

# **Utvärdering av olika diagnostiska metoder för infektioner med bovint coronavirus hos nötkreatur**

**Daniel Svensson**

Handledare: Stefan Alenius  
Biträdande handledare: Sara Hägglund  
Institutionen för kliniska vetenskaper  
Avdelningen för Idisslarmedicin och Epidemiologi

Examensarbete 2005:53  
Veterinärprogrammet  
Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
SLU  
ISSN 1652-8697  
Uppsala 2005



# Innehållsförteckning

**Innehållsförteckning, 3**

**Summary, 5**

**Sammanfattning, 5**

**Tack, 5**

**Inledning, 6**

**Bovint coronavirus, 6**

Historik, 8

Vinterdysenteri, 8

*Epidemiologi, 8*

*Kliniska fynd, 8*

*Diagnos, 9*

*Profylax och behandling, 9*

Kalvdiarré, 9

*Epidemiologi, 9*

*Kliniska fynd, 9*

*Diagnos, 9*

*Profylax och behandling, 9*

**Diagnostik, 10**

PCR-teknik, 10

*Realtids-PCR 11,*

ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay), 11

Virusisolering, 12

Immunofluorescens (IF), 12

Elektronmikroskop (EM), 12

Serologi, 13

**Material och metoder, 13**

Besättning 1, 13

Besättning 2, 13

Besättning 3, 14

**Resultat, 14**

Besättning 1, 14

*PCR-körning, 14*

*ELISA, 15*

**Besättning 2, 15**

*PCR-körning, 15*

*ELISA, 15*

**Besättning 3, 15**

**Diskussion, 16**

**Literaturförteckning, 17**

## Summary

This paper shortly describes the coronavirus family, bovine corona viruses (BCV) properties and two diseases that BCV causes, winter dysentery and calf diarrhoea. The purpose of the study was to compare different diagnostic methods to detect BCV. Different methods are discussed, PCR, ELISA, immunofluorescence and virus isolation.

Investigations were made in three different herds with winter dysentery; one dairy cattle farm with about 100 cows of different ages, one testing station for bulls with about 150 bulls and another small dairy cattle farm with 26 cows and 20 replacement heifers and calves. Faeces and nasal swabs were analysed with PCR and ELISA.

The result shows that PCR seems to be a reliable method for detecting BCV but that the ELISA test can not be used as a reliable diagnostic method to analyse samples from animals with winter dysentery.

## Sammanfattning

Detta arbete ger en kort beskrivning av familjen coronavirus, bovint coronavirus (BCV) egenskaper samt två sjukdomar BCV orsakar, vinterdysenteri och kalvdiarré.

Syftet med studien var att jämföra olika diagnostiska metoder för att påvisa BCV. Ett flertal olika metoder tas upp, PCR, ELISA, immunofluorescens och virusisolering.

Undersökningar gjordes i tre olika besättningar som drabbats av vinterdysenteri; en mjölkbesättning med ett 100-tal djur i olika åldrar, en prövningsstation för tjurar med cirka 150 djur samt en mindre mjölkbesättning med 26 mjölkkor och 20 yngre djur. Prover från de tre besättningarna togs i form av träck och nässvabbar. Dessa analyserades med PCR och ELISA.

Resultaten visar på att PCR verkar vara en pålitlig metod för påvisande av BCV medan den ELISA som användes inte kan användas som en pålitlig metod för diagnostik av prov från djur med vinterdysenteri.

## Tack

Ett stort tack vill jag ge till min handledare Stefan Alenius för all hjälp med skrivandet av mitt arbete samt till Sara Hägglund för all hjälp med PCR-laborationerna.

## **Inledning**

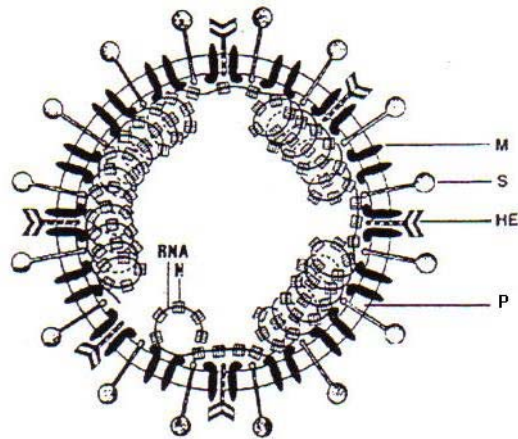
Detta examensarbete kommer att ge en inblick i några olika metoder som finns för diagnostik av infektioner med bovint coronavirus och beskriva symtom och undersökningar som genomförts i drabbade besättningar.

