



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap** Institutionen för
biomedicin och
veterinär
folkhälsvetenskap

Dromedarens roll vid spridning av Middle East respiratory syndrome coronavirus

*Lotta
Hägglom*

Uppsala 2015

*Kandidatarbete 15 hp inom
veterinärprogrammet Kandidatarbete
2015:19*

Dromedarens roll vid spridning av Middle East respiratory syndrome coronavirus

The role of the dromedary camel in transmitting Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus

Lotta Häggblom

Handledare: Susanna Sternberg Lewerin, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Examinator: Eva Tydén, institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Kandidatarbete i veterinärmedicin

Omfattning: 15 hp

Nivå och fördjupning: grund nivå, G2E

Kurskod: EX0700

Utgivningsort: Uppsala

Utgivningsår: 2015

Serienamn: Veterinärprogrammet, examensarbete för kandidatexamen / Sveriges lantbruksuniversitet,
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

Delnummer i serie: 2015:19

Elektronisk publicering: <http://stud.epsilon.slu.se>

Nyckelord: MERS-CoV, dromedar, smittspridning

Key words: MERS-CoV, dromedary camel, transmission

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

Sammanfattning	1
Summary	2
Inledning.....	3
Material och metoder	3
Litteraturoversikt.....	3
Middle East respiratory syndrome coronavirus	3
MERS-CoV - tropism och replikation	4
Gamla världens kameler	5
Replikation och utsöndring i övre luftvägarna hos inokulerade dromedarer.....	5
Förekomsten av MERS-CoV hos dromedar	6
Stabilitet i mjölk och miljö	8
Smittspridning mellan dromedar och människa	9
MERS-CoV hos andra djurslag	11
Diskussion	12
Litteraturförteckning	15

SAMMANFATTNING

Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) är ett virus som först observerades hos en patient år 2012 på ett sjukhus i Saudiarabien. Viruset orsakar luftvägssymptom och ibland gastrointestinala symptom. Dödligheten hos människa är över 30%. Eftersom tidigare erfarenhet har visat att nya coronavirus ofta har sitt ursprung i en djurpopulation har många studier gjorts för att undersöka spridningen av MERS-CoV och förekomsten av en eller flera reservoarer. Denna litteraturstudie har som mål att undersöka vilka bevis det finns för dromedarens roll i smittspridningen av MERS-CoV.

Då flera seroepidemiologiska studier gjorts som visar att MERS-CoV eller ett nära besläktat virus har cirkulerat i dromedarpopulationen i över 20 år har man gått vidare och undersökt bl.a. replikation och tropism i olika cellinjer. Då dessa också har indikerat att MERS-CoV kan infektera dromedarer har en studie där forskarna inokulerat dromedarer gjorts. Resultaten visade att dromedarer utsöndrar stora mängder infektiöst virus i sitt nossekret vid infektion.

I fallstudier där dromedarägare insjunkat efter att ha haft nära kontakt med sina djur har man kunnat visa att gensekvenserna hos MERS-CoV från ägarna och dromedarerna matchar varandra. MERS-CoV-sekvenser från dromedarer framtagna i andra studier har visat sig vid fylogenetisk analys vara väldigt lika de MERS-CoV-sekvenser som isolerats från humanfall, dessutom har man kunnat visa ett geografiskt samband. Då man inte kunnat visa att MERS-CoV-antikroppar förekommer hos andra husdjur än så länge så är det troligt att dromedaren utgör en reservoar för MERS-CoV.

MERS-CoV verkar också vara ganska stabilt i mjölk och miljö. Opastöriserad dromedarmjök skulle kunna vara en smittväg men fler studier behövs. I miljön håller sig viruset infektiöst i upp till 48 timmar, det samma gäller då viruset finns i aerosolform. Dessa resultat tillsammans med att virus utsöndras i nossekret stöder smittspridning genom antingen direktkontakt eller indirekt via droppsmitta eller via objekt.

Det verkar som om humana primärfall får MERS-CoV zoonotiskt och att smittspridning sedan sker från människa till människa på sjukhus och i hemmen. Alla primärfall rapporterar dock inte kontakt med dromedarer eller dromedarprodukter, fler studier för att undersöka epidemiologin hos MERS-CoV behövs alltså. Större fokus borde också läggas på att undvika sekundärfall på sjukhus och i hemmiljö.

SUMMARY

Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) is a virus that was first observed in a patient admitted to a hospital in the Kingdom of Saudi Arabia in 2012. Symptoms of MERS-CoV infection include respiratory, and in some cases, gastrointestinal symptoms. Middle East respiratory syndrome coronavirus infection has a mortality rate in humans of over 30 per cent. Earlier experience has shown that animal reservoirs are often the origin of novel coronavirus infections. Much effort has therefore been made to study the ways MERS-CoV is transmitted and in identifying animal reservoirs. The aim of this essay is to explore the evidence for the role of the dromedary camel in transmitting MERS-CoV.

Many serologic studies analysing the prevalence of antibodies in dromedary camels have been conducted. The results indicate that MERS-CoV or a very closely related virus has been circulating in the dromedary camel population for over 20 years. Further the replication and tropism of MERS-CoV has been studied in cell lines and when they implicated the dromedary camel as a possible host an inoculation experiment on dromedary camels was carried out. Results show that dromedary camels infected with MERS-CoV shed large quantities of virus in their nasal secretions.

In cases where dromedary camel farm owners have been infected with MERS-CoV after close contact with their dromedary camels it has been shown that virus sequences obtained from the animals match the sequences isolated from the owners. Phylogenetic analyses of MERS-CoV isolated from dromedary camels in other studies suggest that the sequences match those of human MERS-CoV cases and that the similarities can be explained by geographic location. The existence of MERS-CoV antibodies in other livestock species has not been proven, therefore it is likely that the dromedary camel is an animal reservoir for MERS-CoV.

MERS-CoV seems to be quite stable in milk and in the environment. Raw camel milk could be a source of transmission but more studies on the subject are needed. The virus remains contagious in the environment for 48 hours, the same applies when the virus is in an aerosol form. All these results indicate that MERS-CoV is transmitted via nasal secretions by direct contact or indirectly by droplet transmission or transmission by fomites.

It seems like primary human cases are infected by zoonotic transmission and that secondary human to human transmission occurs in hospitals and in family clusters. Contact with dromedary camels or related products are not reported by all primary cases. More studies focusing on the different transmission routes for MERS-CoV are needed.

INLEDNING

Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) är ett nytt virus som först observerades hos en patient år 2012 och efter detta har fler fall rapporterats, ofta med hög dödlighet. Vid SARS-epidemin som började år 2002 fann man att epidemin hade sitt ursprung från en reservoar på djursidan och man misstänkte att så också kunde vara fallet med MERS-CoV. Många seroepidemiologiska studier har gjorts som visar att dromedarer har antikroppar mot MERS-CoV och man har även kunnat isolera infektiöst virus från dromedarer. Men även om det finns fall där man misstänker smitta från dromedar till människa så rapporterar inte alla primärfall att de haft kontakt med dromedarer eller dromedarprodukter innan insjuknande. Dessutom har man inte kunnat visa att slakteriarbetare bär på antikroppar mot MERS-CoV vilket tyder på att smitta mellan dromedar och människa är ovanligt. Exakt hur MERS-CoV smittar människan är alltså inte ännu klarlagt trots att dromedaren verkar vara en reservoar.

Syftet med denna kandidatuppsats är att undersöka dromedarens roll vid smittspridning av MERS-CoV till människa.

