connected by two short introns. ORF1 codes for proteins involved in virus replication whereas ORF 2 codes for the capsid protein that most antibodies are directed to. Today the nature of the proteins coded for by ORF 3 and 4 are unknown. Consequently, most studies of genomic differences between various PCV2 isolates from different years and parts of the world have focused on ORF2.

A serological survey in Sweden revealed that more than 90% of Swedish pigs have antibodies to PCV2. It was also demonstrated that pigs in a SPF-herd seroconverted to PCV2 during 1993, possibly via introduction of contaminated semen. Pigs in this herd are still healthy (<0,1% mortality) although PCV2 isolated from a pig in this herd repeatedly has caused PMWS when used in experimental infection studies.

The purpose of the present study was partly to find out if PCV2 has been present in Swedish pig farms prior to 1993 and, if so, how similar older PCV2 isolates are to virus recently isolated from diseased pigs. In particular, isolates from the years just prior to the outbreak of PMWS in Sweden are being studied.

The archived material analysed comprise formalin fixed and paraffin embedded tissue from 15 pigs, primarily lymphoid tissue. Three samples originated from 2001, 2002 and 2003, the rest of the samples were from the years 1985-87. All samples were analysed for presence of PCV2 by immunohistochemical labelling. Selected samples were deparaffinized and DNA was extracted and processed by end-point PCR in order to detect PCV2. Samples from 1985-87 were also tested for PCV2 by real-time PCR.

PCV2 was found in the samples from 2002 and 2003 but not in older samples. Sequence analyses of ORF2 revealed a great similarity between the isolates from 2002 and 1993 whereas the isolate from 2003 was more closely related to PCV2 isolated from Swedish pigs with PMWS. These preliminary results warrant extended analyses of PCV2 isolated from diseased and non-diseased Swedish pigs, raised in various management systems.

## INLEDNING

Porcint circovirus typ 2 (PCV2) tillhör familjen *circoviridae*, och är ett icke höljeförsett virus med ett cirkulärt, enkelsträngat DNA genom på 1768 nukleotider. Circovirus hör till de minsta virus man känner till hos ryggradsdjur. Till familjen finns även besläktade virus som till exempel porcint circovirus typ 1, som till skillnad från PCV2 är ickepatogent. Men även andra arter har circovirus som är mer eller mindre besläktade med PCV2. Hos fjäderfä finns till exempel ett circovirus, ”chicken anemia virus”(CAV), som kopplas till blåvingesjukan. Även där är andra faktorer som till exempel stress involverade i sjukdomsutbrotten, men genom att vaccinera mot CAV kan man förhindra att fåglar insjuknar i blåvingesjukan. Ett annat besläktat circovirus orsakar ”Psittacine beak and feather disease” hos papegojfåglar som ger förlust av fjädrar samt deformation av näbb och klor. Det porcina circovirusets genom har fyra öppna läsramar (ORF) och mellan ORF1 och ORF2 finns två korta introner. ORF 1 kodar för två proteiner som är involverade i replikation av viruset, ORF2 kodar för det huvudsakliga kapsidproteinet som de flesta antikroppar är riktade emot. ORF 3 och ORF 4 kodar för proteiner med okänd funktion (Fenaux, M et al, 2002; Murphy, A.F. et al, 1999; Sanchez, R.E. Jr et al, 2001).

PCV2 har pekats ut som en av de viktigaste faktorerna bakom sjukdomen postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) som framför allt drabbar smågrisar strax efter avvänjningen. PMWS ger nedsatt tillväxt, diarré, förstörade lymfknotor, luftvägsproblem och ökad dödlighet. Histologiskt ser man minskade antal lymfocyter samt infiltration av multinukleära jätteceller i lymfoid vävnad.

PCV2 är dock allmänt förekommande hos alla grisar och därför är anledningen till att vissa grisar och gårdar får problem med PMWS och andra inte oklar. Vilka andra faktorer, förutom PCV2 infektionen, som styr sjukdomsutbrotten är ännu inte klarlagt. Miljöaspekter och förekomst av andra infektionsämnen vilka höjer det allmänna smittrycket i besättningen, t.ex. PRRS, hör till de dominerande teorierna (Fenaux, M et al, 2002; Murphy, A.F. et al, 1999; Sanchez, R.E. Jr et al, 2001).