Det finns ett kommersiellt ELISA-test för bovint coronavirus (BCV) som använts på Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) som snabbtest för rutinkontroller av unga kalvar med diarréer orsakade av BCV. Detta test har även använts för att försöka påvisa vinterdysenteri hos vuxna djur, men har då inte varit helt pålitligt. Det har ofta visat negativt resultat trots kliniska tecken på sjukdom hos de undersökta djuren och trots att serologiska undersökningar visat att det varit BCV som drabbat dem. En ny PCR-metod för diagnostik av BCV har nu utvecklats och kommer sannolikt att ersätta ELISA-testet.

Tanken med detta arbete var initialt att göra en jämförelse mellan den nya PCR-metoden och det gamla ELISA-testet. Provtagning har gjorts på tre besättningar som drabbats av diarréer med stark misstanke att dom orsakats av BCV. Det visade sig att ELISA-testet inte gav tillförlitliga utslag på proven medan PCR-metoden verkade fungera bra. Målet med arbetet ändrades då till att omfatta en kort beskrivning av kliniska symtom och de olika diagnostiska metoder som finns för att påvisa BCV samt att beskriva undersökningar som genomförts i de drabbade besättningarna

## **Bovint coronavirus**

Bovint coronavirus (BCV) är ett enkelsträngat RNA-virus med ett hölje och tillhör familjen Coronaviridae. Viruset är ca 100-120 nm i diameter. Skalet har ca. 20 nm långa droppformade taggar, s.k. peplomerer, som sticker ut och liknar en krona, därav namnet coronavirus (se figur 1). Genomet består av ca 30 000 baser. Replikationen sker i cellernas cytoplasma (Fenner, 1993).



**Figur 1**

M = membranprotein, S = spikformad peplomer av glykoprotein, HE = hemagglutininesteras, P = dubbelsidigt plasmamembran, N = Nukleokapsidprotein kring vilket RNA är lindat i en helixform.  
(Tråvén, 2000)

Coronavirus kan delas in i tre olika antigena grupper (se tabell 1) (Fenner, 1993).

**Tabell 1**

Grupp	Virus	Sjukdom
I (däggdjur)	Humant coronavirus 229E	Förkylning
	Transmissibel gastroenterit hos gris (TGE)	Gastroenterit
	Felin infektiös peritonit (FIP)	Peritonit, Pneumoni, Meningoencefalit
II (däggdjur)	Coronavirus hos hund	Enterit
	Humant coronavirus OC43	Förkylning
	Mushepatitvirus (flera typer)	Hepatit, Enterit, Encefalomyelit
	Bovint coronavirus	Gastroenterit, Respiratoriska symtom
	Porcint hemagglutinerande	Kräkningar, inappetens
III (aviär)	encefalomyelit virus	encefalomyelit
	Infektiöst bronkitvirus hos kyckling	Trakeobronkit, Nefrit
	Bluecomb disease hos kalkon	Enterit

Det har hittats nya coronavirus varibland SARS (Severe acute respiratory syndrome) är ett virus som gav allvarliga följder under en epidemi i främst Asien, men även länder som Kanada drabbades, under året 2003. Undersökningar av viruset har tytt på att det skall hamna under grupp II eller i en ny grupp (Prentice, 2004).

## Historik

BCV beskrevs från början som en orsak till kalvdiarré hos nyfödda kalvar (Stair et al., 1972). 1975 kom den första rapporten om att man hittat coronavirus med hjälp av elektronmikroskop i träcken hos vuxna djur som drabbats av vinterdysenteri (Horner et al., 1975). Flera försök gjordes med hjälp av serologi för att försöka hitta ett samband mellan BCV och vinterdysenteri med varierande resultat (Takahashi et al., 1980, Alenius et al. 1991). Det var inte förrän en bit in på 1990-talet som man med stor säkerhet kunde säga att det fanns ett samband mellan BCV och vinterdysenteri. Det finns flera agens som kan orsaka diarré hos vuxna nöten men BCV är det dominerande i Sverige. Vid en undersökning av 39 utbrott i Sverige visade sig 38 av dem bero på BCV (Trävèn, 2000).

