

Utveckling och applicering av en aviditets-ELISA för bovint respiratoriskt syncytialt virus

Agneta Lind

**Handledare: Camilla Björkman
Inst. för kliniska vetenskaper**

**Biträdande handledare: Sara Hägglund
Inst. för kliniska vetenskaper**

SUMMARY

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV) is a common cause of respiratory disease among young cattle. The virus causes severe losses; the herd mortality rate can sometimes be as high as 20 %. In this study the avidity (i.e the antigen binding force) of BRSV specific antibodies was measured to see if there was a difference between antibodies produced during an acute phase of infection and antibodies produced by earlier infected animals.

A commercially available ELISA-testkit against BRSV-specific antibodies was used and an incubation step with 6M urea was added. The effect of the urea is that it breaks the weak bonds between antibodies and antigen while the stronger bonds remain intact.

Four different groups of animals were included in this study; seven calves that were naturally infected, three acutely infected calves with known time of infection, five cows that were seropositive during several years and four experimentally infected calves that had been a part of a vaccine trial.

The results of this study showed that antibodies produced during the acute phase of an infection had a low avidity and that the avidity increased with time after infection. Antibodies produced by animals that have been seropositive for a long time and the maternally derived antibodies had a high avidity. There was no correlation between the amount of antibodies and avidity.

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

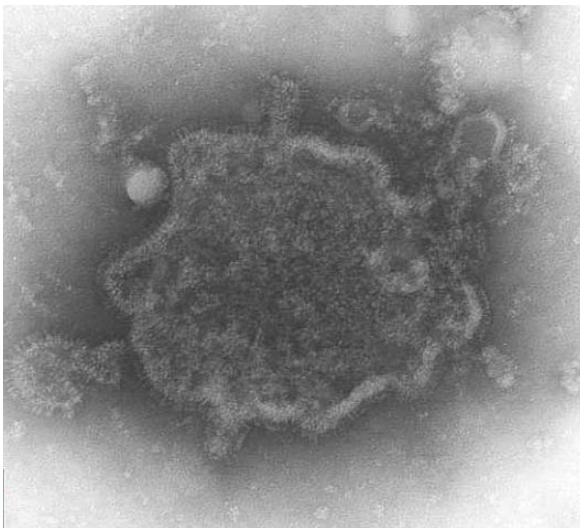
Introduktion	7
Bovint respiratoriskt syncytialt virus och sjukdomen det orsakar	7
Etiologi.....	7
Epidemiologi.....	7
Patogenes och patologi	8
Immunsvaret	9
Klinisk bild	9
Diagnos	10
Behandling	10
Profylax.....	10
ELISA-test för påvisande av antikroppar	11
Aviditets-ELISA	12
Olika applikationer för aviditets-ELISA.....	12
Syfte	13
Material och metoder	13
Prover.....	13
Del 1, naturligt infekterade kalvar	13
Del 2, akut infekterade kalvar med känt infektionsdatum	14
Del 3, långvarigt antikroppspositiva kor.....	14
Del 4, experimentellt infekterade kalvar i en vaccinstudie.....	14
Analysmetod	14
Resultat	15
Del 1, naturligt infekterade kalvar	15
Del 2, akut infekterade kalvar med känt infektionsdatum	16
Del 3, långvarigt antikroppspositiva kor.....	17
Del 4, experimentellt infekterade kalvar i en vaccinstudie.....	17
Jämförelse mellan absorbans och aviditet	18
Diskussion.....	18
Slutsats	20
Sammanfattning	21
Tack	22
Litteraturlista.....	23
Bilaga 1, Metodbeskrivning för Svanovas BRSV-ELISA.....	26
Bilaga 2, Metodbeskrivning för aviditets-ELISA.....	28

INTRODUKTION

Bovint respiratoriskt syncytialt virus och sjukdomen det orsakar

Etiologi

Bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) tillhör tillsammans med bland annat Humant respiratoriskt syncytialt virus och pneumonivirus hos mus genus Pneumovirus (figur 1) i Paramyxoviridaefamiljen, underfamilj pneumovirinae (Murphy et al 1999). BRSV är ett pleomorft virus med grovt sett en sfärisk form, diameter är i snitt 200 nm. Viruset omges av ett lipidmembran som det har tagit från värdcellen. Det enkelsträngade, negativa RNA't sitter tätt sammanhållet med nukleoproteiner (Wellems 1990). Tio olika virala proteiner kan hittas i infekterade celler (Lerch et al 1989), bland annat ett stort glukoprotein som möjliggör för viruset att fästa vid värdcellen och ett fusionsprotein som ansvarar för virusets sammansmältning med värdcellens membran. Virusreplikationen sker till sin helhet i värdcellens cytoplasma (Larsen 2000).



Figur 1. *Pneumovirus*.

Viruset kan odlas i en stor mängd olika primära bovina cellkulturer. Exempel är celler från testiklar, trachea, aorta, mjälte och lunga samt turbinatceller. Viruset kan även växa i vissa celler från andra djur och människa. Det växer dock bättre i bovina celler än i humana celler.

Viruset är känsligt för lågt pH, eter och kloroform. Det förstörs vid 56°C efter 30 minuter. Även om viruset är känsligt så kan det förbli infektiöst minst tio år om det förvaras i flytande kväve.

Epidemiologi

Viruset finns i stort sett i hela världen. I en svensk studie av Bengtsson och Viring (2000) undersöktes förekomsten av antikroppar mot BRSV hos kalvar i åtta mjölkbesättningar och 30 specialiserade köttjursbesättningar. De mjölkbesättningar som undersöktes var utvalda på grund av att de hade problem med luftvägslidanden, köttjursbesättningarna var däremot inte utvalda på grund av hälsoproblem. Antikroppar påvisades i 25 % av de undersökta besättningarna. Det

var en viss skillnad i förekomst av BRSV i de olika besättningstyperna. BRSV föreföll vara vanligare i besättningarna med specialiserad köttdjursuppfödning än i mjölkbesättningarna.

I en annan svensk studie gjord av Hägglund et al (2005a) undersöktes kvigkalvar i 118 besättningar. Kalvarna hade haft respiratoriska problem och provtogs vid två olika tillfällen (5-11 månader gamla respektive 7-21 månader gamla). Vid första provtagningen var 30 % av djuren antikroppspositiva för BRSV och mellan de två provtagningarna hade ytterligare 26 % av de djuren som var seronegativa vid första provtagningen serokonverterat för BRSV. Andelen infekterade besättningar var vid första provtagningen 29 % och vid andra provtagningen 51 %. Även förekomst av andra virus som ger luftvägslidanden (PIV-3, BCoV och BVDV) undersöktes, ofta sågs förekomst av flera virus samtidigt.

I en dansk studie av Uttenthal et al (1996) påvisades BRSV i sju av tio besättningar som hade problem med luftvägslidanden hos kalv. Denna studie tydde även på att viruset ofta förekom endemiskt och påverkade samma besättning årligen.

Det är inte klarlagt hur viruset överlever mellan utbrotten. I en studie av Van der Poel et al (1997) undersöktes förekomsten av persistent infekterade djur. En ökning av antikroppstitern kunde ses efter behandling med kortikosteroider och stress men det gick inte att påvisa förekomst av virus i undersökta organ.

Utbrotten sker ofta under tidig vinter: oktober till januari. Det är främst 3-9 månader gamla kalvar som drabbas men även andra åldersgrupper kan insjukna (Wellems 1990). Smittan sprids via direkt kontakt men experimentellt har man även sett aerosolsmitta på korta avstånd (Mars et al 1999).

Patogenes och patologi

Patogenesen är inte helt klarlagt men immunmedierade mekanismer spelar troligtvis en viktig roll (Larsen 2000). Virusreplikation sker främst i epitelceller i de nedre luftvägarna (Viuff et al 1996) men förekommer även i de övre luftvägarna. Virusinfektionen möjliggör för sekundära bakteriella infektioner med exempelvis *Manheimia haemolytica*, *Pasteurella multocida* och *Haemophilus somnus* (Bengtsson & Viring 2000).

