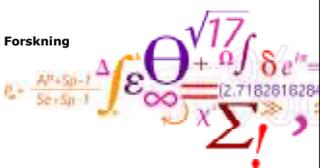


DTU

Sekventering af danske PRRSV isolater fra de senere år.

Charlotte K Hjulsager, Solvej Ø Breum, Lars E Larsen

Faggruppe for Virologi
Afdeling for Veterinær Diagnostik og Forskning



DTU Veterinærinstituttet

DTU

PRRSV er årsag til Porcin reproduktions og respirationssygdom (PRRS)

PRRS

1987	USA (retrospektivt, virus fundet i svin siden 1979)
1990/91- 1991- 1992-	Holland og Tyskland England, Spanien, Frankrig og Belgien Danmark

2 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

PRRSV genotyper

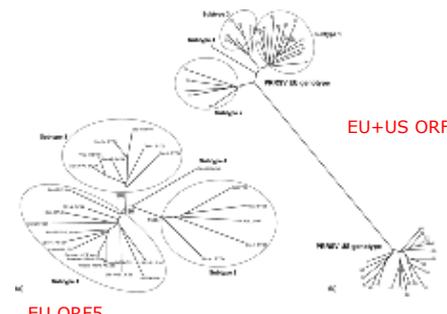
<ul style="list-style-type: none"> • PRRSV EU, genotype 1, Dk - Lelystad Virus 	}	<p>Samme kliniske symptomer</p> <p>Molekylær variation</p> <p>Antigene forskelle</p>
<ul style="list-style-type: none"> • PRRSV US, genotype 2, Vac - VR2332 	}	<p>Dårlig krydsbeskyttelse mellem Genotyper (og subtyper?)</p>

Amino acid sequences for VR-2332 as compared to LV are 76% (ORF 2), 72% (ORF 3), 80% (ORFs 4 and 5), 91% (ORF 6) and 74% (ORF 7), and sequence analysis indicates that viruses are evolving by **random mutation and recombination**.

3 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

Diversiteten af EU er større end US type virus



Fra Stadejek et al. 2006

4 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

PRRSV genotyper

<ul style="list-style-type: none"> • PRRSV EU, genotype 1 <ul style="list-style-type: none"> - Subtype 1 <ul style="list-style-type: none"> • Asien, Europa inkl DK - Subtype 2 <ul style="list-style-type: none"> • Hviderusland, Rusland Litauen - Subtype 3 <ul style="list-style-type: none"> • Hviderusland, Rusland • PRRSV US, genotype 2 	}	<p>Samme kliniske symptomer</p> <p>Molekylær variation</p> <p>Antigene forskelle</p> <p>Dårlig krydsbeskyttelse mellem Genotyper (og subtyper?)</p>
--	---	---

5 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

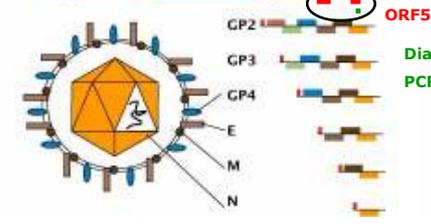
PRRSV genom struktur og proteiner, PCR assays

15 kb RNA med 8 ORFs Genome PRRSV

Leader	RNA polymerase	Structural genes	RNA
ORF 1	ORF 2	ORF 3, 4, 5, 6, 7, 8	

Sekventering ORF5 & ORF7

Diagnostik PCR ORF7



6 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

PRRSV real-time Diagnostisk Assay på VET

Samtidig detektion og typebestemmelse

```

001 Porcilis Q024710  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
002 Lelystad g1132572  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
003 DE161-H A1039560  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
004 Sui-4 Q0234713  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
005 Vax-2 Q0234720  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
006 gml-42 Q0234489  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
007 Oru-1 Q0234797  STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
008 VR2332 g1132441468 STAACTGTCGAGTTCTGTGGTCAGTATGAAATGTCAGGCGCAGC----AACTGAGGG--AGGACGGCC--AAAAAGAAAAGGCTGAGAAAGCGAATTTTCC
  
```

7 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

PRRSV indsendelser (antal sager) og fund 2003-2009*

	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009*
Positiv/ testede	8/	4/	0/	2/14	0/9	6/17	0/5
EU	4	1	0	2	0	2	0
US	6	3	0	0	0	5	0

*pr. 28/4-09

PCR test indføres

8 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

Sekvensanalyse af nye danske PRRSV metode:

Vaccinevirus

- **EU type**
 - Lelystad virus
 - ~Progressis VET
 - ~Sui-4 (2 EU + 1 US)
 - Porcilis PRRS
 - ~Ingelvac PRRS Killed VAC
- **US type**
 - VR2332
 - RespPRRS Ingelvac PRRS
 - ~Sui-4 (1 US + 2 EU)

Danske PRRSV

2003-08

"gamle" 90'erne

Sekventere 2 gener: ORF5 & ORF7

Analysere diversitet, PCR/Antigene sites

9 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

PRRSV EU & US ORF7

PRRSV EU & US ORF5

Danske 1990'erne

10 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

ORF5 nt fylogeni

Nye sekvenser & vaccinstammer

Størst variation indenfor gruppen af EU virus

11 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

DTU

Epitoper – de steder på virus der genkendes af immunsystemet

Antibodies contact epitopes or antigenic determinants

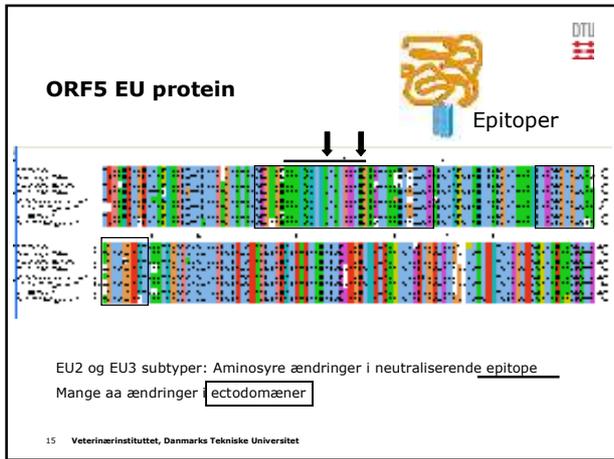
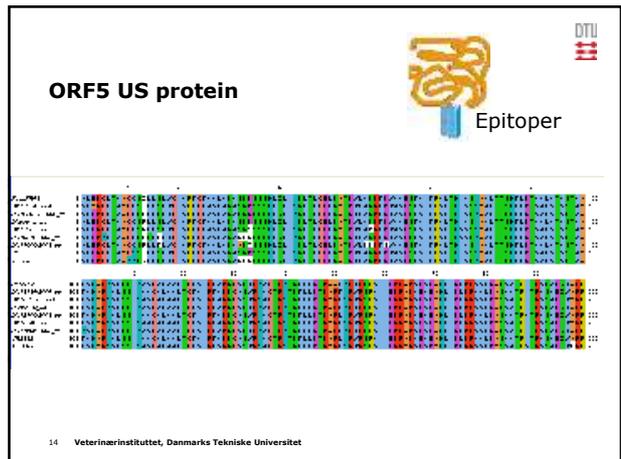
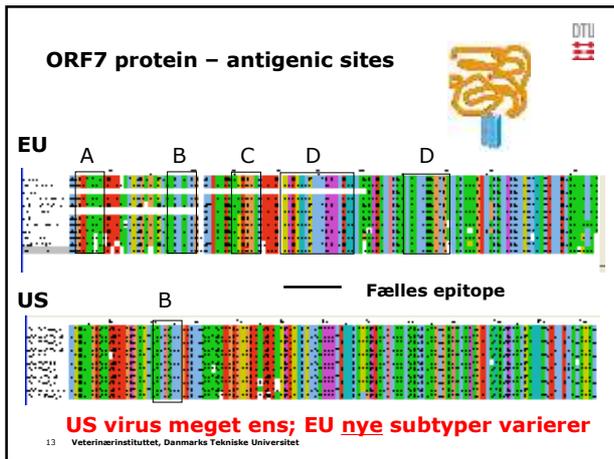
This antigen is a protein.

This part of the protein is the epitope for this antibody.

*The epitope is small (~6 amino acids or ~6 sugars) or a small part of a larger antigen.

Epitope = antigenic determinant

12 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet



Sekvensdiversitet Betydning for laboratorie diagnose

- PCR: falsk negative ved ændringer i primer/probe sites
- Antistof analyser: risikerer falsk negative hvis ændringer i epitoper

This antigen is a protein.