PMWS beskrevs första gången 1991 i Kanada och har sedan dess spridit sig över större delen av världen. PCV2 förekommer även hos ca 90 % av svenska grisar och har funnits i Sverige sedan länge utan att ge upphov till PMWS. Redan 1993 upptäcktes antikroppar mot PCV2 i en besättning med SPF-grisar, troligtvis smittade via infekterad sperma (Wattrang, E. et al, 2002). SPF-besättningen är fortfarande frisk (< 0,1% dödlighet) trots att virusisolatet visats orsaka PMWS i en rad experimentella infektionsstudier (Allan, G. et al, 2003; Hasslung, F. et al, i press). I Sverige har under 2003 de första fallen av PMWS diagnosticerats, hittills har ett 15-tal besättningar anmälts. Geografiskt är de spridda i södra och mellersta Sverige och det finns inga klara anknytningar mellan dem. Den stora frågan är naturligtvis varför detta inträffar nu? Standarden i svenska grisstallar har successivt blivit bättre och smittrycket lägre allteftersom byggnader, läkemedel och vaccin utvecklas. Eftersom PCV2 funnits i Sverige i flera år, borde vi då inte ha haft vårt första fall av PMWS långt tidigare? Under 80-talet, efter att antibiotikainblandning förbjöds och tagits bort ur grisfodret 1986, ökade smågrisdödligheten markant i Sverige. En del av de beskrivna symptomen liknar många av de symptom som i dag beskrivs för PMWS. Denna studies syfte var därför att analysera förekomsten av PCV2 i utvalt historiskt material.

## **Bakgrund**

Trots att Sverige har haft PCV2 i svinbesättningarna sedan åtminstone 1993, har den allvarliga sjukdomen PMWS aldrig påträffats i svenska grisar, förrän för ca ett år sedan. Det virus som isolerades 1993 har dock visats vara patogent i experimentella infektioner. Däremot verkar det inte vara patogent, dvs. orsaka PMWS under naturliga förhållanden. Det virus som isolerades vid förra höstens utbrott tycks vid en preliminär analys dock skilja sig från de tidigare isolaten. Det kan vara en indikation på att viruset förändrat sig och blivit mer patogent. Ännu så länge finns dock inga belägg för ett sådant påstående. Även internationellt har man försökt särskilja specifikt patogena från icke-patogena isolat av PCV2 utan att lyckas. Det kan tyda på att andra faktorer är viktiga för utvecklingen av PMWS (Larochelle, R. et al, 2003).

Vid sekvensering jämförs sekvensen på nukleotid och aminosyranivå hos PCV2 isolat från olika år, länder och besättningar. Som "mall" används oftast det första PCV2 isolatet som hittades hos PMWS-grisar i Saskatoon, Kanada 1991 (Stoon). Det är framför allt den del av viruset som benämns ORF2 som analyseras. Den delen av genomet är särskilt intressant då huvuddelen av de förändringar som viruset genomgår sker här. Om man kan hitta någon del av virussekvensen som bara finns i de virus som hittats hos sjuka djur och inte i de virus som hittats hos friska bärare av virus, skulle det kunna innebära att vissa virus är mer virulenta och då orsakar sjukdom. Ännu har dock inget sådant område hittats i genomet hos de PCV2 isolat som undersökts.

Eftersom alla grisar med PCV2 inte utvecklar PMWS finns det olika teorier om vilken "faktor x" som kan orsaka utbrott av PMWS. Andra virusinfektioner t ex PRRS, PPV, influensa liksom bakteriella infektioner i kombination med olika skötselfaktorer är de huvudsakliga teorierna. Bland skötselfaktorerna koncentrerar man sig främst på avvänjningsålder, djurtäthet, tomtid, rengöring och råmjölk. Man har sett i Sverige att de besättningar som drabbats av PMWS är de som haft låg avvänjningsålder på en del kullar, eftersatta grisar kvar och blandat de med nyinsatta grisar i besättningen, intensiva system med lite tomtid och tid för rengöring, överbeläggning och omgrupperingar (Stampe, M., 2004).