Vid obduktion ses makroskopiskt interstitiell pneumoni framför allt cranioventralt (Bryson et al 1983, Kimman et al 1989a, Viuff et al 1996). Mucopurulent exudat i bronker och bronkioler förekommer (Viuff et al 1996). Eventuellt kan emfysem och atelektas ses (Kimman et al 1989a). Ödem förekommer i de intralobulära septumen (Viuff et al 1996). Ödem ses även i subcutis, endocardium, pericardium och luftvägarnas slemhinna, detta tillsammans med cyanos och petechier (Kimman et al 1989a).

Histologiskt ses bronkit och peribronkit (Bryson et al 1983). En stor mängd syncytialceller i näs- och trachealslemhinnan samt i alveol- och bronkiol epitel är karaktäristiskt (Kimman et al 1989a, Viuff et al 1996). Det är viruset spridning från cell till cell som ger de karaktäristiska syncytiala jättecellerna. Degeneration, nekros, och hyperplasi av brokialslemhinnan ses ofta. Vid förekomst av exsudat,

som främst består av epitelceller och neutrofiler, ses ofta även ödem och hyalina membran (Bryson et al 1983, Kimman et al 1989a, Viuff et al 1996).

Immunsvär

Hur bra skydd mot sjukdom ett djur har beror i allmänhet bland annat på ålder, ras, immunstatus samt kvalitet och kvantitet av antikroppar både lokalt och i serum. Man har dock inte funnit något klart samband mellan skydd mot BRSV-infektion och nivå på antikroppar (Larsen 2000). I serum kan IgG, IgM och IgA påvisas. IgM är de antikroppar som bildas först efter en primär infektion. De kan påvisas från dag sex till tio och går att mäta under fem till 30 dagar efter det (Kimman et al 1987, Uttenthal et al 2000). IgG1 påvisas från ungefär två veckor efter infektionstillfället och kvarstår en längre tid medan IgG2 ses först en till ett par veckor senare. IgA kan ibland ses under samma period som IgM (Kimman et al 1987, Uttenthal et al 2000). Antikroppar förekommer också lokalt på slemhinnan i luftvägarna, hos kalv har IgA, IgM och IgG påvisats (Kimman et al 1987, Hägglund et al 2004). Även det cellmedierade immunförsvaret spelar en viktig roll med framför allt ett kraftigt cytotoxiskt T-cellssvar (Thomas et al 1996).

Maternella antikroppar ger ett visst, men inte fullgott, skydd mot sjukdomen. Djur kan utveckla symptom vid en till tre månaders ålder då de fortfarande har maternella antikroppar kvar. De maternella antikropparna hämmar kalvens förmåga att bilda egna antikroppar (Kimman et al 1988, Uttenthal et al 1996).

Klinisk bild

Till skillnad från vissa andra luftvägsvirus ger BRSV kliniska symptom. Vid mild sjukdom ses hosta och muköst till seropurulent näsflöde. Andningsfrekvensen är något ökad och vid auskultation hörs onormala andningsljud. Vid en måttlig sjukdom ligger andningsfrekvensen över 80/minut och lungljuden är kraftigt förändrade. Vid allvarlig sjukdom visar djuret tecken på dyspné och har eventuellt subcutana emfysem (Larsen 2000). De allmänna symptom som förekommer är i varierande grad feber, nedsatt allmäntillstånd och anorexi (Bryson et al 1983, Kimman et al 1988) (figur 1). Mortaliteten kan vara så hög som 20 % i vissa besättningar.



Figur 2. Kalv med nedsatt allmäntillstånd.

Diagnos

Diagnos kan inte ställas enbart utifrån den kliniska bilden då symptomen är alltför ospecifika. Lungsköljprover alternativt nässvabbsprover kan tas för påvisande av virus. Proverna tas helst från milt påverkade djur. Förekomsten av virus undersöks med immunfluorescens (Thomas & Stott 1981) eller ELISA. ELISA-test är ett snabbt, enkelt och pålitligt sätt att påvisa BRSV-antigen (Lokensgard et al 1992). Det finns även PCR-metoder för att påvisa cDNA tillverkat från virus-RNA, dessa har en högre känslighet.

ELISA-tester kan även användas för att påvisa specifika antikroppar mot BRSV (Westenbrink et al 1985). Blodprover tas med två till tre veckors mellanrum, och mellan dessa provtillfällen ska en titerstegring ske för att djuret ska anses vara infekterat. Testerna är inte användbara för kalvar under tre månader då det kan finnas maternella antikroppar som hämmar kalvens egen antikropsproduktion (Kimman et al 1988, Uttenthal et al 1996). En annan nackdel med dessa tester är att det tar tid från det att sjukdomen brutit ut tills det går att påvisa antikroppar i serum. Även lungsköljprover kan tas för påvisande av antikroppar men dessa är inte lämpliga för provtagning på individnivå då antikropparna bara kan hittas under en begränsade period (Uttenthal et al 1996). Provtagningen är dessutom inte praktisk att utföra.

Behandling

Behandlingen är, som vid andra virusinfektioner, i första hand understödande. Det är viktigt med en god stallmiljö, det vill säga en torr och ren liggplats, inget drag och bra ventilation. Vätska ges per oralt eller intravenöst vid behov. Då immunmedierade mekanismer tros vara involverade kan den understödande behandlingen kompletteras med kortikosteroider eller NSAID för att lindra symptomen. Det finns dock inga bra studier som kontrollerat behandlingseffekten (Larsen 2000). Hos människa kan RSV-infektioner behandlas med antivirala medel (ribavirin) i form av aerosol men det skulle vara en både dyr och opraktisk behandling av nöt. Vid sekundär bakteriell infektion behandlas djuret även med antibiotika. Sjuka djur ska isoleras för att förhindra vidare smittspridning.

Profylax

För att förhindra sjukdom ska djuren hållas i en så bra miljö som möjlig. Det innebär bland annat en torr och ren liggplats, bra ventilation och att det inte är dragigt eller fuktigt. Råmjölksutfodringen till kalvarna är också mycket viktig. Även om de maternella antikropparna mot BRSV som överförs på detta sätt inte alltid ger ett fullgott skydd så har råmjölken andra betydelsefulla funktioner. Kalven får ett i allmänhet bättre immunförsvar och kan på så sätt bättre stå emot infektioner, både den primära virusinfektionen och sekundära bakteriella infektioner. Det är också mycket angeläget med en bra utfodring.

En viktig del för att förhindra sjukdom är att se till att infektiösa djur inte kommer in i besättningen och att det inte sprids inom besättningen. Inköp av nya djur ska undvikas i möjligaste mån eller så ska karantän användas, djuren bör sektioneras enligt ålder och hållas i små grupper, helst sex djur eller färre och

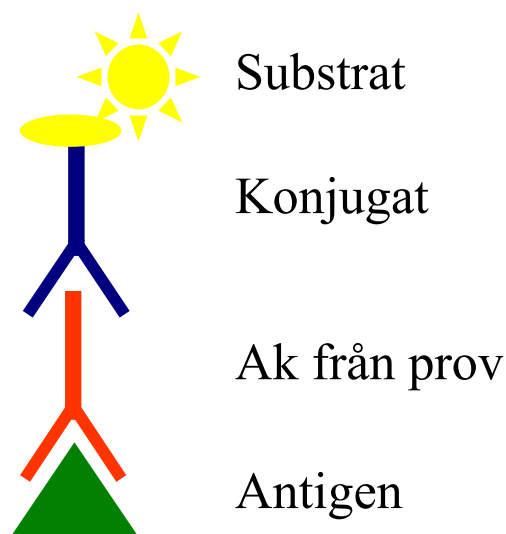
djuren ska inte blandas. Försiktighet ska även råda vid besök på gården, skyddskläder bör användas, händer tvättas och material desinficeras.