MATERIAL OCH METODER

Sökningar i de vetenskapliga databaserna Web of Science, Pub Med och Scopus med sökorden: (MERS OR MERS-CoV OR "Middle East respiratory syndrome" OR "Middle East respiratory syndrome coronavirus") AND (camel OR "dromedary camel" OR "camelus dromedarius") i olika kombinationer. Artiklar på språk förutom engelska exkluderades.

Kontroll av utvalda artiklars källförteckningar gav fler relevanta referenser.

LITTERATURÖVERSIKT

Middle East respiratory syndrome coronavirus

Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) ger upphov till Middle East respiratory syndrome (MERS) hos människa och är ett coronavirus som först observerades hos en 60 år gammal man som togs emot på ett privat sjukhus i Saudiarabien i juni 2012 (Zaki *et al.*, 2012).

Från detta fram till den 5 februari 2015 har 971 bekräftade humanfall rapporterats in till World Health Organization (WHO), av dessa har åtminstone 356 dött. Medianåldern hos de drabbade är 48 år och 63,5% av de drabbade är män. Sedan det första fallet i Saudiarabien har fall av MERS-CoV också rapporterats från Egypten, Iran, Jordanien, Kuwait, Libyen, Oman, Qatar, Förenade Arabemiraten, Yemen, Algeriet, Tunisien, Österrike, Frankrike, Tyskland, Grekland, Italien, Nederländerna, Turkiet, Storbritannien, Malesien, Filippinerna och USA. Majoriteten av fallen rapporteras från Saudiarabien. (WHO, 2015)

MERS-CoV hör till familjen *Coronaviridae* som är stora, pleomorfa virus med hölje. Den genetiska informationen finns i en molekyl av lineärt, positive-sense, enkelsträngat RNA. Coronavirus replikerar i cytoplasman i cellerna och muterar lätt vilket leder till genetiskt avvikande stammar. (Quinn *et al.*, 2011)

Enligt en deskriptiv studie gjord av Assiri *et al.* (2013) utgående från 47 fall så är de vanligaste inledande symptomen hos patienter med MERS-CoV feber, feberfrossa, hosta, andningssvårigheter och myalgi. Även gastrointestinala symptom, såsom diarré, kräkning och magont förekommer. Dödligheten ökar ju äldre patienten är och samtidig sjukdom hos patienten verkar öka både risken av att drabbas av MERS-CoV samt risken av att infektionen har dödligt förlopp (Assiri *et al.*, 2013).

Smittspridning

En stor del av människorna smittas av MERS-CoV på sjukhus eller i hemmamiljö. Eftersom MERS-fall rapporterats från flera olika områden i Saudiarabien är det troligt att zoonotisk smitta sker och att viruset sedan sprids vidare från människa till människa i sjukhusmiljöer samt i hemmen. MERS-CoV verkar ändå inte kunna sprida sig oavbrutet från människa till människa under längre perioder; vissa sekundära fall är mindre allvarliga med milda symptom, ibland till och med asymptomatisk infektion, i exporterade fall (personer som smittats i området men insjuknat efter ankomst till annat land) har man inte sett fortsatt spridning och det har inte skett en ökning av storlek eller antal av observerade hushållskluster. En primärfallstopp sågs år 2014 mellan april och juni vilket kan betyda att säsongsvariation förekommer. (WHO, 2015)

Det verkar som om MERS-CoV sprids zoonotiskt till humanpopulationen, troligtvis härstammar viruset från fladdermöss. Detta stöds av att viruset är nära besläktat med betacoronavirusen BtCoV-HKU4 hos *Tylonycteris* och BtCoV-HKU5 hos *Pipistrellus* (van Boheemen *et al.*, 2012) samt av att MERS-CoV använder sig av receptorn dipeptidyl peptidase-4 (DPP4, även CD26) som finns hos *Pipistrellus pipistrellus* för att infektera celler (Raj *et al.*, 2013). Raj *et al.* (2013) diskuterar också att den epidemiologiska historien för MERS-CoV är oklar men att viruset troligen har sitt ursprung i fladdermöss på grund av att MERS-CoV infekterar fladdermusceller via den evolutionärt bevarade receptorn DPP4 och att en intermediär djurreervoir möjligen också existerar.

MERS-CoV - tropism och replikation

Enligt en studie utförd av Chan *et al.* (2014) har man undersökt om tre olika MERS-CoV-stammar från dromedarer (*Camelus dromedarius*) i Saudiarabien och Egypten har samma tropism och replikationsförmåga i humana luftvägsceller som en human MERS-CoV-stam. Resultaten visade att stammarna hade liknande tropism och replikationsförmåga samt liknande förmåga att undkomma cellernas interferonrespons. Chan *et al.* (2014) drar slutsatsen att dromedar-MERS-CoV-stammar från Saudiarabien och Egypten troligen är smittsamma för människan.

Eckerle *et al.* (2014) har undersökt förmågan hos MERS-CoV att replikera i cellinjer från get, får, nöt, dromedar, alpaca, gnagare, insektätare, fladdermus, människa och annan primat. Alla cellinjer uttryckte DPP-4 och forskarna testade också att cellinjerna gick att infektera med coronavirus genom att infektera cellerna med ett bovint coronavirus. Cellinjerna infekterades med MERS-CoV, inkuberades och analyserades med RT-PCR. Fladdermus- och primatcellinjen användes som kontroller. Replikation observerades i lung- och njurcellinje från get och navelsträngs- och njurcellinje från dromedar respektive alpaca. Av dessa

producerade get-njurcellinjen mest MERS-CoV-partiklar. Nivåerna av MERS-CoV i getcellinjerna var jämförbara med replikationen i human-lungcellinje och Vero E6 (primat). Replikation sågs som förväntat i fladdermuscellinjen, humancellinjen och primatcellinjen. Ingen virusreplikation sågs i cellinjer från får, nöt, gnagare eller insektätare.

Gamla världens kameler

Till gamla världens kameler räknas *Camelus Dromedarius*, dromedaren, och *Camelus Bactrianus*, den baktriska kamelen. Kadim *et al.* (2013) uppskattar gamla världens kamelpopulation i världen till ca 30 miljoner djur varav 95% är dromedarer. Över 80% av gamla världens kamelpopulation finns i Afrika varav största delen (60%) i Afrikas horn. Gamla världens kameler används för kött-, mjölk- och ullproduktion och som transportdjur, dessutom används de i kapplöpningar, som turistattraktion, i jordbruksarbete och som utställningsdjur. (Kadim *et al.*, 2013)

Dromedarer hålls i olika produktionssystem (Jasra & Mirza, 2004). Det finns många olika system som baserar sig på att dromedarerna flyttas för att de ska få föda, dessa system är mer eller mindre extensiva då förflyttningen kan handla om allt från förflyttning mellan olika länder till förflyttning ut på bete under dagtid. System som är mer intensiva finns också där dromedarägaren är fast bosatt och håller sina djur på en gård där de utfodras. (Jasra & Mirza, 2004)

Replikation och utsöndring i övre luftvägarna hos inokulerade dromedarer

Adney *et al.* (2014) undersökte replikation och utsöndring av MERS-CoV i övre luftvägarna hos tre dromedarer genom att experimentellt inokulera dem med en human MERS-CoV-stam, HCoV-EMC/2012. Tre dromedarer av hanligt kön köptes in och man kontrollerade att djuren inte hade antikroppar mot MERS-CoV eller bovint coronavirus genom ELISA. Dromedarerna var två, tre och fem år gamla. Djuren inokulerades med MERS-CoV intratrakealt, intranasalt och via konjunktiva. Den totala dosen var 10^7 50% TCID (tissue culture infective dose, mängden infektiöst agens som orsakar patogena förändringar i 50% av odlingsmedierna) med totalvolym på 15 ml. Rektaltemperatur, nos- och oralsvabbprov, avföringsprov, blodprov, serum, urinprov och prov från utandningsluft togs regelbundet under dagarna efter inokulation. Efter avlivning (5, 28 respektive 42 dagar efter inokulation) togs vävnadsprover för histopatologi och immunohistokemi.