Kriterierna för att diagnosen PMWS ska ställas är kliniska symtom, typiska patologiska och histopatologiska förändringar samt påvisandet av PCV2 i skadad vävnad. Symtomen är ökad smågrisdödlighet och fler eftersatta smågrisar efter avvänjning på besättningsnivå, blöt och bubblande hosta, magra och bleka grisar, diarré och förstorade lymfknutor. Drabbade djur är 7-16 veckor gamla och svarar inte på antibiotikabehandling. Patologi/histopatologi visar dåligt näringstillstånd, förstorade lymfknutor, mjälte och njurar, icke kollaberade lungor, interstitiell pneumoni, ikterus och blödningar. Histologiska förändringar förekommer framför allt i lymfatisk vävnad och karaktäriseras av histiocytär-granulomatös inflammation med multinukleära jätteceller, samt avsaknad av lymfocyter som ofta ersatts av makrofager. Nekrotiserande granulomatösa förändringar påvisas ofta i lungor, tarm, njurar, lever, (CNS, hjärta, pankreas). Intracytoplasmatiska inklusionskroppar förekommer i makrofager. Med immunohistokemisk färgning baserad på mono- eller polyklonala antikroppar kan virusantigen detekteras i infekterade celler, oftast ses PCV2 nukleinsyra eller antigen i cytoplasman hos histiocytära celler, jätteceller eller alveolära celler.

För att en besättning ska anses drabbad av PMWS ska den ha ett ökat antal grisar med PMWS-symtom, signifikant ökad dödlighet samt individuell diagnos av PMWS på ett flertal grisar (Rodriguez-Arrioja, G.M. et al, 2003; Rovira, A. et al, 2002).

PMWS-drabbade besättningar i Sverige har en sammanlagd siffra på dödlighet och ”pellegrisar” på 7,2 %. Det är internationellt sett lågt, t ex i Danmark ligger siffran för enbart dödlighet på 11 %. Men den normala dödligheten i Sverige från avvänjningen till förmedling är 2,5 %. Det är fortfarande bara ett fåtal drabbade besättningar i Sverige. Från mitten av november 2004 var 14 besättningar konstaterade med PMWS och 12 besättningar under utredning, 15 besättningar var friförklarade efter utredning. Antibiotika fungerar som tidigare nämnts inte mot PMWS och det finns heller inga vaccin kommersiellt tillgängliga idag. Man har visat experimentellt att PMWS är en smittsam sjukdom genom att blanda sjuka djur från fyra olika besättningar (i separata grupper) med friska djur från andra besättningar, de friska djuren utvecklade då PMWS (Hassing, A.-G., 2004).

## **Differentialdiagnoser**

Sjukdomar som kan förväxlas med PMWS är framför allt de som ger diarré och/eller luftvägsproblem samt nedsatt tillväxt bland grisar efter avvänjningen. En av de främsta differentialdiagnoserna är PPE (porcine proliferativ enteropati) som orsakas av *Lawsonia intracellularis* och ger smågrisar med nedsatt tillväxt och diarré. Grisar med PPE svarar dock på antibiotikabehandling. Spiroketal diarré (porcine colonic spirochaetosis, PCS), är en annan möjlig differentialdiagnos. Sjukdomen som orsakas av *Brachyspira pilosicoli* ger eftersatta smågrisar samt grisar med cementliknande, slemmig diarré. Grisar med PCS svarar dock på antibiotika. *Actinobacillus pleuropneumonie* är en differentialdiagnos främst vad gäller den perakuta/akuta formen som orsakas av serotyp 2 och 3. De serotyperna ger avmagring, hosta och dyspné samt sekundärinfekteras ofta. Även dessa grisar svarar på behandling med antibiotika. Enzootisk Pneumonie (SEP) som orsakas av *Mycoplasma hyopneumonie* är ytterligare en differentialdiagnos i sin akuta form. Infektionen ger hosta och diarré, vid sekundära infektioner får grisarna påverkat allmäntillstånd, dyspné och ojämn tillväxt. Grisar med SEP behandlas även de med antibiotika (Löfstedt, M. G., 2004).