Att miljö och råmjölkutfodring är optimal är dock ingen garanti för att förhindra sjukdom (Welleman 1990) och ett behov av vaccin finns. Ett effektivt vaccin måste ge skydd även om det administreras under den period då maternella antikroppar är närvarande, skydda mot alla subtyper samt inte framkalla sjukdom eller förstärka effekten av en infektion (Larsen 2000). Flera inaktiverade och modifierade (attenuerade) levande vaccin finns. Effekten av dessa vacciner har dock inte klarlagts helt, olika studier visar på varierande skydd (Taylor & Stott 1989, Mohanty et al 1981, Fulton et al 1995) och vissa till och med på en ökad sjukdomsfrekvens (Gershwin et al 1998). I en studie av Kimman et al (1989b) visades att intranasal administration av virus gav ett lokalt skydd vid senare challenge, denna effekt fick man även hos kalvar med maternella antikroppar.

Studier för att utveckla nya vacciner pågår. Taylor et al (2005) har tittat på DNA-vaccin som uttrycker F-proteinet och/eller G-proteinet. I en studie från 2004 har Hägglund et al undersökt den skyddande effekten av virus inkorporerade i ISCOMer (immunstimulerande komplex).

ELISA-test för påvisande av antikroppar

Indirekt ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) är en ofta använd metod för att påvisa specifika antikroppar i serum eller mjölk. ELISA-tester är känsliga och förhållandevis billiga och många prover kan analyseras på kort tid. Först binds antigen till testplattan och sedan görs en blockering av denna för att förhindra ospecifika bindningar. Dessa två steg är som regel gjorda i kommersiella testkit. Provet som ska undersökas tillsätts och om det innehåller antikroppar fäster dessa vid antigenet. Plattan tvättas för att avlägsna överflödigt provmaterial. Därefter tillsätts en djurslagsspecifik antikropp, så kallat konjugat, som fäster vid antikropparna från provet (Schrijver & Kramps 1998). På konjugatet finns ett enzym som reagerar med ett substrat och bildar en färgad produkt. Analysen avslutas med att färgintensiteten avläses i en spektrofotometer. Färgintensiteten är beroende av mängden antikroppar som har fäst vid antigenet (Roitt et al 2001).



Figur 3. Indirekt ELISA för påvisande av antikroppar.

Det som beskrivits ovan är en icke-kompetitiv ELISA. Skillnaden i en kompetitiv ELISA är provet blandas med konjugerade antigenspecifika antikroppar och dessa två typer av antikroppar konkurrerar om bindningsplatserna. Det som sen mäts är hur stor del av bindningsplatserna som upptas av de konjugerade antikropparna. Mängden antikroppar i provet är därmed omvänt proportionellt mot färgintensiteten (Schrijver & Kramps 1998).

Det finns ett flertal möjliga felkällor i en ELISA-test. I icke-kompetitiva ELISA-test kan ospecifika antikroppar interferera genom att binda till antigenet och på så sett ge falska positiva resultat. Detta problem kan minskas genom att använda kontrollbrunnar utan antigen där enbart de ospecifika antikropparna binder. Med hjälp av det värdet kan ett korrigerat värde för antikropparna beräknas. Antikroppar kan även binda till annat än antigenet, exempelvis till plattan. Detta förhindras genom en blockering av ytan med icke-relevanta proteiner. (Schrijver & Kramps 1998).

Det är önskvärt att testet ska ha så hög känslighet (sannolikhet att identifiera positiva prover) och specificitet (sannolikhet att identifiera negativa prover) som möjligt. Det är viktigt att ta hänsyn till detta då cut-off värden fastställs. Ett lågt cut-off ger större sannolikhet för falska positiva resultat och ett högt cut-off ökar sannolikheten att få falska negativa resultat.

Aviditets-ELISA

I en aviditets-ELISA utnyttjas det faktum att de första antikroppar som produceras efter en primär infektion har lägre aviditet till antigenet än de antikroppar som produceras senare under infektionsförloppet (Björkman et al 1999). Aviditet är den totala bindningsstyrkan mellan polyklonala antikroppar och deras antigen till skillnad från affinitet som är den sammanhållande kraften för ett bindningsställe på en antikropp och dess antigen (Roitt et al 2001). Den högre aviditeten beror på att antigenet driver på urvalet av B-celler och ger en ökande anpassning mellan antigen och antikropp (Hedman et al 1993).

Två olika principer har använts för aviditets-ELISA (Hedman et al 1993). Dels kan provet spädas i ett proteindenaturerande ämne som förhindrar att antikropparna binder till antigenet. Alternativt kan detta ämne tillsättas efter att antigen-antikroppskomplexen har bildats och då lösa upp dessa bindningar. Bara de svagare bindningarna bryts, de starkare bindningarna förblir intakta. Exempel på olika proteindenaturerande ämnen som har använts är guanidine-väteklorid (Inouye et al 1984) och urea (Hedman & Säppälä 1988).

Olika applikationer för aviditets-ELISA

Inom humanmedicinen har aviditets-ELISA använts en längre tid för att tidsbestämma infektioner med bland annat Rubella-virus (Hedman & Säppälä 1988) och den encelliga parasiten *Toxoplasma gondii* (Hedman et al 1989, Lappalainen et al 1993, Jenum et al 1997).

Hos djur har metoden använts för att skilja mellan en akut och en kronisk infektion med den encelliga parasiten *Neospora caninum* hos nötkreatur

(Björkman et al 1999). Hos experimentellt infekterade kalvar sågs en ökande aviditet under infektionsförloppet. Även djur som blivit kongenitalt infekterade undersöktes och de hade vid en ålder över sex månader antikroppar med hög aviditet. En stark korrelation mellan IgG-aviditet och kronisitet har också påvisats i en besättning med kött djur (Björkman et al 2003).

Aviditets-ELISA har även använts i en studie av salmonellainfektion hos svenska och danska grisar (Wiuuff et al 2002). Antigen från en blandning av *Salmonella*-stammar som är vanliga i Danmark användes. De antikroppspositiva svenska grisarna hade en lägre aviditet än de danska djuren, vilket tolkades som att stimuleringen av immunsvaret skett på olika sätt. Det kan bero på agens, duration, infektionsdos och infektionsämnets lokalisering hos värdjuret.

SYFTE

Syftet med denna studie var att utveckla en aviditets-ELISA för BRSV samt att använda den till att fastställa durationen av en infektion.

MATERIAL OCH METODER

Prover

Del 1, naturligt infekterade kalvar

Serumprover från sju kötraskalvar användes. Fyra prover hade tagits från varje kalv, 25/8, 2/10 och 17/11 2003 samt 22/1 2004. Kalvarna var vid första provtagningen mellan fyra och åtta månader gamla. Provtagningen skedde i samband med en studie om respiratoriska sjukdomar hos svenska kötraskalvar (Hägglund et al 2005b).

Kalvarna hade anlåtit till Gismestads tjurprövningsstation tillsammans med knappt 200 andra kalvar i slutet av augusti. Alla djur kom från gårdar som var friförklarade från Bovint herpesvirus 1 och Bovint leukosvirus och alla kalvar var negativa vid provtagning för Bovint virusdiarrévirus. Inget av djuren visade vid ankomsten några kliniska symptom på sjukdom.

Kriterierna för de sju kalvarna som användes i denna studie var att de var BRSV-antikroppsnegativa vid första provtagningen i augusti och att de hade serokonverterat till provtagningen i oktober (tabell 1).

Tabell 1. BRSV-antikropps nivå analyserad med ELISA från Svanova (se bilaga 1)

Prov	Kalv						
	1	2	3	4	5	6	7
1 (2003-08-25)	0,02	0,09	0,00	0,04	0,00	0,00	0,03
2 (2003-10-02)	1,35	1,00	0,46	0,88	1,67	1,32	0,94
3 (2003-11-17)	0,97	1,88	1,40	1,76	1,98	1,79	1,84
4 (2004-01-22)	2,17	1,97	1,49	1,45	2,47	1,84	2,29

COD: <0,2: negativt, ≥0,2: positivt.