Enligt Adney *et al.* (2014) visade alla tre dromedarer milda tecken på sjukdom: nosflöde och förhöjd kroppstemperatur vid 2 respektive 5-6 dagar efter inokulation. Nosflödet började dag två (n=2) och dag fem (n=1) och fortsatte i upp till 2 veckor. Virusspridning började en till två dagar efter inokulation vilket visades genom qPCR-analys av nossalvabbproven. Inget viralt RNA fanns i avförings- eller urinproven. Varken infektiöst virus eller viralt RNA kunde detekteras i serum- eller blodproven. Små mängder viralt RNA fanns i utandningsluften men inget infektiöst virus kunde detekteras.

Adney *et al.* (2014) fann infektiöst virus i vävnadsproven hos dromedaren som avlivades dag fem efter inokulation men inte hos dromedarerna som avlivades dag 28 respektive 42. Infektiöst virus hos dromedaren avlivad dag fem fanns i vävnadsprov från övre luftvägarna:

näshåla, luktepitel, pharynx och larynx. I de nedre luftvägarna fanns MERS-CoV i trachea samt i en av fyra testade lunglober. Virusets hittades också i retropharyngeal-, mediastinal-, mesenteriska- och tracheobronchiallymfknotor. Histologiska lesioner fanns i de pseudostratifierade epitelcellerna i de nedre luftvägarna (trachea, bronker och bronkioler) men inte i alveolerna. Hos dromedaren som avlivades dag 28 fann man mycket mildare lesioner i samma vävnader medan dromedaren som avlivades dag 42 inte hade några lesioner alls. Viralt antigen hos dromedaren avlivad dag fem detekterades i epitelcellerna i näshåla, larynx, trachea, bronker och bronkioler men inte i alveoler. Dessutom fann man viralt antigen i den follikulära mantelzonen i tonsillerna och i mediastinal- och retropharyngeallymfknotorna. Hos dromedaren avlivad dag 28 fann man viralt antigen i epitelceller i näshålan och hos dromedaren avlivad dag 42 fann man inget viralt antigen alls.

Serumproverna från dromedarerna som avlivades dag 28 respektive 42 analyserades för att undersöka antikroppsutvecklingen mot MERS-CoV. Adney *et al.* (2014) skriver att antikroppar först detekterades 14 dagar efter inokulation och titern ökade fram till dag 35 hos dromedaren som avlivades dag 42.

Författarna konstaterar att resultaten bekräftar tidigare observationer gjorda i fält; att dromedarer inte utvecklar allvarlig sjukdom, att virusutsöndring sker från luftvägarna men inte i urin eller avföring och att infektionsperioden hos dromedar verkar vara kort. De skriver också att eftersom stora mängder virus utsöndras ur övre luftvägarna i nossekret så tyder detta på att smitta från dromedar till dromedar och från dromedar till människa kan ske genom droppsmitta och direktkontakt, eventuellt också via indirekt spridning via objekt i omgivningen. (Adney *et al.*, 2014)

Förekomsten av MERS-CoV hos dromedar

Flera olika seroepidemiologiska studier har visat att dromedarer i Mellanöstern och delar av Afrika i stor utsträckning har antikroppar mot MERS-CoV (Perera *et al.*, 2013; Meyer *et al.*, 2014; Hemida *et al.*, 2014; Corman *et al.*, 2014; Müller *et al.*, 2014).

Perera *et al.* (2013) analyserade serum från 110 dromedarer importerade för slakt, de flesta från Sudan, 8 vattenbufflar, 25 kor, 5 får, 13 getter och 815 människor från Egypten. Som negativ kontrollgrupp användes serumprover från bl.a. människor från Hongkong och som positiv kontroll serum från en patient med diagnosticerad MERS och serum från två experimentellt infekterade makaker. Proverna testades med en mikroneutralisationsanalys och en pseudopartikelneutralisationsanalys. Neutraliserande antikroppar mot MERS-CoV fanns hos 103 av 110 dromedarer. Inga andra prov var positiva. Resultaten indikerar att MERS-CoV eller ett mycket närbesläktat virus är endemiskt hos dromedarer som importeras för slakt till Egypten. Studien visar inte i vilket land dromedarerna fick infektionen. (Perera *et al.*, 2013)

Hos dromedarer i Förenade Arabemiraten fann Meyer *et al.* (2014) att 97,1% hade antikroppar mot MERS-CoV. 151 serumprov från år 2003 och 500 serumprov från år 2013 analyserades. Som jämförelse användes serumprover från 16 kameler (*Camelus bactrianus*) från ett zoo i Tyskland. Immunoflorescensanalys, microarraytest, serumneutralisationstest och PCR-analys gjordes. Man fann antikroppar mot MERS-CoV i proverna tagna från

dromedarerna från både år 2003 och 2013, kontrollgruppen från Tyskland hade negativa prover. Resultatet visar att MERS-CoV har cirkulerat länge i dromedarpopulationen i Förenade Arabemiraten. (Meyer *et al.*, 2014)

Hemida *et al.*, (2014) gjorde en liknande studie för att kolla hur seroprevalensen för MERS-CoV såg ut i Saudiarabien år 1993 och i Australien år 2014 hos dromedarer. Serum från 25 vuxna dromedarer i Australien samlades in och 131 serumprover från 1993 från Saudiarabien togs med i studien. Proverna testades med ett pseudopartikelneutralisationstest och ett mikroneutralisationstest. Största delen av proverna tagna år 1993 i Saudiarabien innehöll antikroppar mot MERS-CoV. Av de 25 proverna tagna i Australien 2014 hittade man inga positiva prov för MERS-CoV. Seroprevalensen för MERS-CoV hos dromedarer verkar ha varit hög redan år 1993 i Saudiarabien medan viruset inte verkar cirkulera hos dromedarer i Australien. Författarna menar att det ändå inte betyder att MERS-CoV inte förekommer i den Australiensiska dromedarpopulationen då man endast tog 25 prov och man inte kan anta att dessa är representativa för alla dromedarer i Australien. (Hemida *et al.*, 2014)

Serum, blod och rektal- och nossvabbprov togs från dromedarer, får och getter år 2013 i Saudiarabien med syftet att utreda prevalensen av MERS-CoV-infektion (Alagaili *et al.*, 2014). Även serumprover från dromedarer insamlade mellan år 1992 och 2010 samlades in. Serumproven testades för antikroppar mot MERS-CoV med ELISA. Rektal- och nossvabbproven samt en del av serum- och blodproven testades med RT-qPCR för att de om man kunde få fram MERS-CoV-nukleinsyror. Av 203 dromedarer testade år 2013 hade 150 antikroppar mot MERS-CoV. Seroprevalensen var högre hos äldre djur (95%, n=98) än hos yngre (55%, n=104). En högre seroprevalens hos äldre djur jämfört med yngre sågs också i proverna tagna mellan år 1992 och 2010. Seroprevalensen under dessa år varierade mellan 100% och 72%. MERS-CoV-nukleinsyror hittades oftare hos unga dromedarer (35%, n=104) än hos fullvuxna (15%, n=98). Serumproven tagna från får och getter var alla negativa för antikroppar mot MERS-CoV. Inget virus kunde heller fås fram genom RT-qPCR. (Alagaili *et al.*, 2014)