Sedan slutet av 1980-talet har man tyckt sig kunnat se en förändring hos det bovina coronaviruset. Vissa stammar har rapporterats ge allvarliga rena respiratoriska symtom utöver de klassiska problemen med gastroenterit och mild övre luftvägsinfektion (Storz, 1996). Serokonvertering mot BCV har ofta observerats i svenska köttjursbesättningar med symtom hos kalvar, huvudsakligen i form av luftvägsinfektioner (Bengtsson, 2000).

## Vinterdysenteri

### *Epidemiologi*

Sjukdomen uppträder ofta under tiden november – mars. Inkubationstiden är kort och sjukdomen sprids snabbt inom besättningen, 100 % av de känsliga djuren kan visa symtom inom 4-5 dagar. Alla åldrar drabbas men äldre djur är mer utsatta och får ofta allvarligare symtom. Sjukdomen drabbar ibland stora områden under en kort tid och brukar ofta återkomma efter ca 3-4 år. Smittan överförs vid direktkontakt mellan djuren och genom inhalation. Sjukdomen är vanlig i tempererade områden såsom USA, Kanada och Europa (Aiello, 1991).

### *Kliniska fynd*

Vid de flesta utbrott så får flera kor rikligt med vattnig diarré. Övriga djur insjuknar därefter snabbt. Korna kan även få något förhöjd temp, näsflöde, hosta och eventuellt något nedsatt aptit men ökad törst. Ibland kan diarrén innehålla slem eller blod. Mjölkkor drabbas ofta av minskad mjölkproduktion. Sjukdomen går oftast över på 3-4 dagar men produktionen kan vara minskad i veckor - månader. Det är ovanligt med dödsfall och dessa beror då ofta på en sekundär infektion eller en saminfektion med t.ex. BVDV (Alenius, 1991).

Skador som orsakas av BCV är en katarral inflammation i digestionskanalen och då främst i ileum och jejunum. Tarmväggen blir ödematös med svullen mucosa. I mikroskop kan man se fokala nekroser och degeneration av kryptepitel i colon (Aiello, 1991).



### *Diagnos*

Tidpunkten för sjukdomen är viktig då den oftast uppträder på vintern. Antalet drabbade individer samt deras ålder är också viktig information för att ställa diagnosen. Diagnos ställs genom att påvisa virus eller en antikroppsstegring (Aiello, 1991).

### *Profylax och behandling*

Man bör helst ha fyra veckors karantän på djur som köps in och djur bör ej köpas från drabbade besättningar förrän tidigast 3-4 veckor efter att utbrottet avklingat. Drabbade djur bör isoleras tills de har tillfrisknat och man bör vara noga med att ha rena kläder och skor hos de friska djuren.

Normalt behövs ingen behandling men djur som har drabbats allvarligt kan ges vätsketerapi med elektrolyter samt värme och omvårdnad (Aiello, 1991).

## **Kalvdiarré**

### *Epidemiologi*

Sjukdomen är ganska vanligt förekommande, oftast i kombination med andra agens. Sjukdomen drabbar kalvar i åldern 5-21 dagar. Coronaviruset i sig ger sällan några allvarligare problem men kan i kombination med bakterier eller *Cryptosporidium parvum* ge dödligheter på över 50 % (Rebhun, 1995).

### *Kliniska fynd*

Kraftig akut diarré, dehydrering, minskad aptit och sugreflex samt nedsatt allmäntillstånd är vanliga symtom vid kalvdiarré orsakad av BCV. Diarrén är ofta kombinerad med övre luftvädsinfektion, vilken inte sällan ses som enda symtom hos flertalet individer i en djurgrupp (Rebhun, 1995).

### *Diagnos*

Serologi kan vara olämpligt att använda på unga kalvar då dessa har kvar maternella antikroppar som stör testet. Prov från avföring bör helst tas inom det första dygnet efter det att diarrén börjat. Lämplig analysmetod är sedan någon som påvisar virus, t.ex. elektronmikroskop, PCR eller antigen-ELISA (Rebhun, 1995).

### *Profylax och behandling*

Vid ett utbrott av sjukdom kan man ge elektrolytlösning för att kompensera för förluster från diarrén. Om det skulle uppstå sekundära infektioner så kan man behandla allmänt med antibiotika (Rebhun, 1995).