## **Syfte**

Syftet med denna studie är dels att undersöka den eventuella förekomsten av PCV2 i Sverige redan 1985, -86 och -87. Om vi hittar PCV2 i material från dessa år skall virusets genom sekvensbestämmas och jämföras med dagens isolat och därav hoppas vi kunna få ytterligare information om virusets utveckling. Dessutom skall isolat strax före utbrottet av PMWS i Sverige jämföras med isolat från själva utbrottet. Sammantaget kan detta ge viktig information om dagens virus ser annorlunda ut från tidigare år och det kan kanske ge en förklaring till PMWS-utbrottet i år. Med andra ord om en mer patogen variant har utvecklats. Om inte så är det ytterligare en signal om att andra faktorer spelar en stor roll i uppkomsten av PMWS.

# MATERIAL OCH METODER

## *Undersökt material*

Formalinfixerad och paraffinbäddad vävnad från grisar med misstänkta symtom som skickats till SVA och från obduktioner som genomförts finns bevarat på SVA. Detta material undersöktes med avseende på histologiska förändringar överensstämmande med PMWS samt förekomst av PCV2 med immunohistokemi och PCR. Vävnaden var främst från lymfknutor, lever och mjälte, i några fall från lunga, hjärna eller jejunum, från totalt 15 grisar. Alla med en anamnes som överensstämde med PMWS. Tre av vävnadsproverna var från 2001, -02 respektive -03, resterande prover var från 1985-87 (Tabell 1). Två negativa kontroller testades också, dessa kom från nöt. Urvalsprocessen baserades till största delen på grisarnas ålder, 1-4 månader, förekomsten av histologiska lesioner som tyder på PMWS samt på tillgången till lämplig vävnad (helst lymfoid vävnad).

Tabell 1. Antal fall som testats för förekomst av PCV2 uppdelat på respektive år

| År   | Antal fall |
|------|------------|
| 1985 | 6          |
| 1986 | 4          |
| 1987 | 2          |

## *Immunohistokemisk färgning och DNA preparation*

I ett första steg genomfördes en immunohistokemisk färgning av materialet för att försöka påvisa PCV2 samt identifiera typiska histologiska förändringar som är karakteristiska för PMWS. Vid färgningen används både monoklonala och polyklonala antikroppar mot PCV2 infärgade med ABC-metod som gör att infekterade celler får en brunfärgad cytoplasma som kan detekteras vid undersökning i mikroskop. Därefter plockades lämpliga fall ut för fortsatt undersökning. Dessa utgjordes i första hand av vävnadsprover som varit positiva immunohistokemiskt och histologiskt.

För att få fram PCV2 från materialet renas först DNA fram från vävnaden. För extraktion av DNA användes ett för ändamålet avsett kit, QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen), enligt tillverkarens instruktioner. Innan DNA renades fram deparaffiniserades vävnaden genom att preparatet lades i xylol i 2x10 minuter och därefter i etanol i 2x10 minuter. Därefter följdes protokollet som bygger på fyra olika buffertlösningar där vävnaden genomgår lysis genom tillsats av Proteinase K. Sedan extraherades DNAt, bands upp på specifika DNA bindande support och eluerades därefter (Griersson, S.S. et al, 2004; Rodriguez-Arrijoja, G.M. et al, 2003). Kvaliteten av DNAt testades genom PCR analys av interferon  $\beta$  genen. Det är en gen som ger en indikation om DNAt är av sådan kvalitet att man överhuvudtaget kan förvänta sig att hitta PCV2 om djuret varit smittat. Denna utfördes samtidigt med PCV2 PCR analysen.