Del 2, akut infekterade kalvar med känt infektionsdatum

Serumprover från tre ”naturligt” infekterade kalvar (17, 22 och 26) med känt ungefärligt infektionsdatum användes. Proverna var tagna under en period av 57 dagar innan exponering för virus till 32 dagar efter exponering. Exponeringen bestod av att kalvarna var uppstallade i samma byggnad som en grupp experimentellt infekterade djur. Infektionsdatumet antas vara den dag då de experimentellt infekterade kalvarna utsattes för smitta, eftersom virusutsöndring från djur i de båda grupperna sammanföll.

Del 3, långvarigt antikroppspositiva kor

Prover från fem mjölkkor i samma besättning användes. Besättningen provtogs en gång om året under fyra års tid (år 2000 till och med 2003) och vid alla tillfällen hade dessa kor antikroppar mot BRSV.

Del 4, experimentellt infekterade kalvar i en vaccinstudie

Prover från fyra djur användes, dessa hade deltagit i en studie där effekten av två olika BRSV-vaccin jämförts (Hägglund et al 2004). Alla djuren var tjurkalvar av rasen SRB och kom från en sluten mjölkbesättning. De var vid det första vaccinationstillfället mellan 52 och 105 dagar gamla och hade varierande halter maternella BRSV-specifika antikroppar.

Två av kalvarna vaccinerades 11 och 37 dagar innan challenge då de fick inandas en aerosol med BRSV. Kalv 15 vaccinerades med ett ISCOM-vaccin. Den visade inga symptom på sjukdom och producerade egna antikroppar trots närvaro av maternella antikroppar vid tidpunkten för vaccineringen. Kalv 23 vaccinerades med ett kommersiellt inaktiverat vaccin. Vaccinationen gav hos denna kalv inte upphov till någon egen produktion av antikroppar. Kalven visade efter challenge kraftiga symptom på luftvägslidande och behandlades med penicillin.

Kalvarna 14 och 24 ingick som kontroller och de vaccinerades inte men utsattes för smitta på samma sätt som beskrivits ovan. Båda utvecklade allvarliga kliniska symptom och tydligt antikroppssvar.

Serumproverna som används här var tagna under en period från 85 dagar innan challenge till 32 dagar efter challenge (tabell 5).

Analysmetod

Ett kommersiellt ELISA-kit för analys av specifika BRSV-antikroppar från Svanova Veterinary Diagnostics i Uppsala användes i denna studie. Proverna späddes 1:25 och sattes i fyra brunnar, två med BRSV-antigen och två med kontrollantigen. Analysen utfördes enligt medföljande instruktioner från Svanova (bilaga 1) men efter provinokuleringen utfördes ett extra tvättsteg med urea under 5-10 minuter i två av brunnarna (en med BRSV-antigen och en kontroll; se bilaga 2). Absorbansen mättes i en spektrofotometer. En korrigerad optisk densitet (COD) beräknades med formeln $COD = OD_{BRSV} - OD_{kontroll}$. Cut-off värdet för positiva prover var $\geq 0,20$. Aviditeten beräknades genom formeln $(COD_{urea} / COD_{utan\ urea}) * 100$.



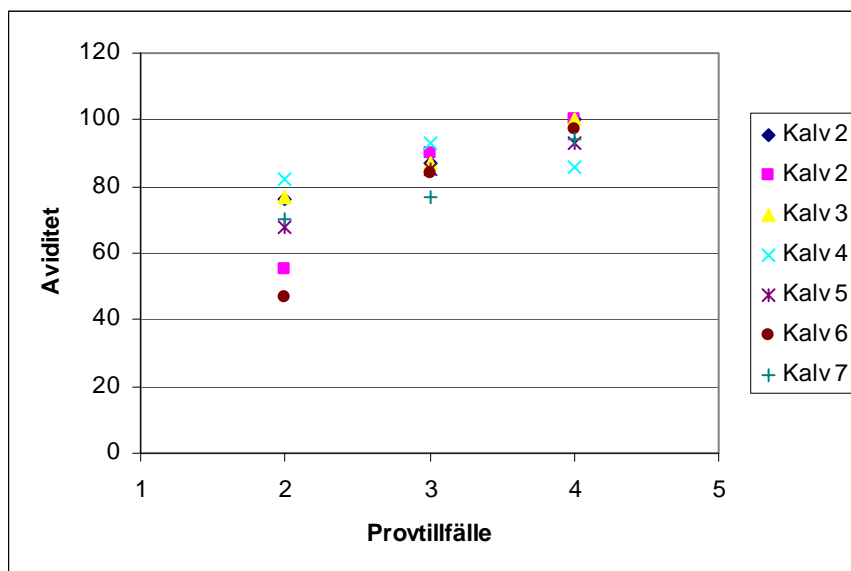
Figur 4. Material för ELISA

För en del av proverna gjordes spädningsserier för att beräkna aviditeten med hjälp av slutpunktstitrar enligt beskrivning av Jenum et al (1997). Spädningsserierna utgick från spädningen 1:25 och både tvåstegs- och femstegsspädning prövades för att nå COD-värden under cut-off-nivån.

RESULTAT

Del 1, naturligt infekterade kalvar

Efter att ha provat olika inkuberingstider med urea konstaterades att en tid på 10 minuter var bra att använda. Då COD för spädning 1:25 användes för att beräkna aviditet påvisades en stigande aviditet ju längre djuren varit infekterade (figur 5). Vid andra provtagningen var medelaviditeten 68, vid tredje 86 och vid sista 96.



Figur 5. Jämförelse av aviditet vid provspädning 1:25.

Då aviditeten som uppmäts vid olika analystillfällen för samma prov jämfördes var resultaten i stor utsträckning reproducerbara (tabell 2). Variationen mellan resultaten för olika analystillfällen av samma prov var mellan 6 och 22 (medel och median 9).

Tabell 2. Jämförelse av aviditet vid olika analystillfällen

Kalv:prov	Analystillfälle			
	1	2	3	4
1:4			100	94
2:2		47		52
3:2	57	55		
3:4	90	100		100
4:2	82		82	
4:4	100		86	
5:2			68	77
6:2		77		55
7:2	72		70	
7:4	88	94		100

De resultat som erhöles då proverna späddes (1:5 samt 1:2) var inte lika samstämmiga. Aviditeten för prover tagna vid samma tillfälle varierade kraftigt. Dessutom krävdes höga spädningar för att komma under cut-off-värdet för alla prov. Denna metod användes därför fortsättningsvis inte.

Del 2, akut infekterade kalvar med känt infektionsdatum

Två av dessa kalvar (nr 17 och 22) var först antikroppsnegativa men serokonverterade mellan dag 10 och 18 efter antagen infektion (tabell 3). Därefter sågs både en stigande antikropps nivå och en stigande aviditet. Absorbansen hos kalv 17 var till en början mycket låg och aviditeten var då den lägsta som setts under detta försök (tabell 3). Redan en kort tid efter det att antikroppar kunde påvisas var aviditeten hos båda kalvarna över 70.

Den tredje kalven hade först maternella antikroppar med hög absorbans som därefter sjönk och vid exponeringstillfället kunde inga antikroppar påvisas. De maternella antikroppar hade en hög aviditet. Mellan dag 14 och 20 kunde antikroppar återigen påvisas och därefter ökade både absorbans och aviditet något (tabell 3).

Tabell 3. Akut infekterade kalvar med känt infektionsdatum

Prov- tillfälle	Kalv					
	17		22		26	
	Absorbans	Aviditet	Absorbans	Aviditet	Absorbans	Aviditet
-57	0				1,00	100
-17			0		0,23	88
-11			0			
0 *	0		0		0	
5	0		0		0	
7	0		0		0	
10	0		0		0	
14	0		0,56	24	0	
18	0,35	7	0,61	39		
20	0,54	12	0,59	36	0,37	22
32	1,04	73	1,04	74	0,50	26

*: antaget infektionsdatum

Absorbans angiven i COD (COD: <0,20: negativt, ≥0,20: positivt)

Del 3, långvarigt antikroppspositiva kor

Alla prover tagna från de fem djuren var antikroppspositiva vid alla fyra tillfällena, de hade både hög COD och mycket hög aviditet. Det lägsta provet hade en aviditet på 84 medan majoriteten prover (13/20) hade aviditeten 100 (se tabell 4).