# Diagnostik

## PCR-teknik

PCR står för Polymerase Chain Reaction och är en teknik som mångfaldigar en viss del av en RNA eller DNA-molekyl. Den klassiska PCR-metoden kan utföras "nested", vilket innebär att en andra amplifiering utförs på produkter som erhållits i den första PCR-reaktionen.

PCR-metoden som används på SVA går till på följande sätt. Träck- eller nässvabb löses upp i provtagningsmedium eller buffert. TRIzol<sup>®</sup> LS Reagent, som lyserar cellerna och löser upp cellkomponenterna, tillförs. Provet får stå i några minuter så att även nukleoproteinerna i virionerna hinner lösa upp sig. Därefter tillsätts kloroform och provet skakas om. Under centrifugering bildas nu tre faser, RNA befinner sig i den övre vattenfasen. Vattenfasen pipetteras över till en ny tub och en alkohol tillförs. Lösningen får stå i 10 minuter innan man centrifugerar en andra gång. RNA kommer nu att bilda en geléliknande pellet på botten av tuben. Lösningen pipetteras bort och man tvättar pelleten en gång genom att tillföra etanol och centrifugera. Etanolen pipetteras återigen bort och RNA-pelleten får lufttorka innan den löses upp i vatten.

Nästa steg är "Reverse Transcription". Till RNA som är enkelsträngat tillförs nu s.k. pdN<sub>6</sub> i form av små korta slumpmässiga DNA-kedjor med 6 baser i varje. Dessa fäster in på RNA. Man tillsätter sedan en lösning med DNA-baser och enzymet reversed transcriptase (RT). Genom upphettning och nedkylning får man kedjorna att dela sig och RT bygger på kedjorna så att man får dubbelsträngade DNA-kedjor.

För att köra PCR måste man känna till nukleotidsekvensen i början och i slutet av den region man vill mångfaldiga. Man måste ha två korta primers som består av oligonukleotider, dessa skall passa in exakt på de båda enkelkedjorna. I detta fall användes en känd sekvens på HE-genen på BCV. Man tillsätter nu DNA-nukleotider till provet tillsammans med primers och Taq-polymeras. Man börjar med att hetta upp DNA-kedjorna så att de delar sig från varandra, därefter kyler man ner vilket gör att primerna kan binda till de komplementära sekvenserna på DNA-kedjorna. Temperaturen höjs och Taq-polymeraset fäster nukleotider till strängarna som byggs ut till hela DNA-kedjor. Detta sker i en cykel av uppvärmning och kylning vilket gör att man mångfaldigar den DNA-sekvens som man är intresserad av. Man kan utföra ca 30-40 cykler utan att tillföra nya reagenser eller enzym. Därefter tar man ut en del av provet för att analysera. Vid nested-PCR tillförs mer reagenser och ett nytt set av primers vilka passar inuti den amplifierade regionen. PCR utförs ytterligare en omgång för att ytterligare uppföröka antalet DNA-kedjor.

När man nu fått en stor mängd av en specifik DNA-sekvens så färgar man in denna DNA-kedja med ett fluorescerande färgämne. Därefter kör man sitt prov i elektrofores vilket gör att DNA-kedjorna vandrar genom en gel med ett elektriskt fält. Man har även ett positivt prov och ett negativt prov med som kontroll. När man har kört provet genom gelen ca en timme så tittar man på den i ultraviolett

ljus. Om man har ett positivt prov så kommer man att ha streck på samma ställe som den positiva kontrollen.

### *Realtids-PCR*

Realtids-PCR är en ny metod baserad på PCR-teknik som är under utarbetning på SVA i Uppsala. Metoden fungerar som vanlig PCR-teknik med den skillnaden att man tillför alla ingredienser från start tillsammans med s.k. TaqMan-prober som fäster in till den specifika gen som man vill uppföröka. I fallet med bovin coronavirus har man använt en känd sekvens på virusets HE-gen. Vid amplifikation av det specifika segmentet genererar dessa prober fluorescens som kan mätas kontinuerligt under körningens gång. Om man från start har med en positiv kontroll med känd koncentration så kan man genom att jämföra fluorescensen hos prov och kontroll få ett kvantitativt värde på hur mycket virus provet innehåller.