## PCR

Förekomsten av PCV2 testades därefter med hjälp av PCR. Den vanligaste typen av PCR reaktion är en s.k. end-point PCR. Under reaktionen fäster primers till DNA-strängarna vid det område man valt ut så de kan kopieras, man har en forward och en reverse primer. Den PCR-produkt som blir resultatet analyseras med agarosegel-elektrofores innehållande etidiumbromid, där eventuella fynd av PCV2 åskådliggörs som band på gelen. En annan PCR-metod för att detektera t ex PCV2 är en s.k. realtids PCR, en sådan utvecklades under arbetets gång och användes till proverna från 1985-87. Realtids PCR metoden utvecklades för att dels kunna detektera mindre mängder viralt DNA samt DNA av sämre kvalitet. Real-tids PCR är en vidareutveckling på klassisk PCR, där bildandet av PCR produkten kan detekteras under amplifieringen. För detta behövs liksom tidigare två specifika primers för det man vill amplifiera samt en probe. Proben kan vara av olika typer och principer, men dom flesta baseras på att proben är inmärkt samt binder sekvensspecifikt till PCR produkten. När proben binder till PCR produkten utsänder den en fluorescerande färg. Vi använde oss av en s.k. Taqman princip där proben består av en fluorescerande färg och en "släckare" som förhindrar att fluorescensen skickas ut av proben när den ej bundit PCR produkten. När proben bundit till den nybildade PCR produkten kommer vid bildandet av en ny DNA sträng Taq polymeraset tugga sönder proben och den fluorescerande färgen kan sändas ut eftersom "släckaren" inte längre har närkontakt med "utskickaren". Fluorescenssignalen registreras av en detektor som skickar denna vidare till en dator som registrerar signalens styrka under tiden som PCR produkterna bildas, därav namnet real-tids PCR. Vid utvecklingen av en real-tids PCR för PCV2 jämfördes ett stort antal PCV2 sekvenser från databaser och konserverade regioner som förekommer hos kända isolat valdes ut. Metodens specificitet och känslighet utvärderades (Tabell 2) med hjälp av material från en experimentell infektionsstudie (Hasslung, F. et al, i press). Utvärderingen visade att den nyutvecklade real-tids PCR metoden var mycket känslig.

Tabell 2. Resultat från utvärdering av real-tids PCR för påvisande av PCV2. Prover uttagna från grisar som infekterats experimentellt med antingen ett svenskt isolat av PCV2 (S-PCV2) eller det kanadensiska isolatet från 1991 (PCV2 Stoon). Resultatet anges som antalet cykler till detektion av PCV2. I utprovnigen ingick även material från två oinfekterade grisar (mock)

| Infektionsmodell | Antal cykler |
|------------------|--------------|
| S-PCV2           | 10           |
| S-PCV2           | 15           |
| PCV2 Stoon       | 17           |
| PCV2 Stoon       | 20           |
| mock             | -            |
| mock             | -            |

Till end-point PCR blandas vävnadsDNA med en reaktionblandning bestående av vatten, PCR buffert, Taq-polymeras, MgCl<sub>2</sub> och en mix av DNA byggstenarna (dNTP). Till denna blandning tillsätts också primers, i detta fall primers till virusets två huvuddelar ORF 1 och ORF 2. Den PCR-produkt som blir resultatet analyseras med agarosegel-elektrofores där eventuella fynd av PCV2 åskådliggörs som band på gelen.

Till realtids-PCR blandas vävnads DNA med en reaktionblandning bestående av Titanium Taq buffert, dNTP mix, Texas red (probinmärkning), Titanium Taq polymeras, forward primer (FAM märkt) och reverse primer för ORF2 samt vatten. Temperaturen under reaktionen var först 95 °C i 2 minuter därefter 55 cykler med 95°C 15s, 52°C 15s, 75°C 15s.