Tabell 4. Aviditet för antikropparna hos långvarigt antikroppspositiva kor

Prov- tagningsår	Ko				
	79	88	108	109	110
2000	92	100	88	100	100
2001	100	95	100	96	100
2002	84	97	100	100	100
2003	100	100	93	100	100

Del 4, experimentellt infekterade kalvar i en vaccinstudie

Kalv nr 15 hade först hög absorbans som därefter sjönk. Dessa maternella antikroppar hade en hög aviditet. Vid tidpunkten för challenge hade absorbansen stigit kraftigt, detta efter två vaccinationstillfällen. Antikropparna hade fortfarande en hög aviditet. Absorbansen fortsatte att ligga högt alla efterföljande provtagningarna men aviditeten var något lägre hos proverna tagna dag 10 och 14 (tabell 5).

Kalv nr 23 hade innan challenge en relativt hög absorbans och antikropparna hade en hög aviditet. Vid challenge hade absorbansen men framför allt aviditeten sjunkit. Därefter steg både absorbans och aviditet (tabell 5).

De båda kontrollkalvarna hade länge kvar maternella antikroppar med hög aviditet. Absorbansen sjönk för att sedan mot slutet åter stiga då kalvarna börjat producera egna antikroppar, dessa antikroppar hade mycket lägre aviditet (tabell 5).

Tabell 5. Kalvar i en vaccinstudie

Prov-tillfälle	Kalv							
	15+		23++		14 (kontroll)		24 (kontroll)	
	Abs.	Avi.	Abs.	Avi.	Abs.	Avi.	Abs.	Avi.
-85	1,03	100	1,30	94	1,12	100	1,30	80
-57	0,37	69	1,20	100	1,02	97	1,20	86
-37*	0,48	98	1,08	91	0,96	90	0,93	100
0**	1,78	100	1,09	78	0,66	100	0,54	77
5	1,61	92	1,30	62	0,68	53	0,40	100
10	1,62	80	1,30	98	0,23	(100)	0,25	(100)
14	1,79	74	1,47	87	0,93	48	0,47	100
20	1,52	100	1,62	81	0,86	53	0,58	48
31	1,62	98	1,65	91	1,16	71	0,81	25

Abs.: Absorbans, angiven i COD (COD: <0,2:negativt, ≥0,2:positivt)

Avi.: Aviditet

+: ISCOM-vaccinerad

++: Vaccinerad med kommersiellt vaccin

*: Första vaccinationstillfället

** : Challenge

(): osäkra värden på grund av låg absorbans

Jämförelse mellan absorbans och aviditet

Om absorbans och aviditet vid enskilda mätillfällen jämförs ser man att värdena inte alltid följs åt. Tittar man på kalv 17 i tabell 3 ser man att aviditeten stiger samtidigt som absorbansen ökar. Kalv 15 (tabell 5) däremot har vid dag -37 en COD på 0,48 och en aviditet på 98 men vid dag 14 då COD har stigit till 1,79 har aviditeten sjunkit till 74. Då alla värden som erhållits under de olika delarna av försöket jämfördes kunde en viss trend ses, men de avvikande värdena var många. Korrelationskoefficienten var 0,356.

DISKUSSION

Då aviditet hos de naturligt infekterade kalvarna beräknades med hjälp av COD för spädnings 1:25 sågs en tydlig trend med ökande aviditet vid ökad duration av infektionen. Ett problem var att exakt infektionstillfälle för kalvarna var okänt. Serokonverteringen hade skett någon gång under en period på fem veckor, vilket är en i det här sammanhanget relativt lång tid.

Resultaten då slutpunktstiter användes var inte särskilt samstämmiga. Möjliga problem här var att stora skillnader i COD mellan olika spädningssteg gör beräkningarna osäkra. Den stora skillnaden i COD kan ha berott på ett litet fel under spädningen. Ett ytterligare problem var att det krävdes en mycket hög spädning för att komma under cut-off-värdet för alla prover.

Hos en av de akut infekterade kalvarna med känt infektionsdatum fanns maternella antikroppar i början men vid tiden för infektion hade dessa försvunnit. Detta innebar att de antikroppar som detekterades efter infektionen bara var producerade av kalven. Resultaten här var väldigt samstämmiga, aviditeten var till att börja med låg och steg därefter snabbt. Dessa mycket låga aviditetsvärdena under tidig infektion hade troligtvis missats hos de naturligt infekterade kalvarna från Gismestad.

Korna hade vid alla provtagningar antikroppar med hög aviditet. Troligtvis rör det sig om tidiga infektioner som gett ett långvarigt antikroppssvar men det går inte att helt utesluta att djuren har blivit reinfekterade eller t.o.m. är kroniskt infekterade. Tidigare har det visats att de antikroppar som produceras vid reinfektion av *Neospora caninum* har hög aviditet redan från början (Aguado-Martínez et al 2005).

Även hos en del kalvar i vaccinförsöket fanns det maternella antikroppar. Att de är av maternellt ursprung har fastställts tidigare (Hägglund et al 2004). Dessa antikroppar hade i de flesta fall en hög aviditet (mellan 69 och 100), vilket tyder på att mödrarna inte var akut infekterade under den tid de producerade råmjölk. En del av värdena som erhöles under tiden det fanns maternella antikroppar är svårtolkade och det går därför inte att komma fram till några säkra slutsatser.

De två vaccinerade kalvarna hade olika antikroppssvar och kalven som var vaccinerad med ett kommersiellt vaccin (nr 23) fick kliniska symptom och var sjuk till och med dag 10 men den ISCOM-vaccinerade kalven (nr 15) förblev frisk. Hos kalv 15 hade de maternella antikropparna börjat försvinna vid tiden för den första vaccinationen och vid tiden för challenge hade vaccinet börjat ge upphov till en antikropsproduktion, dessa antikroppar hade en hög aviditet. Då aviditeten gick ner något efter challenge kan det ha funnits maternella antikroppar kvar som påverkat och gett en högre aviditet vid challenge än vad bara de egenproducerade antikropparnas aviditet. Vid sista provet är aviditet åter hög vilket tyder på att kalven efter challenge snabbt har fått ett bra antikroppssvar.

Hos kalven som är vaccinerad med ett kommersiellt vaccin ses ingen tydlig absorptionsminskning som tyder på att de maternella antikropparna har försvunnit, men dessa kan ha försvunnit i samband med att kalven börjat producera egna antikroppar. Att aviditeten har gått ner vid tiden för challenge talar för att så är fallet. COD går ner något efter challenge vilket kan innebära att det går åt en del antikroppar till kroppens försvar. Aviditeten går ner även efter challenge för att åter stiga mot slutet av försöket då kalven har en egen produktion av antikroppar med hög aviditet. Att ISCOM vaccinet ger en produktion av antikroppar med högre aviditet än det kommersiella vaccinet kan vara en del av att det ger ett bättre skydd mot sjukdom.

En faktor som påverkar resultaten genom hela studien är att de aviditetsvärden som beräknas på positiva prover med lågt COD ($<0,25$) är mycket osäkra, det har tidigare visats i studier av aviditeten hos antikroppar mot *Neospora caninum* (Björkman et al 1999). En annan osäkerhetsfaktor är att proverna har körts som enkelprover i stället för som dubbelprover då säkrare resultat kan uppnås. Detta på grund av kostnadsskäl.

Ett möjligt användningsområde för denna test är att vid respiratorisk sjukdom med bara ett serumprov fastställa om symptomen orsakas av en BRSV-infektion. I nuläget måste parprover tas för att undersöka en eventuell titerstegring. På detta sätt kan man fastställa om antikropparna är producerad i en akut fas av sjukdomen då kliniska symptom kan uppstå eller om det är sent producerade antikroppar och det i så fall är något annat agens som orsakar de kliniska symptomen.

