

PRRSV –status på de danske virus

Resultater fra Ph.d.-projekt (2010-13)

v/ Videnskabelig assistent Lise Kirstine Kvisgaard

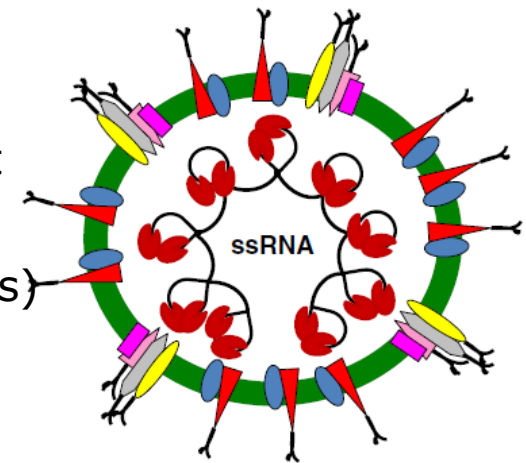


$$P_{RG} = \frac{AP+Sp-1}{Se+Sp-1} \int_a^b \epsilon \Theta^{\sqrt{17}} + \Omega \int \delta e^{i\pi} = \{2.7182818284\}$$

Δ \int_a^b ϵ Θ $\sqrt{17}$ Ω \int $\delta e^{i\pi}$ $=$ $\{2.7182818284\}$ ∞ χ^2 Σ $!$

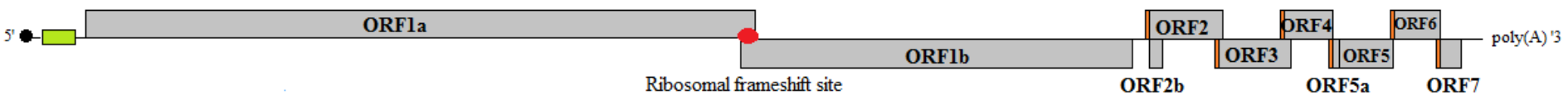
PRRSV

- PRRSV tilhører *Arteriviridae* familien i *Nidovirales* ordenen
- Lille (50-65 nm), kappet RNA virus
- Enkeltstrenget positiv-orienteret genom, ~15 kb langt
- Genomet koder for mindst 10 åbne læserammer (ORFs)



Music and Gagnon 2010

PRRSV genom:



Kliniske tegn

• Problemer med reproduktion

- Mumificerede fostre
- Svage eller dødfødte grise
- Høj dødelighed hos smågrise

• Respiratorisk

- Feber
- Lungebetændelse, hoste
- Øget dødelighed
- Sekundær infektion



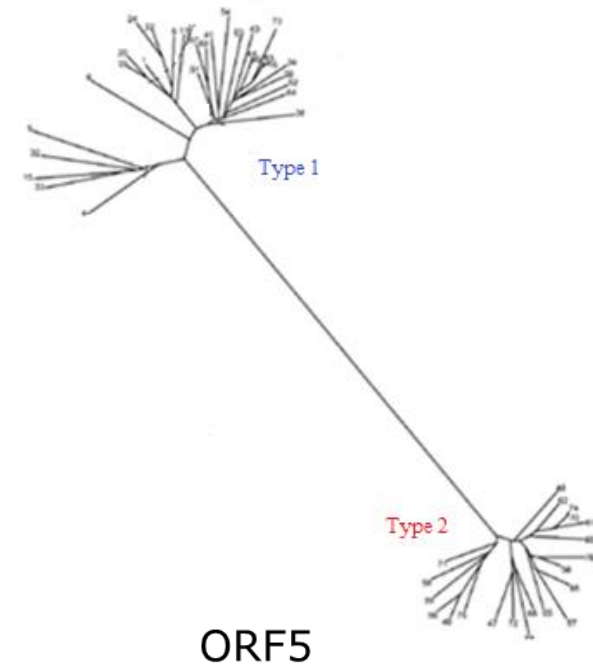
PRRSV historie -globalt

- 1987: Nord Amerika –Mystisk svinesygd
- 1990-91: Tyskland og Holland
- Spredtes til det meste af Europa, Amerika og Asien
- I dag er PRRSV endemisk i de fleste lande med slagtesvinsproduktion