Metoden som utarbetas på SVA är tänkt att användas för att diagnosticera luftvägsproblem hos kalvar men kan även användas för att testa för vinterdysenteri hos vuxna djur. Man avser att testa för tre olika virus samtidigt vid varje körning, bovin coronavirus, bovin adenovirus samt bovin respiratoriskt syncytialt virus. Möjligt provmaterial kan bestå av bl.a. nässvabb, lungvävnad eller homogeniserad faeces. Att man kan köra flera virus samtidigt är en fördel, liksom att man inte riskerar att kontaminera provet vid de mellansteg som man har vid en vanlig PCR-körning. Det går dessutom snabbare än med vanlig PCR och har lika god känslighet (Hakhverdyan et al, 2004).

### **ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay)**

Den ELISA som används vid SVA för att hitta virus i träckprover är en antigen-ELISA, vilket innebär att den påvisar viruspartiklarna i positiva prover.

Testet är ett kommersiellt test utarbetat av Cypress diagnostics. Analysen går till så att man löser upp sitt prov i en buffertlösning. Denna tillsätts sedan en färdigberedd platta med brunnar. En del av provet tillsätts en brunn vars botten är täckt av specifika antikroppar mot BCV, en annan del av provet tillsätts en brunn som är täckt med ospecifika antikroppar, detta för att kompensera för de ospecifika bindningar som provet kommer att få med de specifika antikropparna. Provet får sedan stå i en timme och reagera. Därefter sköljs plattan av med en tvättlösning några gånger. De viruspartiklar som eventuellt finns i provet sitter kvar i botten av brunnarna. Sedan tillsätts en lösning med enzymmärkta antikroppar mot coronavirus och provet får stå ytterligare en timme varefter det tvättas. Därefter tillsätts ett färgämne som får reagera med antikropparna under tio minuter. Ett stoppämne tillförs sedan för att stoppa reaktionen och därefter kan man avläsa absorbansen hos proven i en spektrofotometer vid 450 nm. Om man drar av absorbansen från den ospecifika brunnen ifrån absorbansen från den specifika så får man ett värde som är proportionellt till hur mycket virus som eventuellt finns i provet. Dessutom har man kört med en positiv och negativ kontroll att jämföra med för att se att man utfört testet rätt.

## **Viruisolering**

Bovint coronavirus är svårödlad på cellkultur och kräver ofta viss anpassning innan man kan odla det, genom att t.ex. sätta till trypsin och därefter odla på kalvembryoceller. Om man har coronavirus i sitt prov kommer man att kunna se en cytopatogen effekt hos cellerna. För att konfirmera att det är BCV man har odlat så tillförs specifika antikroppar mot viruset, om då den cytopatogena effekten försvinner har man konstaterat att det var BCV (Moreno-Lopez, 1989).

Man har odlat fram en viss linje av humana rektaltumörceller som anpassats för att odla BCV på. Denna linje har fått namnet HRT-18G. Man har inte lyckats odla fram alla stammar på denna linje varför den inte har kunnat användas som s.k. guldstandard för att hitta BCV-infekterade djur (Storz et al, 1996).

## **Immunofluorescens (IF)**

Det finns två olika varianter av IF, en direkt och en indirekt. Direkt IF innebär att man tillsätter ett färgämne som binder kovalent till en virusspecifik antikropp. När man tillför denna antikropp-färgämneskonjugat till ett vävnadsprov så kommer det att fästa vid viruset. Om man sedan tittar i ett speciellt IF-mikroskop som lyser på provet med UV-ljus så kommer färgämnet att fluorescera och man ser om det finns virus. Man kan även tillföra ett antikropp-färgämneskonjugat till en odlad cellkultur för att avläsa om man har virus.

Den indirekta varianten går ut på att man har specifika antikroppar mot viruset som odlats fram hos en viss art, t.ex. häst. Dessa antikroppar fäster till viruset på det aktuella provet. Därefter tillför man antikroppar mot häst från en annan art (t.ex. kanin) Dessa antikroppar har då färgämnet konjugerat till sig och kommer att lysa när man tittar i IF-mikroskop med UV-ljus (Lund, 1989).

## **Elektronmikroskop (EM)**

Ett elektronmikroskop fungerar i princip som ett ljusmikroskop men man har bytt ut ljusstrålarna mot en elektronstråle och linserna mot magnetspoler för att fokusera på provet. Provet som analyseras måste vara tunt och placerat under vakuum. Med denna teknik kan man se med en mycket högre upplösning än ett vanligt mikroskop och det går att se viruspartiklar (Alberts et al, 1998).