Corman *et al.* (2014) undersökte antikroppar mot MERS-CoV hos dromedarer i Kenya mellan åren 1992 och 2013. Serum från 774 dromedarer från olika områden testades och man fann att 228 prov var MERS-CoV-positiva genom ELISA. Dromedarer med antikroppar mot MERS-CoV fanns i alla de testade områdena och under alla år. Det fanns dock delområden där man hållit sina dromedarer isolerade och inte hittade antikroppar mot MERS-CoV. Författarna fann också att man hade en skillnad i seroprevalensen beroende på ålder, äldre djur hade 7-10% högre seroprevalens än unga djur. Studien stöder tidigare observationer att MERS-CoV har cirkulerat i dromedarpopulationer i över 20 år. Corman *et al.* diskuterar också att det verkar som om dromedarer får viruset i ung ålder, vilket stöds av en lägre seroprevalens hos yngre djur. Författarna beskriver också en högre seroprevalens i områden med högre djurtäthet. (Corman *et al.*, 2014)

I ytterligare en seroepidemiologisk studie utförd av Müller *et al.* (2014) undersöktes MERS-CoV-neutraliserande antikroppar i serum hos dromedarer i Egypten, Sudan och Somalia från åren 1983 till 1997. Serumproverna testades med ELISA och mikroneutralisationstest. Analyserna visade att 84,1% (n=159) av dromedarerna hade antikroppar mot MERS-CoV. I

serumproverna tagna i Somalia och Sudan år 1983 hittade man en seroprevalens på 86,7% vilket visar att MERS-CoV har cirkulerat länge i dessa dromedarpopulationer. Största delen av de testade djuren var fullvuxna djur. (Müller *et al.*, 2014)

Reusken *et al.* (2014a) testade serumprover från dromedarer i Nigeria (n=358), Tunisien (n=204) och Etiopien (n=188). Proverna analyserades med protein microarray-test. I Nigeria och Etiopien var seroprevalensen för MERS-CoV hög, 94 % och 97 % respektive för fullvuxna djur. I Tunisien var 54 % av de fullvuxna djuren positiva medan 30 % av djuren yngre än två år var det. Lokala variationer av prevalens observerades; i södra Tunisien var 100 % av djuren seropositiva. (Reusken *et al.*, 2014a)

I april 2014 togs blodprov, nässvabbprov, rektalsvabbprov och mjölkprov av sammanlagt 33 dromedarer från två olika områden i Qatar (Reusken *et al.*, 2014b). Serum- och mjölkproverna testades med protein microarray-test och virusneutralisationsanalys. Svabbarna och mjölkproven testades med RT-PCR. Antikroppar mot MERS-CoV hittades i alla serum- och mjölkprov. På den ena platsen hittade man inga dromedarer som aktivt utsöndrade virus medan man på den andra platsen fann att sju av tolv testade dromedarer aktivt utsöndrade virus. Hos fem av dessa sju hittade man viralt RNA i mjölken genom RT-PCR. Enligt forskarna kan man utgående från resultaten inte dra slutsatsen att MERS-CoV kan spridas via mjölk eftersom hygienförhållandena vid provtagningen inte var optimala och det således är möjligt att kontamination av mjölken kan ha skett t.ex. med nasalsekret. Man kunde heller inte visa att det fanns infektiöst virus i mjölken då man endast hittade en liten mängd viralt RNA. (Reusken *et al.*, 2014b)

Stabilitet i mjölk och miljö

Van Doremalen *et al.* (2014) undersökte stabiliteten av MERS-CoV i mjölk från ko, get och dromedar vid olika temperaturer. MERS-CoV-stammen Jordan-N3/2012 späddes ut i mjölk från dromedar, get, ko och i nonsupplemented Dulbecco modified Eagle medium (DMEM) till en median dos av 50% TCID₅₀ på 10^{5,5}/mL. Proverna sattes i rör som förvarades i 4 eller 22 grader celsius i 0, 8, 24, 48 och 72 timmar efter utspädning för att sedan frysas ner till -80 grader. Titrarna av infektiöst virus bestämdes genom slutpunktstitrering på Vero E6-celler. Vid förvaring i 4 grader så sjönk medelvärdet av infektiöst virus i mjölken under 72 timmar. Hos dromedar sjönk halten med 37 %, hos get med 64 %, hos ko med 56 % och i DMEM med 80%. Resultaten var inte signifikanta för sänkning av halten infektiöst virus i dromedar- och komjölk förvarad i 4 grader i 72 timmar. Författarna visade dock att halten infektiöst virus minskade signifikant i alla prov förvarade i 22 grader i 48 timmar: en sänkning av 88 % i dromedarmjölk, 99 % i getmjölk, 98 % i komjölk och 97 % i DMEM. Trots den minskade halten kunde infektiöst virus ändå påvisas i mjölken som förvarats i 22 grader i 48 timmar. Då proven upphettades till 63 grader i 30 minuter kunde infektiöst virus inte längre påvisas. Författarna argumenterar för att upphettning av mjölk innan förtäring är en lätt och kostnadseffektiv metod för att förhindra smittspridning. (van Doremalen *et al.*, 2014)

Stabiliteten av MERS-CoV i miljön undersöktes av van Doremalen *et al.* (2013). MERS-CoV-stammen HCoV-EMC/2012 sprutades ut på plast- och stålyta i droppstorlek 5

mikroliter, totaldos 100 mikroliter 10^6 50 % TCID. Virusets stabilitet i miljön utvärderades i tre olika miljöer:

-hög temperatur och låg humiditet (30 grader celsius och 30% relativ luftfuktighet (RH))

-hög temperatur och hög humiditet (30 grader och 80% RH)

-låg temperatur och låg humiditet (20 grader och 40% RH)

Proven inkuberades i önskad miljö i 10 och 30 minuter och i 4, 8, 24, 48 och 72 timmar. Resultaten visade att ingen skillnad kunde ses mellan plast och metall. MERS-CoV kunde påvisas efter inkubation i 48 timmar i 20 grader och 40% RH dvs. låg temperatur och låg humiditet. I de prov som inkuberats i 30 grader i 80% RH dvs. hög temperatur och hög humiditet kunde virus påvisas efter 8 timmar och i proven inkuberade i 30 grader och 30% RH dvs. hög temperatur och låg humiditet kunde man påvisa virus efter 24 timmar.

Van Doremalen *et al.* (2013) undersökte också MERS-CoVs stabilitet i aerosol vid 20 grader celsius med 40% eller 70% RH. Dosen 10^6 TCID aerosoliserades i 10 minuter. Proverna analyserades med qRT-PCR och genom virustitration. I 40% RH sjönk viabiliteten hos MERS-CoV med 7% medan den sjönk med 89% i 70% RH ($p=0,0045$). Van Doremalen *et al.* (2013) visar i sin studie att MERS-CoV kan återfinnas på plast och metall efter 8, 24 eller 48 timmar beroende på miljön. Författarna visade också att MERS-CoV var stabilt i aerosolform vid 20 grader och 40 % RH dvs. vid låg temperatur och låg humiditet. Resultaten tyder enligt författarna på att spridning av MERS-CoV kan ske via direkt kontakt eller indirekt via objekt, åtminstone i inomhusmiljö. Spridning utomhus däremot, mellan dromedarer och från dromedar till människa, sker mer sannolikt genom direktkontakt på grund av väderleken på Arabiska halvön menar van Doremalen *et al.* (2013). MERS-CoVs stabilitet som aerosol visar att viruset också skulle kunna spridas i luften.