Analysen kan även vara av intresse i forskningsprojekt då det finns behov av att fastställa durationen av infektionen.

SLUTSATS

Tidigt under en infektion med BRSV har antikropparna en låg aviditet, därefter följer en märkbar stigning. Denna stigning kommer snabbt och kan vara lätt att missa. Tendensen är att en månad efter infektionstillfället ligger aviditeten över 70. Antikroppar producerade av tidigt infekterade djur har hög aviditet, likaså maternella antikroppar. Det finns inte något tydligt samband mellan aviditet och absorptions.

SAMMANFATTNING

Bovint respiratoriskt syncytialt virus (BRSV) är en vanlig orsak till luftvägslidanden hos unga nötkreatur. Viruset ger stora förluster och dödligheten i en besättning kan vara så hög som 20 %. I den här studien undersöktes aviditeten (den totala bindningskraften mellan en polyklonal antikropp och dess antigen) hos BRSV-specifika antikroppar för att se om det var någon skillnad mellan antikroppar som producerats i en akut fas av infektion och antikroppar producerade av ett djur som varit seropositivt en längre tid.

Ett kommersiellt ELISA-testkit mot BRSV-specifika antikroppar användes och en tvätt med 6M urea lades till. Principen är att urean bryter de svaga bindningarna mellan antigen och antikropp medan de starka bindningarna förblir opåverkade.

Fyra olika djurgrupper undersöktes; sju kalvar som var naturligt infekterade, tre akut infekterade kalvar med känd infektionstid, fem kor som var seropositiva under en längre tid och fyra experimentellt infekterade kalvar som ingått i en vaccinstudie.

Resultaten som sågs i denna studie var att antikropparna som producerades i en akut fas av infektionen hade en låg aviditet och att aviditeten steg ju längre tid som gått från infektionstillfället. Antikroppar hos djur som varit seropositiva under en lång tid samt antikroppar av maternellt ursprung hade hög aviditet. Det var inget starkt samband mellan mängden antikroppar och aviditeten.

TACK

Först och främst till min handledare Camilla Björkman för hennes stora engagemang. Hon har alltid haft tid över när det har behövts. Sara Hägglund, min biträdande handledare, för hjälp med provmaterial och synpunkter på min text angående BRSV. Maj Hjort, SVA, för att ha lärt mig analysmetoden jag har använt mig av. Slutligen, Katarina Näslund för hjälp med en del av beräkningarna.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aguado-Martínez A., Álvarez-Garcá A., Arnaiz-Seco I., Innes E. & Ortego-Mora L.M. (2005) Use of avidity enzyme-linked immunosorbent assay and avidity Western blot to discriminate between acute and chronic *Neospora caninum* infection in cattle. J Vet Diagn Invest 17: in press.
- Bengtsson B. & Viring S. (2000) Luftvägsinfektioner – projekt, panorama och behandlingsstrategier. Föredrag vid veterinärmötet 2000, Uppsala.
- Björkman C., McAllister M., Frössling J., Näslund K., Leung F. & Uggla A. (2003) Application of the *Neospora caninum* IgG avidity ELISA in assessment of chronic reproductive losses after an outbreak of neosporosis in a herd of beef cattle. J Vet Diagn Invest 15:3-7.
- Björkman C., Näslund K., Stenlund S., Maley S., Buxton D. & Uggla A. (1999) An IgG avidity ELISA to discriminate between recent and chronic *Neospora caninum* infection. J Vet Diagn Invest 11:41-44.
- Bryson D., McNulty M., Logan E. & Cush P. (1983) Respiratory syncytial virus pneumonia in young calves: Clinical and pathological findings. Am J Vet Res 44 no 9: 1648-1655.
- Gershwin L., Schelegle E., Gunther R., Anderson M., Woolums A., Larochelle D., Boyle G., Friebertshauer K. & Singer R. (1998) A bovine model of vaccine enhanced respiratory syncytial virus pathophysiology. Vacc 16 no 11:1225-1236.
- Fulton R., Confer A., Burge L., Perino L., d'Offay., Payton M. & Mock R. (1995) Antibody response by cattle after vaccination with commercial viral vaccine containing bovine herpesvirus-1, bovine viral diarrhoea virus, parainfluenza-3 virus and bovine respiratory syncytial virus immunogens and subsequent revaccination at day 140. Vacc 13 no 8:725-733.
- Hedman K., Lappalainen M., Seppälä I. & Mäkelä O. (1989) Recent Primary Toxoplasma Infection Indicated by a low Avidity of Specific IgG. J Infect Dis 159:736-740.
- Hedman K., Lappalainen M., Söderlund M. & Hedman L. (1993) Avidity of IgG in Serodiagnosis of infectious diseases. Reviews in Medical Microbiology 4:123-129.
- Hedman K. & Seppälä I. (1988) Recent Rubella Virus Infection Indicated by a Low Avidity of Specific IgG. J Clin Immunol 8:214-221.
- Hägglund S., Hjort M., Graham DA., Törnquist M. & Alenius S. (2005b) A six-year study on respiratory viral infections in beef calve. Paper II, Epidemiology, Detection and Prevention of Respiratory Virus Infections in Swedish Cattle, Doctoral Thesis 2005:121, SLU
- Hägglund S., Hu K-F., Larsen L-E., Hakhverdyan M., Valarcher J-F., Taylor G., Morein B., Belák S. & Alenius S. (2004) Bovine respiratory syncytial virus ISCOMs-protection in the presence of maternal antibodies. Vaccin 23:646-655.
- Hägglund S., Svensson C., Emanuelson U., Valarcher J. & Alenius S. (2005a) Dynamics of virus infections involved in the bovine respiratory disease complex in Swedish dairy herds. Vet J, article in press.
- Inouye S., Hasegawa A., Matsuno S, Katow S. (1984) Changes in antibody avidity after virus infections: detection by an immunosorbant assay in which a mild protein-denaturing agent is employed. J Clin Microbiol 20(3):525-529.
- Jenum P., Strav-Pedersen B. & Gundersen AG. (1997) Improved Diagnosis of Primary *Toxoplasma gondii* Infection in Early Pregnancy by Determination of Antitoxoplasma Immunoglobulin G Avidity. J Clin Microbiol 35:1972-1977.