För att kunna hitta virus med EM krävs att det finns en hög koncentration i provet man skall undersöka, en undre gräns brukar ofta vara  $10^6$ /ml. I ett akut skede av sjukdom så överskrids ofta denna gräns. Metoden är väl lämpad för enteriter som i fallet med BCV då man kan använda träck för undersökning. Man kan rena provet genom att centrifugera (Fenner et al, 1993).

För att öka känsligheten hos EM så kan man tillsätta antikroppar mot viruset som har tillsatts något ämne som kan ses i EM, denna teknik kallas för Immunoelektronmikroskop (IME). Ett vanligt ämne som tillsätts i konjugat med

antikroppar är guldkorn i storleksordningen 5-20 nm. Guldkornen är sedan lätta att hitta i EM (Fenner et al, 1993).

Nackdelen med elektronmikroskopering är att det kräver mycket arbetskraft och tar lång tid och är dessutom en metod med ganska dålig sensitivitet.

## **Serologi**

Serologi är baserat på antikropps-ELISA vilket innebär att man letar efter antikroppar mot BCV i blod eller mjölkprover. För att veta om djuret lider av sjukdomen måste man ta parade prover med någon vecka emellan för att se om det skett någon antikroppsstegring under den tiden. Det första provet skall tas så fort som möjligt i den akuta fasen av sjukdomen. Att djuret har antikroppar kan bero på att det har kvar maternala antikroppar sedan födseln eller varit utsatt tidigare för sjukdomen. Om man ser en antikroppsökning mellan de två parproven så kan man konstatera att djuret haft sjukdomen vid det första provtagningstillfället (Moreno-Lopéz, 1989).

Parade serologiprover är en säker metod för att påvisa sjukdomen men har den nackdelen att det tar tid att få svar.

## **Material och metoder**

Provtagningar för BCV har genomförts på tre besättningar som drabbats av diarré på vuxna djur.

### **Besättning 1:**

Gård A i Uppland, drabbades i februari 2004 av ett utbrott av vinterdysenteri. Gården omfattade ett 100-tal djur bestående av spädkalvar, ungdjur och mjölkkor. Djuren provtogs vid två tillfällen, den 27/2 och 2/3. Proven bestod av träck- och nossvabbar från sjuka djuroch från djur utan kliniska symtom i alla ålderskategorier. Medan i princip alla mjölkande djur (samt ett par spädkalvar) visade vattentunn diarré, sågs nästan uteslutande luftvägssymtom på ungdjur och sinkor. Fyra nyligen inköpta mjölkkor var hårt drabbade, en med vattentunn diarré, melena och kraftig tachykardi. Att övriga djur inte drabbades i samma utsträckning berodde troligen på att gården haft ett tidigare utbrott 3-4 år tidigare och dessa djur fortfarande hade immunitet mot sjukdomen.

Svabbproverna frystes ned i väntan på vidare analyser efter BCV med ELISA och PCR.

### **Besättning 2:**

Gård B i Sörmland drabbades i februari 2004 av ett utbrott av vinterdysenteri. Gården tar emot ungtjurar från hela landet för avelsvärdering. Gården omfattar drygt 150 djur. Tolv djur provtogs med träck och nossvabbar vilka analyserades med ELISA och PCR. PCR-analys gjordes på både virusets HE-gen och S-gen.

### Besättning 3:

Gård C i Jämtland drabbades i december 2004 av vinterdysenteri. Gården har 26 mjölkkor och ca 20 yngre djur. Alla kor utom en förstakalvare drabbades av sjukdom i form av diarré och många hade även hosta. Mjolkproduktionen sjönk med en tredjedel. Kalvarna hade lite hosta men ingen diarré. Två av korna var så dåliga att veterinär fick tillkallas. Ett träckprov togs då och skickades iväg till SVA för analys. Provet analyserades med realtids-PCR.

## Resultat

### Besättning A

PCR och ELISA analyserades på 20 av proverna som tagits. Proverna som kördes omfattade både äldre och yngre djur, både träck- och nossvabbar samt prover från båda provtagningstillfällena.

1270, 1271 och 1272 är ca 1-2 veckor gamla spädkalvar.