Smittspridning mellan dromedar och människa

Chu *et al.* (2014) tog nossvabbprov från 110 till synes friska fullvuxna dromedarer vid tolv olika tillfällen på slakterier under 2013 i Egypten. Serum togs från 52 av dessa. Man tog även blodprov från 179 personer som arbetade på slakterierna. RT-PCR användes för att analysera proverna och man fann att fyra dromedarer var infekterade med MERS-CoV. Efter amplifiering och analys kunde man visa att MERS-CoV-viruset hos dromedar hade en likhet på 99,2%-99,5% på nukleotidnivå med humant MERS-CoV. Serumproverna visade att 48 av 52 dromedarer hade antikroppar mot MERS-CoV. Serumproven tagna från slakteriarbetarna visade att ingen hade antikroppar mot MERS-CoV. Studien visar att MERS-CoV infekterar dromedarer och att dromedaryruset är mycket likt det virus som drabbar människa. Resultaten talar för att dromedaren kan vara en potentiell smittkälla men att ingen av arbetarna hade antikroppar visar också att spridning av viruset till människa är ovanligt. (Chu *et al.*, 2014)

Aburizaiza *et al.* (2013) undersökte förekomsten av antikroppar mot MERS-CoV hos bloddonatorer och slakteriarbetare i Sadiarabien år 2012. Prov från 130 bloddonatorer och 226 slakteriarbetare analyserades med immunoflorescensanalys (IFA), en differential-

rekombinant IFA och med plaque-reduction serum neutralization assay. Inget av proven från bloddonatorerna var positiva medan åtta prov från slakteriarbetarna var positiva med IFA. De positiva proven analyserades vidare med differential-rekombinant IFA för att bestämma om de innehöll antikroppar specifikt mot MERS-CoV. Alla åtta prov innehöll antikroppar mot andra humana coronavirus och i två av dessa åtta korsreagerade de också med MERS-CoV. De åtta proven testades också för förekomst av specifika antikroppar mot MERS-CoV, inget av proven hade serumneutraliseringstitrar av betydelse. Författarna konstaterar att IFA inte är ett tillräckligt specifikt test för att påvisa MERS-CoV. Att antikroppar inte påvisades utesluter inte att de inte förekommer i lägre nivå än vad som är detekterbart hos patienter som haft MERS med mild eller asymptomatisk sjukdomsbild menar Aburizaiza *et al.* (2013). Resultaten visar ändå att MERS-CoV troligen inte cirkulerar i de områden där proven togs och att populationen därför är mycket mottaglig för MERS-CoV. (Aburizaiza *et al.*, 2013)

Nowotny & Kolodziejek (2013) undersökte MERS-CoV hos dromedarer i Oman. Svabbprov från nos och konjunktiva togs från 76 dromedarer av olika ålder, kön och ras på olika ställen i Oman. Proven analyserades med två tidigare publicerade MERS-CoV-qRT-PCR-tekniker, den ena för ORF1a- och andra för ORF1b-regionen. Fem av proven testade positivt i alla analyser. De fem MERS-CoV-sekvenserna från dromedarerna var 100% identiska med varandra och matchade till 99% med en virussekvens från en dromedar i Qatar och med en virussekvens från en dromedar i Egypten. I en fylogenetisk analys visade man att dromedar-MERS-CoV-sekvenser bildar kluster oberoende av varandra men att de matchar human-MERS-CoV-sekvenser från samma geografiska områden. Författarna menar att ett nära genetiskt samband mellan human- och dromedar-MERS-CoV-sekvenser tyder på att lokal zoonotisk smitta sker.

Haagmans *et al.* (2013) undersökte förekomsten av MERS-CoV hos 14 dromedarer i Qatar efter att ägaren av gården och en arbetare insjuknat i MERS. Båda hade haft regelbunden kontakt med dromedarerna innan insjuknandet. Serum, rektalsvabbprov och nössvabbprov togs från alla 14 dromedarer på gården och analyserades med RT-PCR och med IgG-fluorecens, protein microarray och virusneutraliseringstest. Man kunde med säkerhet visa att MERS-CoV förekom hos tre dromedarer och att alla dromedarsera var positiva för antikroppar. Då man analyserade delar av virusets genfrekvens fann man att det virus man isolerat från dromedarerna var identiskt med de som isolerats från de insjuknade personerna. En bredare analys visade mindre olikheter i nukleotidsekvenserna. Eftersom endast delar av genomet analyserades kan man inte säga med säkerhet att människorna infekterades av dromedarerna eller vice versa, infektionen kan också ha introducerats från en tredje ännu okänd källa menar författarna. Resultaten visar dock, diskuterar författarna, att infektion med MERS-CoV hade inträffat nyligen hos dromedarerna eftersom vissa dromedarer hade stigande antikroppstitrar. (Haagmans *et al.*, 2013)

Memish *et al.* (2014) undersökte ett eventuellt fall av MERS-CoV-smitta från dromedar till människa. En dromedarägare som hade dromedarer (n=9) som uppvisat nosflöde och respiratoriska symptom insjuknade i MERS-CoV efter att han behandlat sina djur regelbundet, han hade dessutom druckit opastöriserad mjölk från sina egna djur. Man tog svabbprov från djurens övre luftvägar vid två olika tillfällen. Vid första tillfället fick man ett

positivt svar med RT-PCR för en dromedar och vid det andra, fyra dagar senare, testade ytterligare en dromedar positivt. Man kunde få fram ca 15% av genomet från dromedarviruset (spikeregionen) och en jämförelse mellan dromedar och patient visade att proverna var identiska och slutsatsen att smitta mellan dromedar och människa hade skett drogs, dock tog man inte ställning till riktningen. Serumprov togs också vid flera tillfällen och ELISA-test visade att alla dromedarer hade antikroppar mot MERS-CoV. Då man jämförde titrarna med IFA kunde man se att dromedarerna som testat positivt med RT-PCR hade titrar som steg fyrfaldigt från första testdagen till den sista. De två positiva dromedarerna var båda under ett år gamla. (Memish *et al.*, 2014)

Azhar *et al.* (2014a) undersökte samma händelse som Memish *et al.* (2014). Nossvabbprov, blod, urin, mjölk och rektalsvabbprov togs från de nio dromedarerna fem dagar efter att ägaren tagits in på sjukhus. Nya blodprov togs efter 28 dagar. Nossvabbprovet från en dromedar var positivt med RT-PCR. Veroceller inokulerades med nossvabbmaterial och den positiva dromedarens prov visade cytopatiska effekter i cellerna. Ur dessa isolerades MERS-CoV och en helgenomsekvensering kunde göras. Helgenomsekvensering av isolaten från patienten och dromedaren visade att proven var 100 % identiska (Azhar *et al.*, 2014a). Urin-, mjölk- och rektalsvabbproven var negativa för MERS-CoV. Serumproven analyserades med IFA och visade att den RT-PCR-positiva dromedaren hade antikroppstitrar som ökade fyrfaldigt under perioden. Hos fyra andra dromedarer såg man också en ökning medan man hos de resterande fyra observerade höga antikroppstitrar i båda proven. Patienten hade inga antikroppar mot MERS-CoV då han togs in på sjukhus medan han 14 dagar senare hade över fyra gånger så höga titrar. Azhar *et al.* (2014a) diskuterar att det är sannolikt att dromedarerna fick MERS-CoV-infektionen först och sedan överförde den till sin ägare eftersom fyra av dromedarerna hade höga antikroppstitrar som inte ökade medan ägaren inte hade detekterbar nivå av antikroppar mot MERS-CoV då han lades in på sjukhus och en kraftig ökning sedan observerades. (Azhar *et al.*, 2014a)

Azhar *et al.* (2014b) undersökte om viruset i samma fall kunde återfinnas i stalluften. Man fann MERS-CoV i stalluften och efter amplifiering och sekvensering kunde man visa att provet var identiskt med de tidigare man fått från patienten och dromedaren. Detta tyder enligt författarna på att patienten blev smittad av sina dromedarer och att MERS-CoV eventuellt kan ha luftburen spridning (Azhar *et al.*, 2014b).