- Kimman T., Straver P. & Zimmer G. (1989a) Pathogenesis of naturally acquired bovine respiratory syncytial virus infection in calves: Morphologic and serologic findings. *Am J Vet Res* 50 No 5:684-693.
- Kimman T., Westenbrink F., Schreuder B. & Straver P. (1987) Local and Systemic Antibody Response to Bovine Respiratory Syncytial Virus Infection in Calves with and without Maternal Antibodies. *J Clin Microbiol* 25 no 6:1097-1106.
- Kimman T., Westenbrink F. & Straver P. (1989b) Priming for Local and Systemic Antibody Memory Responses to Bovine Respiratory Syncytial Virus: Effect of Amount of Virus, Virus Replication, Route of Administration and Maternal Antibodies. *Vet Immunol Immunopathol* 22:145-160.
- Kimman T., Zimmer G., Westenbrink F., Mars J. & van Leeuwen E. (1988) Epidemiological study of bovine respiratory syncytial virus infection in calves: Influence of maternal antibodies on the outcome of the disease. *Vet Rec* 123:104-109.
- Lappalainen M., Koskela P., Koskinniemi M., Ämmälä P., Hiilesmaa V., Teramo K., Raivio K., Remington J. & Hedman K (1993) Toxoplasmosis Acquired during Pregnancy: Improved Serodiagnosis Based on Avidity of IgG. *J Infect Dis* 167:691-697.
- Larsen L. (2000) Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV): A Review. *Acta vet scand* 41:1-24.
- Lerch R., Stott J. & Wertz G. (1989) Characterization of Bovine Respiratory Syncytial Virus Protein and mRNAs and Generation of cDNA Clones to the Viral mRNAs. *J Virol* 63 no 2:833-840.
- Lokensgard B., Goyal S. & Krueger D. (1992) Comparison of three immunoassay for the rapid detection of bovine respiratory syncytial virus. *Microbiologica* 15: 259-264.
- Mars M., Brusckhe C., Oirschot J. (1999) Airborne transmission of BHV1, BRSV and BVDV among cattle is possible under experimental conditions. *Vet Microbiol* 66:197-207.
- Mohanty S., Rockemann D., Davidsson J., Sharabrin O. & Forst S. (1981) Effects of Vaccinal Serum Antibodies on Bovine Respiratory Syncytial Viral Infection in Calves. *Am J Vet Res* 42 no 5: 881-883.
- Murphy F., Gibbs P. & Horzinek M. & Studdert M. (1999) *Veterinary Virology*. 3 ed. Academic Press, San Diego.
- Roitt I., Brostoff J. & Male D. (2001) *Immunology*. 6 ed. Harcourt Publishers Limited.
- Schrijver R.S. & Kramps J.A. (1998) Critical factors affecting the diagnostic reliability of enzyme-linked immunosorbant assay formats. *Rev sci tech Off Int Epiz* 17 (2): 550-561.
- Taylor G., Bruce C., Barbet A., Wyld S. & Thomas L. (2005) DNA vaccination against respiratory syncytial virus in young calves. *Vaccin* 23:1242-1250.
- Taylor G. & Stott L. (1989) Effect of vaccination on cell population in lung washes from calves after infection with respiratory syncytial virus. *Res Vet Sci* 47:231-235.
- Thomas L., Cook R., Howard C., Gaddum R. & Taylor G. (1996) Influence of selective T-lymphocyte depletion on the lung pathology of gnotobiotic calves and the distribution of different T-lymphocyte subsets following challenge with bovine respiratory syncytial virus. *Res Vet Sci* 61:38-44.
- Thomas L. & Stott E. (1981) Diagnosis of respiratory syncytial virus infection in the bovine respiratory tract by immunofluorescence. *Vet Rec* 108: 432-435.

- Uttenthal Å., Jensen N. & Blom J. (1996) Viral aetiology of enzootic pneumonia in Danish dairy herds: diagnostic tools and epidemiology. *Vet Rec* 139:114-117.
- Uttenthal Å., Larsen L-E., Philipsen S., Tjornehoj K., Viuff B., Nielsen K. H., Krogh Nielsen T. (2000) Antibody dynamics in BRSV-infected Danish dairy herds as determined by isotype-specific immunoglobulins. *Vet Microbiol* 76:329-341.
- Van der Poel W., Langedijk J., Kramps J., Middel W., Brand A & Oirschot J. (1997) Serological indication for persistence of bovine respiratory syncytial virus in cattle and attempts to detect the virus. *Arch Virol* 142:1681-1696.
- Viuff B., Uttenthal Å., Tegmeir C. & Alexandersen S. (1996) Sites of Replication of Bovine Respiratory Syncytial Virus in Naturally Infected Calves as Determined by In Situ Hybridization. *Vet Pathol* 33:383-390.
- Wellems G. (1990) *Virus Infections of Ruminants*. Elsevier Science Publisher B.V.
- Westernbrink F., Brinkhof J., Straver P., Quak J. & De Leeuw P. (1985) Comparison of a newly developed enzyme-linked immunosorbant assay with complement fixation and neutralisation tests for serology of bovine respiratory syncytial virus infection. *Res Vet Sci* 38:334-340.
- Wiuff C., Thorberg B-M., Engvall A. & Lind P. (2002) Immunochemical analyses of serum antibodies from pig herds in a *Salmonella* non-endemic region. *Vet Microbiol* 85:69-82.

BILAGA 1, METODBESKRIVNING FÖR SVANOVAS BRSV-ELISA

Bovine Respiratory Syncytial Virus (BRSV-Ab) SVANOVIR™

ELISA test for the detection of BRSV antibodies in serum and milk

Interpretation of the results

Criteria for test validity

To ensure validity the Positive Control Serum / Milk should have an OD_{cut-off} greater than 0.5 and the Negative Control Serum/Milk should have an OD_{cut-off} of less than 0.2. For invalid tests, technique may be suspected the assay should be repeated.

Calculation of Cut-off

$$A = OD_{\text{or regular}} \times 2.0$$

If A > 0.2: Use A as your Cut-off

If A < 0.2: Use 0.2 as your Cut-off

Interpretation

All samples with an OD_{cut-off} greater than Cut-off, are considered as positive.

All samples with an OD_{cut-off} lower than Cut-off, are considered negative.

References

1. Todd, M. et al. (1989). Comparison of caprine herpes and bovine respiratory syncytial virus. *Arch. Virol.* 107: 141-149.
2. Verboff, J., Van der Ben, M., and van Nieuwerck, A.P.K.M.L. (1984). Bovine respiratory syncytial virus infections in young dairy calves and haematological findings. *Vet. Rec.* 114: 9-12.
3. Kuhn, R.F. (1983). Respiratory syncytial virus. In *Viral Diseases of Cattle*. Edited by Robert F. Kuhn. The Iowa State University Press. Ames, Iowa, pp. 215-220.
4. Westrom, E. et al. (1989). Analysis of the antibody response to bovine respiratory syncytial virus proteins in calves. *J. Gen. Virol.* 70: 391-391.

5. Juuti, N., Larsson, B., and Foram, C. (1987). The use of monoclonal antibodies in enzyme linked immunosorbent assays for detection of antibodies to bovine viral diarrhoea virus. *J. Vet. Med. B* 34: 356-363.
6. Niskanen, R., Alenius, S., Larsson, B., and Juuti, N. (1989). Evaluation of an enzyme linked immunosorbent assay for the detection of antibodies to bovine virus diarrhoea virus in milk. *J. Vet. Med. B* 36: 113-118.

Manufacturer

Svanova Biotech AB
Uppålla Science Park
SE-751 83 Uppålla, Sweden
Phone +46 18 65 49 00. Fax +46 18 65 49 99
info@svanova.com www.svanova.com
Customer Service
Phone +46 18 65 49 15. Fax +46 18 65 49 99
customer.service@svanova.com

Reference: 15-250-0034

General information

Bovine respiratory syncytial virus (BRSV), a pneumovirus, has a counterpart in the human RSV, affecting the respiratory tract of mainly infants. Also, a related caprine RSV is known. The virus name derives from large syncytial masses formed in infected cell cultures. Bovine RSV is associated with upper and lower respiratory tract diseases primarily affecting calves less than 12 months old and in milking cows. The initial symptoms of the disease include pyrexia, coughing, ocular, and nasal discharge. The occurrence of anorexia, trachypnoea, and dyspnoea indicates a more serious, advanced stage of the disease which may lead to fatal pneumonia. RSV is transmitted horizontally by direct contact with respiratory secretions (aerosol infection). Infection is facilitated by crowding during the milking process and when animals are housed during the winter months.^{1,2} Newly acquired calves should be isolated and monitored for the presence of infection to prevent contamination of uninfected herds. The antibody response to RSV infection is well-documented and facilitates a rapid diagnosis.³

Principle

The Bovine Respiratory Syncytial Virus-ab ELISA kit is designed to detect BRSV specific antibodies in blood serum or milk samples. The

This manual covers the following BRSV-Ab ELISA kit: Article number 10-250-042

kit procedure is based on a solid phase indirect Enzyme Linked Immunosorbent Assay (Indirect ELISA). In this procedure, samples are exposed to noninfectious RSV antigen coated wells on microtitre plates or strips. RSV antibodies (if present in the test sample) bind to the antigens in the well. HRP conjugate added subsequently forms a complex with the RSV antibodies. Unbound material is removed by rinsing before the addition of a substrate solution. Subsequently a blue colour develops which is due to the conversion of the substrate by the conjugate. A positive result is indicated by development of the blue colour. The reaction is stopped by addition of the stop solution; the colour changes to yellow. The result can be read visually or by a microplate photometer, where the optical density (OD) is measured at 450 nm.