16 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Konklusioner

- RNA genom sekvens varierer
- Ikke så stor variation på aminosyre niveau af danske PRRSV
- Finder DK US type
- Finder DK EU1 subtype
- DIVERSITETEN af danske EU type virus > US type virus
- Nye danske virus (2003-) ser ud til at være dækket af VET's serologiske assays.
- Vaccine effekt: OK vedr. danske virus, men EU2 & EU3 subtyper???
- Hvad hvis nye virus introduceres i DK?
 - Vores serologiske assays er brede, så selv infektioner med virus der varierer meget forventes detekteret
 - Til gengæld kan ratio (serologisk typning) måske blive upålidelig ved stor forskel mellem test antigen og inficerende virus
- Send flere prøver ind til PRRSV PCR på DTU VET
 - så vi kan blive klogere på hvad der cirkulerer
 - Og dermed kan tilpasse vores diagnostiske tests (PCR & Serologi) = bedre diagnostik!!!

17 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

ORF5 US protein alignment

Epitoper

```

DR12347/2004_us  MEEKLTAGC C LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL 50
DR13392-3/2008_us MEEKLTAGC C LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL
DK988-81_r_us    MEEKLTAGC C LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL
DR12805/2003_us MEEKLTAGC C LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL
DR13348/2003_us MEEKLTAGC C LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL
DR13350/2003_us MEEKLTAGC C LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL
109447/2003      MEEKLTAGY Y LLELCK VVPCFVAVLN ASDSSSRGQ LI INLTLCEL

NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG 150
DR13347/2004_us  NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG
DR13392-3/2008_us NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG
DK988-81_r_us    NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG
DR12805/2003_us NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG
DR13348/2003_us NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG
DR13350/2003_us NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG
109447/2003      NOTDLANKF DWVESVFVF PVLTRIVSYG ALTTSPFLDT VALVTDTAG

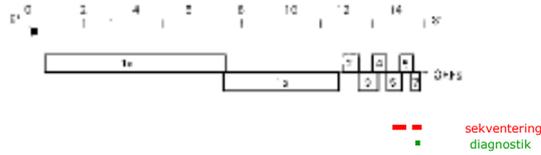
FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG 200
DR13347/2004_us  FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG
DR13392-3/2008_us FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG
DK988-81_r_us    FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG
DR12805/2003_us FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG
DR13348/2003_us FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG
DR13350/2003_us FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG
109447/2003      FVSRGVLSL IYAVCALAAL ICPVIFPARN QMSRWACTR YTNFLDTG

FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP 250
DR13347/2004_us  FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
DR13392-3/2008_us FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
DK988-81_r_us    FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
DR12805/2003_us FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
DR13348/2003_us FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
DR13350/2003_us FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
109447/2003      FVSRGSPVI IERGRVEVE GHLLIDSRVV LGSVATPIT BVSAEGNSP
  
```

18 Veterinærinstituttet, Danmarks Tekniske Universitet

Genom organisering af PRRSV

15 kb RNA med 8 ORFs



Fra Meulenberget al. 1997, Vet Microbiol 55:197-202.

Ændre PRRS sig – er der Quasispecies?

- Goldberg et al; 2006:
 - Variation på 3.84% indenfor besætningen og 3.22% i dyret - sites med positive og negative selektions pres
 - Mange dyr have egen sekvenser men også andre – indikere et mix af sekvenser – både transmission og mutation i det enkelte dyr. Ingen speciel selektion i epitoper
 - Skift i codon usage indikerede at virus har adapteret sig til svin fra 1991 til 2005
 - Indikere at PRRSV ændres ca 0.5% pr år
- Chang et al. 2002 :
 - Passage af PRRS hver 60 dag i 260 dage – medførte stor variation i virus men ikke specielt i epitoper

Quasispecies - fortsat

- Dee et al 2001
 - 5-11% variation i sekvens mellem 60 svin i samme besætning
- Laroche et al 2003
 - Som Dee men også persistens i op til 3.5 år med 2% ændring
- Rowland et al; 1999: Som Dee (virulent stamme)
- KONKLUSION:
 - PRRSV ændre sig hurtigt ved passage mellem svin og flere virus co-eksistere i en besætning og endda i samme dyr
 - 100.000 kroner spørgsmålet er:
 - VA` betyder det i praksis???

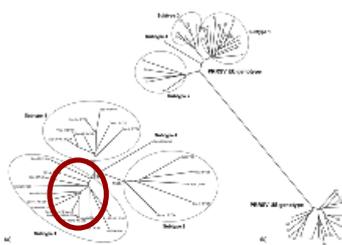
Hvilke betydning har det for vaccinerne effekt?