MERS-CoV hos andra djurslag

Meyer *et al.* (2015) undersökte om hästdjur kan infekteras med MERS-CoV. In vitro-känslighet hos primära hästceller mot MERS-CoV undersöktes genom att man infekterade två njurcellinjer från häst, och en Vero B4-cellinje som jämförelse, med MERS-CoV. Man gjorde RT-PCR och plack-analys för att bekräfta produktion av infektiöst virus. Båda njurcellinjerna visade tydliga cytopatiska effekter, ökning av viralt RNA och uppförökning av virus. För att undersöka om MERS-CoV infektion förekommer hos hästdjur undersöktes 1053 serumprov från MERS-CoV-endemiskt och icke-endemiskt område, Saudiarabien respektive Spanien. Serumproven testades i två steg med ELISA med spike proteinets S1-domän som antigen. Alla serumprov reagerade med låga eller medelhöga värden. De 50 prov med högst reaktivitet testades med ett rekombinant immunoflorescens- och mikroneutraliseringstest. Dessa test är

mer specifika än ELISA och kan därför användas för att konfirmera testresultat. Meyer *et al.* (2015) fann att inga av de testade proven visade reaktivitet. Fynden indikerar att hästdjur inte har exponerats för MERS-CoV tidigare i Spanien eller Saudiarabien. (Meyer *et al.*, 2015)

Serum och avföringsprov från 11 dromedarer, 150 getter, 126 får och 91 kor analyserades för MERS-CoV-antikroppar i Jordanien år 2013 (Reusken *et al.*, 2013). Ett protein microarray-test användes för analyserna, dessutom användes virusneutralisation som konfirmering. Avföringsproverna analyserades med PCR. Alla testade dromedarer hade antikroppar mot MERS-CoV. Serum från sex av fåren visade också reaktivitet mot MERS-CoV-antigen men neutraliserande antikroppar kunde inte detekteras hos dessa, endast hos dromedarerna. Serumproven från getterna och korna var negativa. Inga MERS-CoV-sekvenser kunde erhållas från avföringsproven. (Reusken *et al.*, 2013)

DISKUSSION

MERS-CoV är ett nytt virus som efter att det först observerades har drabbat över 971 personer varav åtminstone 356 har dött. Största delen av fallen rapporteras från Saudiarabien men MERS-CoV har observerats i många fler länder. Stort fokus har lagts på att hitta reservoarer för MERS-CoV, trots att största delen av de drabbade blir smittade i hemmet eller på sjukhus enligt WHO (2015). Eftersom primärfall uppkommer på olika håll i främst Saudiarabien verkar det troligt att det existerar åtminstone en djurreservoir.

I studier där tropism undersökts har man kommit fram till att MERS-CoV har liknande replikationsförmåga i dromedar- och humanceller (Chan *et al.*, 2014). Dessutom visade Eckerle *et al.* (2014) att getlunga och getnjure infekterade med MERS-CoV producerar stora mängder virus, mycket större än navelsträngscellinje från dromedar. Svagheten med studien är att inte en cellinje från övre luftvägarna på dromedar har använts då histopatologi har visat att förändringar sker främst i övre luftvägarna hos dromedar och att infektiöst virus utsöndras i nossekret enligt Adney *et al.* (2014). Detta utesluter dock inte att geten kan spela roll vid smittspridning av MERS-CoV. Dock har studier av bl.a. Reusken *et al.* (2013) och Agaili *et al.* (2014) visat att getter i områden där det finns MERS-CoV inte är seropositiva för viruset.

Eftersom infektionsperioden verkar vara ganska kort hos dromedaren så är det troligt att om inte andra betydande reservoarer finns så kommer MERS-CoV inte spridas till områden där det finns mindre populationer av dromedarer då det troligen krävs väldigt många djur för att upprätthålla en spridning av MERS-CoV. Eventuellt skulle MERS-CoV kunna spridas till populationer av nya världens kamelider med fler studier behövs angående dessa.

Seroepidemiologiska studier är utförda i många länder i Mellanöstern och i Nord- och Östafrika. Dessa har visat att dromedarer har antikroppar mot MERS-CoV och att seroprevalensen är hög. Antikroppar har påvisats i prover tagna år 1983 i Somalia och Sudan vilket visar att MERS-CoV troligen har cirkulerat länge i dromedarpopulationen. Att första humanfallet dök upp först 2012 kan bero på att viruset muterat och nu också smittar människa. Meyer *et al.* (2014) hade en kontrollgrupp på 16 baktriska kameler från ett zoo i Tyskland. Då inga studier har gjorts på om den baktriska kamelen reagerar på samma sätt med MERS-CoV som dromedaren verkar kontrollgruppen inte relevant. Dessutom var kontrollgruppen väldigt liten i jämförelse med de analyserade proven.

En lägre seroprevalens och att man hittar infektiöst virus i större grad har observerats hos unga dromedarer vilket talar för att dromedarerna får MERS-CoV i ung ålder, kanske runt avvänjning då kalvarna inte mera får maternella antikroppar via mjölken. Detta stöds också av att en primärfallstopp observerades i april-juni år 2014 enligt WHO (2015). Då det redan gjorts många studier på seroprevalens för MERS-CoV hos dromedar kanske fokus i framtiden borde ligga på att vidare utreda virusutsöndring hos dromedar samt potentiella smittvägar från dromedar till människa. Till exempel har van Doremalen *et al.* (2013) visat att MERS-CoV är ganska stabilt i miljön och att viruset också är ganska stabilt i aerosolform och studier som undersöker möjligheten för spridning via luften eller damm kunde vara aktuella.

Att man kan påvisa antikroppar hos ett djurslag visar inte nödvändigtvis att djuren är smittkällan. Infektiöst virus har ändå kunnat isoleras från dromedarer och MERS-CoV-sekvenser från dromedar verkar vara väldigt lika de sekvenser som man hittar i human-kluster i samma geografiska områden. Detta stöds av bl.a. Nowotny & Kolodziejek (2013). I ett fall undersökt av Memish *et al.* (2014) av MERS-CoV hos en dromedarägare fann man bevis för att besättningen genomgått MERS-CoV-infektion och att MERS-CoV-sekvenserna från dromedarerna matchade de från ägaren. Eftersom dromedarerna hade stigande antikroppstitrar när ägaren var allvarligt sjuk verkar det som om dromedarerna fick infektionen innan sin ägare och troligen smittade honom. En tredje smittkälla kan dock inte uteslutas och inte heller att smittvägen kan ha varit från ägaren till djuren.

Azhar *et al.* (2014a) visade genom helgenomsekvensering att MERS-CoV från dromedar överensstämde till 100% med isolerat virus från dromedarens ägare. Även här hade dromedarerna stigande antikroppstitrar vilket visar på nyligen genomgången infektion. Ägarens insjuknande hade dessutom föregåtts av symptom hos dromedarerna. Att identiskt virus även hittades i luften i dromedarstallet ger ytterligare stöd för att smitta mellan dromedar och människa har ägt rum, dessutom hade ägaren behandlat sina djur innan sitt insjuknande. Då stora mängder virus utsöndras i nosflödet hos smittade dromedarer är det inte en omöjlighet att ägaren fått MERS-CoV av sina djur men återigen kan en tredje källa inte uteslutas och smittriktningen kan med säkerhet inte fastställas.