Contents

- RSV viral antigen and control antigen coated microtitre strips, odd columns coated with viral antigen and even columns with control antigen (sealed and stored dry)
- Lyophilized HRP Conjugate (horseradish peroxidase conjugated anti-bovine IgG monoclonal antibodies)
- PBS-Tween Solution 20 x concentrate
- Substrate Solution - (tetramethylbenzidine in substrate buffer containing H₂O₂) - STORE IN THE DARK!
- Stop Solution - Contains sulphuric acid - COARROSIVE

- A. Positive Control Serum - 0.05% methiodate
 - B. Negative Control Serum - 0.05% methiodate
 - C. Positive Control Milk - 0.05% methiodate
 - D. Negative Control Milk* - 0.05% methiodate
- * optional

Materials needed but not provided

1. Precision pipets (range from 4 to 200 µl)
2. Disposable pipettips
3. Distilled water
4. Washbottle
5. 1 container: 1 to 2 litres for PBS-Tween
6. Microplate photometer, 450 nm filter

Specimen information

Serum: 4µl of blood serum or plasma needed for each sample well. Fresh, refrigerated, or previously frozen serum or plasma may be tested.

Milk: 100µl of skim milk is required for each sample well. Milk samples must be centrifuged for 15 minutes at 2000 x g to remove the lipid layer.

Preparation of reagents

PBS-Tween Buffer: Dilute the PBS-Tween Solution 20 x concentrate 1/20 in distilled water. Prepare 500 ml per plate by adding 25 ml PBST solution to 475 ml distilled water and mix thoroughly.

N.B. Please check that there is no crystal precipitation in the bottle. If crystals are seen, please warm and shake well.

Anti-Bovine IgG Conjugate: Reconstitute the lyophilized HRP Conjugate with 11.5 ml PBS-Tween Buffer. Add the buffer carefully to the bottle. Leave the solution one minute and mix thoroughly. Prepare immediately before use. The remaining reconstituted conjugate can be stored at -20°C and thawed and refrozen up to 3 times.

Precautions

1. Carefully read and follow all instructions.
2. Store the kit and all reagents at +2 to +8°C (35 to 45°F)
3. All reagents should equilibrate to room temperature 18 to 25°C (64 to 77°F) before use.
4. Handle all materials according to the Good Laboratory Practice.
5. Do not mix components or instruction booklets from different test kit batches.
6. Care should be taken to prevent contamination of kit components.
7. Do not use test kit beyond date of expiry.
8. Do not eat, drink, or smoke where specimens or kit reagents are handled.
9. Use a separate pipette tip for each sample.
10. Do not pipet by mouth.
11. Include positive and negative serum and /or milk controls on each plate or test strip series.
12. Use only distilled water for preparation of reagents.
13. The Stop Solution contains sulphuric acid, which is corrosive.
14. All unused biological materials should be disposed according to the local, regional and national regulations.

Recommendations!

The volume of the reagents is sufficient for at least 8 separate test occasions. Strips with broken seal can be stored at +2 to +8°C for up to 4 weeks. Reconstituted conjugate may not be stored in refrigerator.

Procedure

1. All reagents should equilibrate to room temperature 18 to 25°C (64 to 77°F) before use. Label each strip with a number.
2. **Serum Samples**
A. Add 100 µl of PBS-Tween Buffer to each well that will be used for serum samples and serum controls.
B. Add 4 µl of Positive Control Serum (Reagent A) and 4 µl of Negative Control Serum (Reagent B) respectively, to selected wells coated with BRSV viral antigen and to corresponding wells coated with control antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the control sera in duplicates.
C. Add 4 µl of serum sample to selected well coated with BRSV viral antigen and to corresponding well coated with control antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.
3. **Milk Samples**
A. Add 100 µl of Positive Control Milk (Reagent C) and 100 µl of Negative Control Milk (Reagent D) respectively, to selected wells coated with BRSV viral antigen and to corresponding wells coated with control antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the control milk in duplicates.
B. Add 100 µl of skim milk sample to a selected well coated with BRSV viral antigen and to a corresponding well coated with control antigen. For confirmation purposes it is recommended to run the samples in duplicates.
4. Shake the plate thoroughly. Seal the plate/strip and incubate at 37°C (98.6°F) for 1 hour.
5. Rinse the plate/strips 3 times with PBS-Tween Buffer: fill up the wells at each rinse, empty the plate and tap hard to remove all remains of fluid.
6. Add 100 µl of HRP Conjugate to each well and incubate at 37°C (98.6°F) for 1 hour.
7. Repeat step #6.
8. Add 100 µl Substrate Solution to each well. Incubate for 10 minutes at room temperature (18 to 25°C). Begin timing when the first well is filled.
9. Stop the reaction by adding 50 µl of Stop Solution to each well and mix thoroughly. Add the Stop Solution in the same order as the Substrate Solution in step #8.
10. Measure the optical density (OD) of the controls and samples at 450 nm in a microplate photometer (use air as blank). Measure the OD within 15 minutes after the addition of Stop Solution to prevent fluctuation in OD values.

Calculations

The optical density (OD) values in wells coated with BRSV are corrected by subtracting the OD values of the corresponding wells containing the control antigen, (OD_{cor}). All controls and samples OD values should be corrected before results are interpreted.
OD_{ser} - OD_{control} = OD_{cor}

BILAGA 2, METODBESKRIVNING FÖR AVIDITETS-ELISA

1. PBS-Tween bufferten förbereds genom att 25 ml PBS-Tween lösning späds med 475 ml destillerat vatten, detta blandas noggrant.
2. Anti-bovin IgG-konjugatet förbereds genom att tillsätta 11,5 ml PBS-Tween buffert till lyofiliserat HRPkonjugatet.
3. 6M urea i PBS-tween buffert förbereds.
4. Reagenserna anpassas till rumstemperatur.
5. 100 µl PBS-Tween buffert tillsätts all brunnar som ska användas.
6. 4µl positiv respektive negativ kontroll tillsätts fyra brunna.*
7. 4 µl av proverna som ska analyser tillsätts fyra brunnar.*
8. Plattan skakas försiktigt, täcks med plastfilm och inkuberas 1 timme i 37°C.
9. Plattan tvättas en gång med PBS-Tween buffert. (Brunnarna fylls och töms varefter plattan slås mot papper för att få bort kvarvarande vätska.)
10. 100 µl PBS-Tween buffert tillsätts de första två kolumnerna (en med antigen och en kontroll) med varje prov och 100 µl urea tillsätts de två efterföljande kolumnerna. Plattan inkuberas 10 minuter i 37°C.
11. Plattan tvättas med PBS-tween buffert två gånger.
12. 100 µl HRP-konjugat tillsätts alla brunnar och plattan inkuberas 1 timme i 37°C.
13. Plattan tvättas med PBS-tween buffert tre gånger.
14. 100 µl substratlösning tillsätts alla brunnar. Plattan inkuberas 10 minuter i rumstemperatur.
15. Reaktionen avbryts genom att tillsätta 50 µl stopplösning till alla brunnar. Denna ska tillsättas i samma ordning som substratlösningen.
16. Slutligen avläses den optiska densiteten av prover och kontroller vid 450 nm i en fotometer. Mätningen ska ske inom 15 minuter från det att stopplösningen tillsatts för att förhindra fluktuationer av värdena.
17. En korrigerad optisk densitet beräknas genom att subtrahera kontrollvärdet från provvärdet.

*Varannan kolumn innehåller antigen medan de andra kolumnerna är kontroller utan antigen. Genom att tillsätta kontroller och prover i fyra brunnar får man ett korrigerat OD för både prov utan ureainkubering och prov med ureainkubering.

Översättning och modifiering av instruktioner till Svanovas BRSV-ELISA.