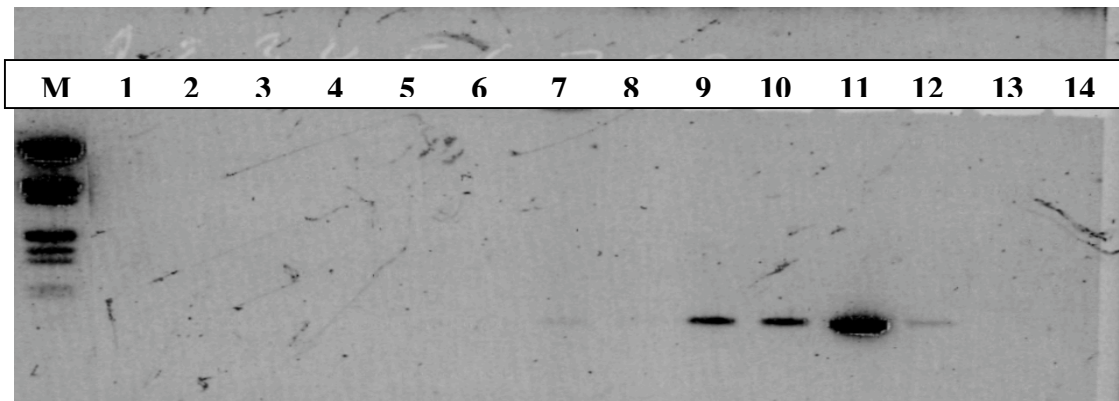
## **Sekvensanalys**

I det historiska materialet bestämdes sekvensen för ORF2 och sekvenserna jämfördes med motsvarande sekvenser från svenska grisar som utvecklade PMWS under 2004. Positiva prover från PCR och elektrofores renades innan PCV2-sekvensen bestämdes. Reningen sker med hjälp av ett kit, Jetquick Spin Column Technique – PCR Purification (Qiagen). Även detta kit bygger på ett antal buffertlösningar, här två stycken som ”tvättar” PCR-produkten. Slutligen elueras DNA i sterilt vatten. Proverna lämnades för sekvensering vid Institutionen för husdjursgenetik, SLU. Sekvensen bestämdes på nukleotidnivå och översattes till motsvarande aminosyror. Man kan med hjälp av detta jämföra olika virusisolat med varandra i en s.k. alignment där man oftast använder isolatet Stoon från 1991 som referens.

## **RESULTAT**

### ***PCV2 isolat strax före PMWS utbrottet liknar de isolerade från sjuka grisar***

Först undersöktes förekomsten av PCV2 DNA i vävnadsprover från grisar från åren strax innan utbrottet av PMWS 2003. Det var prover från 2001, 2002 och 2003. De proverna hade plockats ut från grisar som var i rätt ålder för PMWS, hade symtom som förekommer vid PMWS, var positiva vid immunohistokemisk färgning för PCV2 men saknade de typiska histopatologiska förändringar som ses vid PMWS. Det betyder att även om man konstaterar infektion med PCV2 hos dem så uppfyller de inte alla de kriterier som krävs för att klassas som PMWS. Proverna undersöktes med traditionell s.k. end-point PCR. De testades för närvaro av PCV1, PCV2 samt porcint interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ), där den senare framför allt fungerade som en markör för kvalitén på det DNA som testades. Om man ej får ett positivt utslag på IFN- $\beta$  tyder det på att det DNA man arbetar med är degraderat och chansen att hitta PCV2 är då låg även om djuret var smittat. I alla de PCR som utfördes fanns även en negativ kontroll med för varje variabel som testades. Resultatet av PCR gav att proverna från 2002 och 2003 var positiva för PCV2 samt IFN- $\beta$ . Provet från 2001 var varken positivt på PCV2 eller IFN- $\beta$ , troligtvis var grisen alltför kadaveröst förändrad när vävnadsproverna togs ut. De negativa kontrollerna var negativa (Figur 1).



Figur 1. Undersökning av PCV2 ORF2 med end-point PCR i material från år 2001, 2002 och 2003

|                       |                 |                  |
|-----------------------|-----------------|------------------|
| M: Molekylviktsmarkör | 5: ORF1 2003    | 10: ORF 2 2002   |
| 1: ORF1 2001          | 6: Neg kontroll | 11: ORF2 2003    |
| 2: ORF1 2001          | 7: ORF2 2001    | 12: Neg kontroll |
| 3: ORF1 2002          | 8: ORF2 2001    | 13: tom          |
| 4: ORF1 2003          | 9: ORF2 2002    | 14: tom          |