Att MERS-CoV utsöndras i mjölk är inte helt klarlagt men eftersom det visats att MERS-CoV är stabilt och infektiöst i mjölk även efter att denna förvarats svalt i över tre dygn är det mycket möjligt att människor som dricker opastöriserad dromedarmjölk kan bli infekterade på detta sätt. Även om MERS-CoV inte skulle utsöndras i mjölk så kan mjölken kontamineras t.ex. av ett diande föl med MERS-CoV-infektion om juvret inte rengörs innan mjölkning. Människan skulle sedan kunna smittas då hen dricker mjölken och viruspartiklarna tar sig från tonsillerna och svalglymfknutorna till luftvägarna. Fler studier som undersöker utsöndring av MERS-CoV i mjölk och om spridning av MERS-CoV sker via dromedarmjölk behövs.

Som van Doremalen *et al.* (2013) skriver så överlever MERS-CoV inte länge i en miljö med hög temperatur. Sannolikt sprids inte MERS-CoV mellan dromedarer indirekt utomhus då väderleksförhållandena är ogynnsamma för viruset i de länder där dromedarpopulationen är som störst. Direktkontakt är mer sannolikt. Däremot skulle MERS-CoV troligen kunna

spridas indirekt i inomhusmiljö vilket eventuellt är en bidragande faktor till att så många sekundärfall i hemmen och på sjukhus kan ses i humanpopulationen.

Perera *et al.* (2013) visade att slakteriarbetare i Egypten inte hade antikroppar mot MERS-CoV. Detta tyder på att smitta mellan dromedar och människa skulle ske sällan då seroprevalensen hos dromedarerna i området är hög. Det är dock möjligt att människorna har antikroppar under detektionsnivån för testerna p.g.a. att de genomgått mild eller asymptomatisk sjukdom. Flera studier angående antikroppar mot MERS-CoV i humanpopulationen, speciellt i drabbade områden, behövs. Att smitta från dromedar till människa sker så sällan skulle också kunna bero på att det i dromedarpopulationerna verkar cirkulera flera olika MERS-CoV-stammar. Om endast några av dessa har förmåga att smitta till humanpopulationen skulle det kunna vara en förklaring.

Eftersom långt ifrån alla primärfall rapporterar kontakt med dromedarer är dromedarens roll i smittspridningen inte helt klarlagd. Dromedaren verkar vara en reservoar men smitta till människa sker ändå relativt sällan. Att primärfallstoppar förekommer på våren då dromedarkalvar avväns stöder dromedaren som en betydelsefull smittkälla. Flera studier stöder att seroprevalensen är lägre hos unga djur och att dessa således är de som i huvudsak infekteras och sprider MERS-CoV-smitta. Fler undersökningar behövs för att klargöra hur MERS-CoV sprids, i synnerhet behöver smittspridningen mellan människor klargöras då största delen av de smittade är sekundärfall.

Största risken för global spridning ligger troligtvis inte i att MERS-CoV-positiva djur flyttas utan att humanfall exporteras från Saudiarabien efter Hajj, dvs. den årliga vallfärden till Mecka. Enligt WHO (2015) hittade man inte ett enda fall av MERS-CoV hos de 1,4 miljoner pilgrimer som reste till Saudiarabien i oktober 2014. Eftersom MERS-CoV-fall fortfarande rapporteras regelbundet från Saudiarabien finns det stor risk för smittspridningen under nästa Hajj i september 2015.

LITTERATURFÖRTECKNING

- Aburizaiza, A.S., Mattes, F.M., Azhar, E.I., Hassan, A.M., Memish, Z.A., Muth, D., Meyer, B., Lattwein, E., Muller, M.A. & Drosten, C. (2014). Investigation of Anti-Middle East Respiratory Syndrome Antibodies in Blood Donors and Slaughterhouse Workers in Jeddah and Makkah, Saudi Arabia, Fall 2012. *Journal of Infectious Diseases*, 209(2), 243-246.
- Adney, D.R., van Doremalen, N., Brown, V.R., Bushmaker, T., Scott, D., de Wit, E., Bowen, R.A. & Munster, V.J. (2014). Replication and Shedding of MERS-CoV in Upper Respiratory Tract of Inoculated Dromedary Camels. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12), 1999-2005.
- Alagaili, A.N., Briese, T., Mishra, N., Kapoor, V., Sameroff, S.C., de Wit, E., Munster, V.J., Hensley, L.E., Zalmout, I.S., Kapoor, A., Epstein, J.H., Karesh, W.B., Daszak, P., Mohammed, O.B. & Lipkin, W.I. (2014). Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Infection in Dromedary Camels in Saudi Arabia. *Mbio*, 5(2), 6.
- Assiri, A., Al-Tawfiq, J.A., Al-Rabeeah, A.A., Al-Rabiah, F.A., Al-Hajjar, S., Al-Barrak, A., FLEMBAN, H., Al-Nassir, W.N., Balkhy, H.H., Al-Hakeem, R.F., Makhdoom, H.Q., Zumla, A.I. & Memish, Z.A. (2013). Epidemiological, demographic, and clinical characteristics of 47 cases of Middle East respiratory syndrome coronavirus disease from Saudi Arabia: a descriptive study. *Lancet Infectious Diseases*, 13(9), 752-761.
- Azhar, E.I., El-Kafrawy, S.A., Farraj, S.A., Hassan, A.M., Al-Saeed, M.S., Hashem, A.M. & Madani, T.A. (2014a). Evidence for Camel-to-Human Transmission of MERS Coronavirus. *New England Journal of Medicine*, 370(26), 2499-2505.
- Azhar, E.I., Hashem, A.M., El-Kafrawy, S.A., Sohrab, S.S., Aburizaiza, A.S., Farraj, S.A., Hassan, A.M., Al-Saeed, M.S., Jamjoom, G.A. & Madani, T.A. (2014b). Detection of the Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus Genome in an Air Sample Originating from a Camel Barn Owned by an Infected Patient. *Mbio*, 5(4).
- Chan, R.W.Y., Hemida, M.G., Kayali, G., Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Alnaeem, A., Ali, M.A., Tao, K.P., Ng, H.Y., Chan, M.C.W., Guan, Y., Nicholls, J.M. & Peiris, J.S.M. (2014). Tropism and replication of Middle East respiratory syndrome coronavirus from dromedary camels in the human respiratory tract: an in-vitro and ex-vivo study. *Lancet Respiratory Medicine*, 2(10), 813-822.
- Chu, D.K.W., Poon, L.L.M., Goma, M.M., Shehata, M.M., Perera, R., Abu Zeid, D., El Rifay, A.S., Siu, L.Y., Guan, Y., Webby, R.J., Ali, M.A., Peiris, M. & Kayali, G. (2014). MERS Coronaviruses in Dromedary Camels, Egypt. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 1049-1053.
- Corman, V.M., Jores, J., Meyer, B., Younan, M., Liljander, A., Said, M.Y., Gluecks, I., Lattwein, E., Bosch, B.-J., Drexler, J.F., Bornstein, S., Drosten, C. & Mueller, M.A. (2014). Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedary Camels, Kenya, 1992-2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1319-1322.
- Eckerle, I., Corman, V.M., Mueller, M.A., Lenk, M., Ulrich, R.G. & Drosten, C. (2014). Replicative Capacity of MERS Coronavirus in Livestock Cell Lines. *Emerging Infectious Diseases*, 20(2), 276- 279.
- Haagmans, B.L., Al Dhahiry, S.H.S., Reusken, C., Raj, V.S., Galiano, M., Myers, R., Godeke, G.J., Jonges, M., Farag, E., Diab, A., Ghobashy, H., Alhajri, F., Al-Thani, M., Al-Marri, S.A., Al Romaihi, H.E., Al Khal, A., Bermingham, A., Osterhaus, A., AlHajri, M.M. & Koopmans, M.P.G.