1225 och 1233 är något äldre kalvar. Övriga är vuxna djur.

**Tabell 2**

*PCR -körning*

Nr	Svabb	Datum	PCR - HE-gen
158	Träck	27-feb	+
191	Träck	27-feb	+
198	Nos	27-feb	+
198	Träck	27-feb	+
344	Träck	03-mar	+
348	Nos	27-feb	+
348	Träck	27-feb	+
482	Nos	27-feb	+
865	Nos	27-feb	+
865	Träck	27-feb	+
1225	Nos	27-feb	+
1233	Nos	27-feb	+
1270	Nos	27-feb	+
1270	Träck	27-feb	+
1271	Nos	27-feb	+
1271	Träck	27-feb	+
1271	Nos	03-mar	+
1272	Nos	27-feb	+
1272	Träck	27-feb	-
1272	Träck	03-mar	-
neg kontr			-
pos kontr			+

### *ELISA*

ELISA kördes på samma provmaterial som det tidigare körts PCR-analys på. ELISA-testet som användes är utvecklat för spädkalvar med diarré men har även använts för körning på äldre djur, dock med varierande framgång. Vid den körning som gjordes så blev det inget utslag på något prov, även hos spädkalvarna med diarré för vilka testet är utprovat. Den positiva kontrollen gav dock ett tydligt utslag varför analysen sannolikt var korrekt utförd.

Eftersom ELISA-testet inte gav några resultat så gick det ej att genomföra någon jämförelse mellan de två analysmetoderna ELISA och PCR

### **Besättning B**

PCR- och ELISA-analys gjordes på träck- och nossvabbar från 12 av de drabbade djuren som var tjurkalvar i ettårsåldern.

**Tabell 3**

#### *PCR-körning*

Nr	Träck - HE	Träck - S	Nos - HE	Nos - S
5062	+	+	-	-
399	+	+	-	-
2226	+	+	+	+
38	+	+	+	+
7375	+	+	+	-
317	+	+	+	+
7190	+	+	-	-
7125	+	+	+	+
7593	+	+	+	+
7590	+	+	+	+
652	+	+	+	+
401	+			
pos. kontr.	+	+	+	+
neg kontr.	-	-	-	-

### *ELISA*

Även i denna besättning blev alla resultat från träckproverna som kördes på ELISA negativa.

### **Besättning C**

Endast ett av djuren analyserades med den nyligen utarbetade metoden för realtids-PCR. Ett träckprov analyserades och visade på ett positivt utslag för BCV.

## Diskussion

Vinterdysenteri är en sjukdom som kan slå hårt mot mjölkproduktionen hos en drabbad djurägare och ge en betydande ekonomisk förlust. Det skulle vara ekonomiskt lönsamt att försöka minska antalet utbrott i landet. För att göra detta är det viktigt att man har en bra diagnostik för att veta vilket slags agens man har att göra med. Man kan då få en överblick över problemen. Det var länge okänt vad som orsakade vinterdysenteri och mycket är fortfarande oklart när det gäller t.ex. spridningsvägar. Att BCV är mycket smittsamt är dock klart då det ofta slår till mot hela regioner samtidigt. I fallet Gård C i Jämtland så var ett 50-tal gårdar i regionen drabbade samtidigt efter att ha varit fria under en mycket lång tid. Misstanken var att smittan spreds via mjölkbilarna då ingen annan varit ute på gården och smittan dök upp två-tre dagar efter att grannen drabbats. Om man i ett tidigt stadium kan gå in och konstatera vad som orsakat sjukdomen kan man på ett bättre sätt sätta in åtgärder för att om möjligt minska smittspridningen. Det är därför viktigt att ha effektiva diagnostiska metoder.

Den antigen-ELISA-metod som använts vid SVA för att hitta BCV vid kalvdiarréer har vid analyser av vinterdysenteri inte visat sig pålitlig. Det kan vara olika stammar som orsakar vinterdysenteri och kalvdiarréer även om den vanliga vinterdysenterin också ger diarréer hos spädkalvar. Om så är fallet är dock fortfarande oklart.

Den PCR-metod som utarbetats verkar fungera bra för att hitta BCV. Både i gård A och B kunde virus påvisas i träck och nässvabbar. Det visade sig att alla djur inte utsöndrade virus i både träck och nos. I Gård A så var det ett av djuren som var negativt på träckprovet medan det hade ett positivt utslag på nässvabben. Det hade heller inget utslag vid det träckprov som togs fem dagar senare. I Gård B var det däremot tvärtom, alla djur hade positivt utslag på träckproven medan 3 av 12 inte fick något utslag på nässvabben.