## Sekvensbestämning av isolat från 2002 och 2003

Sekvensbestämning av ORF2 från 2002 och 2003 och jämförelse med andra isolat visade överensstämmelser med virus som isolerats från friska grisar tidigare samt sjuka grisar från 2004, men även en del förändringar som skiljer dem åt. I figur 2 visas de aminosyror som skiljer isolaten åt med sin enbokstavsförkortning medan de aminosyror som är desamma syns som punkter. Virusisolatet från 2002 har fler likheter med virusisolat från 1993 än vad virusisolatet från 2003 har. Isolatet från 2003 har i sin tur fler likheter med isolaten från 2004. Sammantaget visar detta tydligt att de svenska isolaten från 2002 och 2003 utvecklats mot att likna de som orsakat PMWS i svenska besättningar.

```

st orf2p  MTTPRRKYRRRHRERSHLGQILPRRFLVHPRRKYSRWRKMGIFRITLRSRIFGTYTQKTTVTTPSQAAMKRRFKLIDFVPPGGGTAKI SIFPEYRRIKRWKVERWPCSPITQGR 130
aB orf2p  .....F.....&.....N.N..... 130
bB orf2p  .....F.....&.....N.N..... 130
02 orf2p  .....F.....&.....N.N..... 130
03 orf2p  .....H.....S.....&.....L.N.N.L..... 130
N1 orf2p  .....L.....I.....K.....N.N.L.....S.P.R.V..... 130
N2 orf2p  ..D.....I.....K.....N.N.L.....S.P.R.V..... 130

st orf2p  GNGSTAVILIDMFVKAT&LTYIPYNYSSRHITIPQPFYYSK&FTKPKLDSTIIRYQFQNRWRNQL&LELQTS&M&DH&LGA&F&NSKYDQ&ENI&VIM&VQFREFML&D&P&L&P 233
aB orf2p  .....E.....K.....&.....T..... 233
bB orf2p  .....E.....K.....&.....T..... 233
02 orf2p  .....N.....E.....K.V.....&.....T..... 233
03 orf2p  ...S.....T.....M.....T.....T.....L..... 233
N1 orf2p  ...S.....T.....&.....T.....I.....E..... 233
N2 orf2p  ...S.....T.....&.....T.....I.....E..... 233

```

Figur 2. Alignment av aminosyrasekvenser för olika virusisolat. Uppifrån och ned är det: Kanadensiskt isolat från 1991, det svenska isolat från 1993(dels direkt från lymfknuta samt efter upprepade passager i cellkultur), isolaten från 2002 och 2003 som isolerats i detta projekt samt slutligen två nya sjukdomsframkallande isolat från 2004.

## **PCV2 DNA ej påvisat i material från svenska grisar 1985-1987**

Vi undersökte därefter grisar från ännu tidigare årgångar. Det var prover från 1985, 1986 och 1987. De inledande immunohistokemiska färgningarna var helt negativa för alla proverna. Dessa testades sedan dels med en traditionell end-point PCR men även med realtids PCR som är betydligt känsligare än den traditionella och kan upptäcka mycket små mängder virus. Ingen av dessa undersökningar gav dock något positivt resultat för PCV2. Det var dessutom endast två av dessa prover som visade sig vara positiva för IFN $\gamma$ . Detta tyder på att DNA var i de flesta fall alltför degraderat för säker analys. De två negativa kontrollerna som utgjordes av nötprever var negativa.

## **DISKUSSION**

Sverige är fortfarande ett land som är relativt förskonat från PMWS. Få besättningar är drabbade och förlusterna i dessa drabbade besättningar är inte så alarmerande som i andra delar av världen. Troligtvis står orsaken till detta att finna i den djurhållning som vi har i Sverige. Att sjukdomen PMWS börjat dyka upp just nu kan bero på att en tuffare ekonomisk situation för svinproducenter idag har satt högre krav på effektivitet, med kortare tomtid och överbeläggning som följd. Syftet med detta projekt var att ta reda på om PCV2, som orsak till PMWS, funnits i Sverige tidigare än 2004 samt att se om man med ledning av de sekvenser som man eventuellt fick fram kunde utläsa något om PCV2:s betydelse för utvecklingen av sjukdomen PMWS.