- (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus in dromedary camels: an outbreak investigation. *Lancet Infectious Diseases*, 14(2), 140-145.
- Hemida, M.G., Perera, R.A., Al Jassim, R.A., Kayali, G., Siu, L.Y., Wang, P., Chu, K.W., Perlman, S., Ali, M.A., Alnaeem, A., Guan, Y., Poon, L.L., Saif, L. & Peiris, M. (2014). Seroepidemiology of Middle East respiratory syndrome (MERS) coronavirus in Saudi Arabia (1993) and Australia (2014) and characterisation of assay specificity. *Eurosurveillance*, 19(23), 2-7.
- Jasra, A.W. & Mirza, M.A. (2005). Camel production systems in Asia. I: Cardellino, R., *et al.* (red) ICAR *Technical Series*. Roma, Italy: International Committee for Animal Recording (ICAR). ISBN 1563-2504.
- Kadim, I. T.; Mahgoub, O.; Faye, B.; Farouk, M. M. (2013). Camel meat and meat products, <http://www.cabi.org/cabdirect/FullTextPDF/2012/20123381050.pdf>, [2014-03-11]
- Memish, Z.A., Cotten, M., Meyer, B., Watson, S.J., Alshafi, A.J., Al Rabeeah, A.A., Corman, V.M., Sieberg, A., Makhdoom, H.Q., Assiri, A., Al Masri, M., Aldabbagh, S., Bosch, B.J., Beer, M., Muller, M.A., Kellam, P. & Drosten, C. (2014). Human Infection with MERS Coronavirus after Exposure to Infected Camels, Saudi Arabia, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(6), 1012-1015.
- Meyer, B., Garcia-Bocanegra, I., Wernery, U., Wernery, R., Sieberg, A., Muller, M.A., Drexler, J.F., Drosten, C. & Eckerle, I. (2015). Serologic Assessment of Possibility for MERS-CoV Infection in Equids. *Emerging Infectious Diseases*, 21(1), 181-182.
- Meyer, B., Mueller, M.A., Corman, V.M., Reusken, C.B.E.M., Ritz, D., Godeke, G.-J., Lattwein, E., Kallies, S., Siemens, A., van Beek, J., Drexler, J.F., Muth, D., Bosch, B.-J., Wernery, U., Koopmans, M.P.G., Wernery, R. & Drosten, C. (2014). Antibodies against MERS Coronavirus in Dromedaries, United Arab Emirates, 2003 and 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 20(4), 552-559.
- Muller, M.A., Corman, V.M., Jores, J., Meyer, B., Younan, M., Liljander, A., Bosch, B.J., Lattwein, E., Hilali, M., Musa, B.E., Bornstein, S. & Drosten, C. (2014). MERS Coronavirus Neutralizing Antibodies in Camels, Eastern Africa, 1983-1997. *Emerging Infectious Diseases*, 20(12), 2093-2095.
- Nowotny, N. & Kolodziejek, J. (2014). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) in dromedary camels, Oman, 2013. *Eurosurveillance*, 19(16), 11-15.
- Perera, R.A., Wang, P., Gomaa, M.R., El-Shesheny, R., Kandeil, A., Bagato, O., Siu, L.Y., Shehata, M.M., Kayed, A.S., Moatasim, Y., Li, M., Poon, L.L., Guan, Y., Webby, R.J., Ali, M.A., Peiris, J.S. & Kayali, G. (2013). Seroepidemiology for MERS coronavirus using microneutralisation and pseudoparticle virus neutralisation assays reveal a high prevalence of antibody in dromedary camels in Egypt, June 2013. *Eurosurveillance*, 18(36), 8-14.
- Quinn, P.J., Markey, B.K., Leonard, F.C., FitzPatrick, E.S., Fanning, S. & Hartigan, P.J. (2011). Coronaviridae. *Veterinary microbiology and microbial disease*, (Ed. 2), 700-710.
- Raj, V.S., Mou, H.H., Smits, S.L., Dekkers, D.H.W., Muller, M.A., Dijkman, R., Muth, D., Demmers, J.A.A., Zaki, A., Fouchier, R.A.M., Thiel, V., Drosten, C., Rottier, P.J.M., Osterhaus, A., Bosch, B.J. & Haagmans, B.L. (2013). Dipeptidyl peptidase 4 is a functional receptor for the emerging human coronavirus-EMC. *Nature*, 495(7440), 251-254.

- Reusken, C.B., Ababneh, M., Raj, V.S., Meyer, B., Eljarah, A., Abutarbush, S., Godeke, G.J., Bestebroer, T.M., Zutt, I., Mueller, M.A., Bosch, B.J., Rottier, P.J., Osterhaus, A.D., Drosten, C., Haagmans, B.L. & Koopmans, M.P. (2013). Middle East Respiratory Syndrome coronavirus (MERS-CoV) serology in major livestock species in an affected region in Jordan, June to September 2013. *Eurosurveillance*, 18(50), 14-20.
- Reusken, C.B., Farag, E.A., Jonges, M., Godeke, G.J., El-Sayed, A.M., Pas, S.D., Raj, V.S., Mohran, K.A., Moussa, H.A., Ghobashy, H., Alhajri, F., Ibrahim, A.K., Bosch, B.J., Pasha, S.K., Al-Romaihi, H.E., Al-Thani, M., Al-Marri, S.A., AlHajri, M.M., Haagmans, B.L. & Koopmans, M.P. (2014b). Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) RNA and neutralising antibodies in milk collected according to local customs from dromedary camels, Qatar, April 2014. *Eurosurveillance*, 19(23), 8-12.
- Reusken, C., Messadi, L., Feyisa, A., Ularanu, H., Godeke, G.J., Danmarwa, A., Dawo, F., Jemli, M., Melaku, S., Shamaki, D., Woma, Y., Wungak, Y., Gebremedhin, E.Z., Zutt, I., Bosch, B.J., Haagmans, B.L. & Koopmans, M.P.G. (2014a). Geographic Distribution of MERS Coronavirus among Dromedary Camels, Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 20(8), 1370-1374.
- van Boheemen, S., de Graaf, M., Lauber, C., Bestebroer, T.M., Raj, V.S., Zaki, A.M., Osterhaus, A., Haagmans, B.L., Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J. & Fouchier, R.A.M. (2012). Genomic Characterization of a Newly Discovered Coronavirus Associated with Acute Respiratory Distress Syndrome in Humans. *Mbio*, 3(6), 9.
- van Doremalen, N., Bushmaker, T., Karesh, W.B. & Munster, V.J. (2014). Stability of Middle East Respiratory Syndrome Coronavirus in Milk. *Emerging Infectious Diseases*, 20(7), 1263-1264.
- van Doremalen, N., Bushmaker, T. & Munster, V.J. (2013). Stability of Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV) under different environmental conditions. *Eurosurveillance*, 18(38), 7-10.
- World Health Organization, (2015-02-05). *Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV): Summary of Current Situation, Literature Update and Risk Assessment - as of 5 February 2015*. http://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/mers-5-february-2015.pdf?ua=1, [2015-03-03]
- Zaki, A.M., van Boheemen, S., Bestebroer, T.M., Osterhaus, A. & Fouchier, R.A.M. (2012). Isolation of a Novel Coronavirus from a Man with Pneumonia in Saudi Arabia. *New England Journal of Medicine*, 367(19), 1814-1820.