Vilket som är att föredra av näs- eller träcksvabb går inte att ge något klart svar på även om en del tyder på att träcksvabb skulle vara lite bättre samt att det är lite mer praktiskt då man lätt kan ta provet och det syns tydligt att man har fått med material. Vid provtagningen skall man tänka på att ta provet genom att ta svabben mot tarmslemhinnan för att få större chans att få med sig virus.

Den nya metoden med realtids-PCR verkar dock bli det som kommer att slå igenom och användas i framtiden eftersom fördelarna är så stora jämfört med andra metoder. Vid försök har det visat sig att den är i samma klass som den vanlig PCR när det gäller känslighet. Den är heller inte lika känslig för kontamination (falskt positiva) då det är färre steg som kan gå fel. Den stora fördelen är dock att den är snabbare. Man kan få ett provsvar dagen efter att provet kommit in för analys. Möjligheten att analysera efter flera virus i samma körning är också en stor fördel då man vid en körning kan köra flera av de agens som man kan misstänka ger upphov till sjukdomen.



Med den nya diagnostiken kommer det att i framtiden bli möjligt att starta upp nya kontrollprogram för att utrota sjukdomar från landet, däribland t.ex. BRSV eller BCV.

## Literaturförteckning

- Aiello, S.E., Bergeron, J.A., Fraser, C.M., Mays, A. 1991. *The Merck Veterinary Manual*. 7<sup>th</sup> edition. Merck & co. New Jersey, USA, 226-227
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. 1998. *Essential Cell Biology*. Garland publishing. New York, USA
- Alenius, S., Niskanen, R., Juntti, N., Larsson, B. 1991. *Bovine coronavirus as the causative agent of winter dysentery: Serological evidence*. Acta vet. scand. 32, 163-170
- Bengtsson, B., Viring, S. 2000. Respiratory infections – project, panorama and treatment strategies (in Swedish). *Proceedings, Veterinärmötet 2000*. 153-157
- Fenner, F.J., Gibbs, E.P.J., Murphy, F.A., Rott, R., Studdert, M.J., White, D.O. 1993. *Veterinary virology* 2<sup>nd</sup> edition. Academic press inc. San Diego, USA, 457-469.
- Hakverdyan, M., Belák, S., Hägglund, S., Alenius, S. 2004. Påvisande av tre patogena respiratoriska virus hos nötkreatur med realtids PCR, *SVA-vet.* 4, 6-7
- Horner, G., Hunter, R., Kirkbride, C. 1975. A coronavirus-like agent present in faeces of cow with diarrhoea, *N.Z. vet. J.* 23, 98
- Lund, E. 1989. *Virology*. DSR forlag, Köpenhamn, Danmark, 167-173.
- Moreno-Lopez, J. 1989. *Diagnostic virology*. Swedish University of Agricultural Sciences. Uppsala, Sverige
- Prentice, E., McAuliffe, J., Lu, X., Subbarao, K., Denison, M.R. 2004. Identification and characterization of severe acute respiratory syndrome coronavirus replicase proteins. *Journal of virology*. 78, 9977-9986.
- Rebhun, W.C. 1995. *Diseases of Dairy Cattle*. Williams & Wilkins, USA, 213-214
- Stair, E.L., Rhodes, M.B., White, R.G., Mebus, C.A. 1972. Neonatal calf diarrhea: purification and electron microscopy of a corona-like agent. *Am. J. vet. Res.* 33, 1147-1156
- Storz, J., Stine, L., Liem, A., Anderson, G. 1996. Coronavirus isolation from nasal swab samples in cattle with signs of respiratory tract disease after shipping. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 208, 1452-1455.
- Takahashi, E., Inaba, Y., Sato, K., Ito, Y., Kurogi, H., Akashi H., Satoda, K., Omori, T. 1980. Epizootic diarrhoea of adult cattle associated with a coronalike agent. *Vet Microbiol.* 5, 151-154
- Tråvén, M. 2000. *Winter dysentery caused by Bovine Coronavirus: No rule without exception*. Diss. Uppsala:SLU, Sverige