- Eksisterende vacciner indeholder kun subtype 1 virus isolater
- Labarque et al, 2004 vaccinerede svin med svækket subtype 1 virus og lavede challenge med homolog virus og virus fra anden subtype – der var kun delvis beskyttelse mod den heterologe challenge virus hvilket indikerede at subtypen havde betydning. ORF5 98% v. 84% nt identitet
- Diaz et al; 2006 viste i et tilsvarende set-up det modsatte – understreger at andre faktorer (vaccineformulering, stammens virulens etc. spiller ind)



Hvilke betydning har det for vaccinerne effekt (fortsat)

- Pesch et al., 2005 undersøgte virus fra områder der vaccinerer og områder der ikke vaccinerer og fandt ingen forskel på Ks/Ka ration hvilket indikere at vaccination ikke betyder øget selektion på vild type virus.
- Konklusion
alt andet lige vil den stærke evolution påvirke vaccinerne effekt hvis vaccinevirus er meget forskellig fra vildtype – god ide med multistrain vacciner



Perspektiver

- Hvad sker hvis de østeuropæiske stammer introduceres i Danmark?
- Ønske om forskning og diagnostik: flere isolater så vi kan få et billede af hvordan de nuværende danske isolater ser ud please!! (men problem med russer bekendtgørelsen)



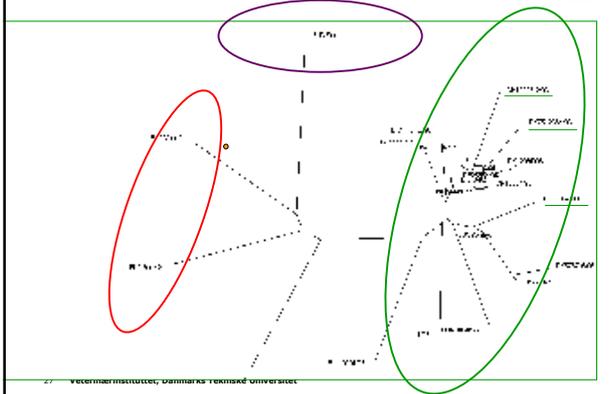
Vaccination til kontrol af PRRS

- Dræbt vaccine
 - Sikker
 - Kræver booster
 - Dyre
 - Ingen celle-medieret immunitet
- Levende svækket vaccine
 - Ikke så sikker som dræbt vaccine
 - Replikerer i værten og giver celle-medieret respons
 - Vaccinestamme kan spredes fra vaccineret til ikke-vaccineret dyr ved forkert brug
 - Forsøg har vist at den bør kunne bruges terapeutisk i start af udbrud og give beskyttelse mod heterolog challenge
 - forhindre udskillelse/spredning af wild-type virus til naive grise
 - Men ikke forhindre infektion med heterologe wild-type virus
 - Ikke eliminere virus fra vaccinerede grise
- Vigtigt med korrekt opbevaring og ingivelse af vaccine

PRRSV infektion

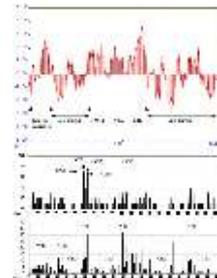
- Inkubationstid 4-7 dage (3-28)
- Viræmi (virus i blodet) 4-6 ugers varighed (23)
-

ORF7 EU diversitet



Har ændringer i PRRSV betydning for epitoperne – dvs. antistoffernes evne til at reagere med virus?

- Generelt lav Ks/Kns ratio f.eks. Mateu et al 2006: 1.41% – indikere selektion – dog Pesch et al 2005 anderledes >>5 – ingen selektion
- Flere indikationer på at selektionen ikke er koncentreret om epitoper (f.eks. Chang et al 2002 og Goldberg et al. 2003)
- Analyse af deletion mutant i Danmark viste at det var et dominerede epitop i ORF 3 og 4 der var deleted (Oleksiewicz et al 2000)
- **Konklusion:** der er nok selektion men ikke specielt på epitoper – logisk nok når man tænker over kvaliteten af antistoffer mod PRRSV generelt



ORF7 US protein – antigenic sites



PRRS Virus (PRRSV)

- tilhører Arteriviridae familien.
- enkelt strenget positive sense RNA virus med kappe.