Ett stort problem med de vävnadsprover som fanns sparade var att majoriteten av dem kom från djur som varit måttligt-kraftigt kadaveröst förändrade vid uttagandet. Detta visar sig i resultatet där 2 av 3 respektive bara 2 av 12 prover var positiva för IFN $\gamma$ . Det faktum att proverna var så gamla kan även ha haft betydelse för möjligheten att få fram fungerande DNA.

Vad man kan säga är att PCV2 fanns i Sverige 2002, detta är dock ingen överraskning eftersom man har fynd som är äldre än så. Man kan även se på sekvenserna att det skett en utveckling av viruset. Förändringarna som hade skett i genomet i virusisolatet från friska grisar 1993 återfinns även i virusisolatet från 2002. Det virusisolat som orsakade PMWS i Sverige 2004 har i sin tur vissa gemensamma förändringar i genomet med virusisolatet från 2003. Proverna från 2002 och 2003 intar därmed en mellanställning mellan 90-talet och idag. Förändringarna i genomet kan ha lett till att viruset blivit mer patogent och att det, i kombination med brister i skötseln, ligger bakom PMWS-fallen i Sverige. Det går dock inte att avgöra om så är fallet med bara virussekvenserna som underlag.

I proverna från 1985-87 hittades däremot inget virus. Om detta beror på att vävnaden var kadaveröst förändrad med DNA av dålig kvalitet eller om det inte fanns PCV2 i Sverige då är svårt att säga. Proverna var utvalda efter kriterier för att maximera chansen att de skulle vara infekterade med PCV2. Trots detta var de alla negativa på immunohistokemisk färgning samt PCR, end-point och realtid. Men för att kunna säga något säkert om förekomsten av PCV2 i Sverige under den perioden behöver mer material undersökas. Oavsett när PCV2 först dök upp i Sverige kvarstår ändå den stora frågan varför den ger sjukdom hos vissa besättningar idag.

# LITTERATURFÖRTECKNING

- Allan, G. et al, 2003: Reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome in pigs experimentally inoculated with a Swedish porcine circovirus 2 isolate, *J. Vet. Diagn. Invest.* 15, 553-560.
- Fenaux, M. et al, 2002: Cloned genomic DNA of type 2 porcine circovirus is infectious when injected directly into the liver and lymph nodes of pigs: characterization of clinical disease, virus distribution, and pathologic lesions, *J. Virol.* 2, 541-551.
- Grierson, S.S. et al, 2004: Detection and genetic typing of type 2 porcine circoviruses in archived pig tissues from the UK, *Arch. Virol.* 149, 1171-1183.
- Hassing, A.-G., 2004: PMWS in Denmark-causation, prevalence and evaluation of control measures, Veterinärmötet Uppsala 2004.
- Hasslung, F. et al, 2005: Experimental reproduction of postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) in pigs in Sweden and Denmark with a Swedish isolate of porcine circovirus type 2, *Vet. Microbiol.* I press.
- Larochelle, R., et al, 2003: Comparative serologic and virologic study of commercial swine herds with and without postweaning multisystemic wasting syndrome, *Can. J. Vet. Res.* 67, 114-120.
- Löfstedt, M.G., 2004: Differentialdiagnoser till postweaning multisystemic wasting syndrome, Veterinärmötet Uppsala 2004.
- Murphy, A.F. et al, 1999: *Veterinary Virology*, 3<sup>rd</sup> ed. Academic press.
- Rodriguez-Arriola, G.M. et al, 2003: Retrospective study on porcine circovirus type 2 infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain, *J. Vet. Med. B* 50, 99-101.
- Rovira, A. et al, 2002: Experimental inoculation of conventional pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus and porcine circovirus 2, *J. Virol.* 7, 3232-3239.
- Sanchez, R.E. Jr. et al, 2001: Porcine circovirus 2 infection in swine foetuses inoculated at different stages of gestation, *Vet. Microbiol.* 83, 169-176.
- Stampe, M., 2004: Erfarenheter av postweaning multisystemic wasting syndrome i svenska svinbesättningar, Veterinärmötet Uppsala 2004.
- Wattrang, E. et al, 2002: Exudative epidermitis and porcine circovirus-2 infection in a Swedish SPF-herd, *Vet. Microbiol.* 86, 281-293.