To genotyper

- Genetisk sammenligning af de første virus isoleret i USA og Vesteuropa viste at de kun var 50-60 % identiske
- To genotyper:
 - Type 1 (Europæisk, protogenotype: Lelystad)
 - Type 2 (Amerikansk, protogenotype: VR-2332)
- I dag cirkulerer begge genotyper i hele verdenen

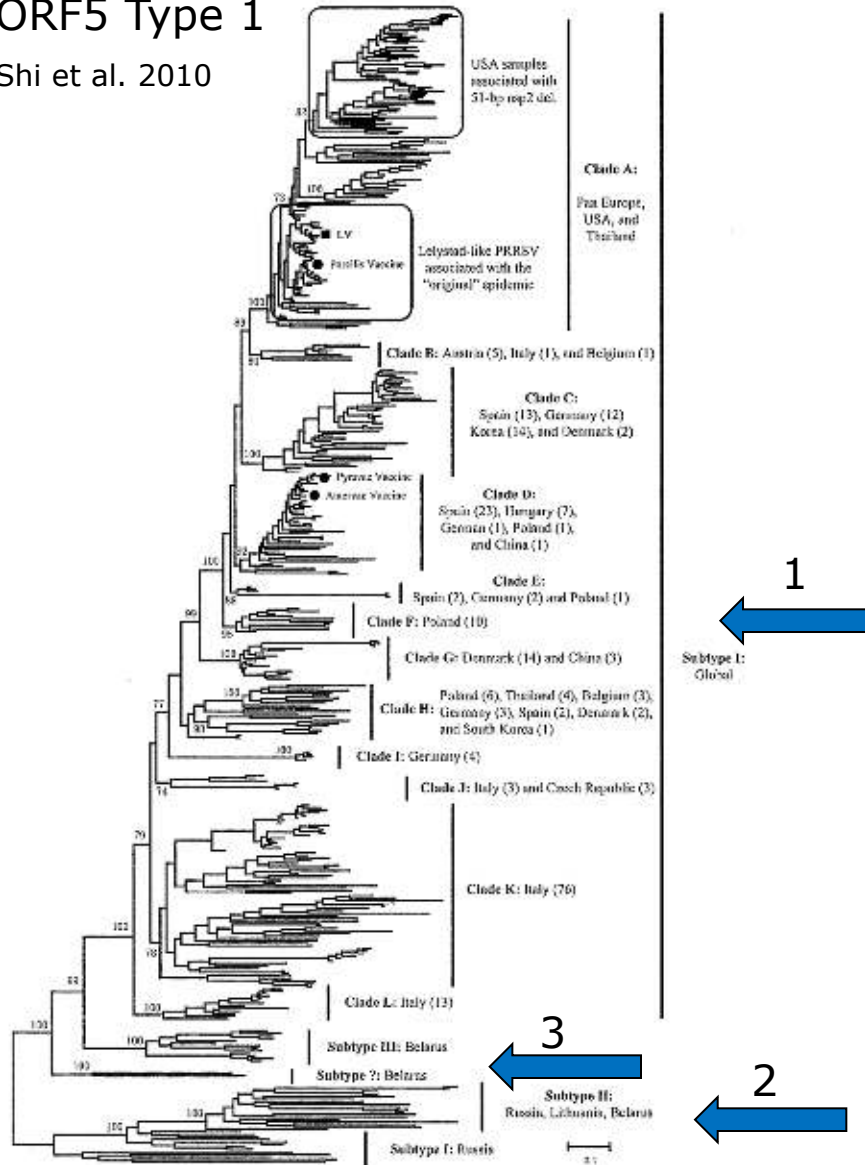


Stadejek et al. 2006

Stor diversitet blandt samme genotype

ORF5 Type 1

Shi et al. 2010



- Type 1 PRRSV er opdelt i mindst 3 undertyper (1-3) (Stadejek et al. 2006)

Stor diversitet blandt samme genotype

ORF5 Type 1

Shi et al. 2010

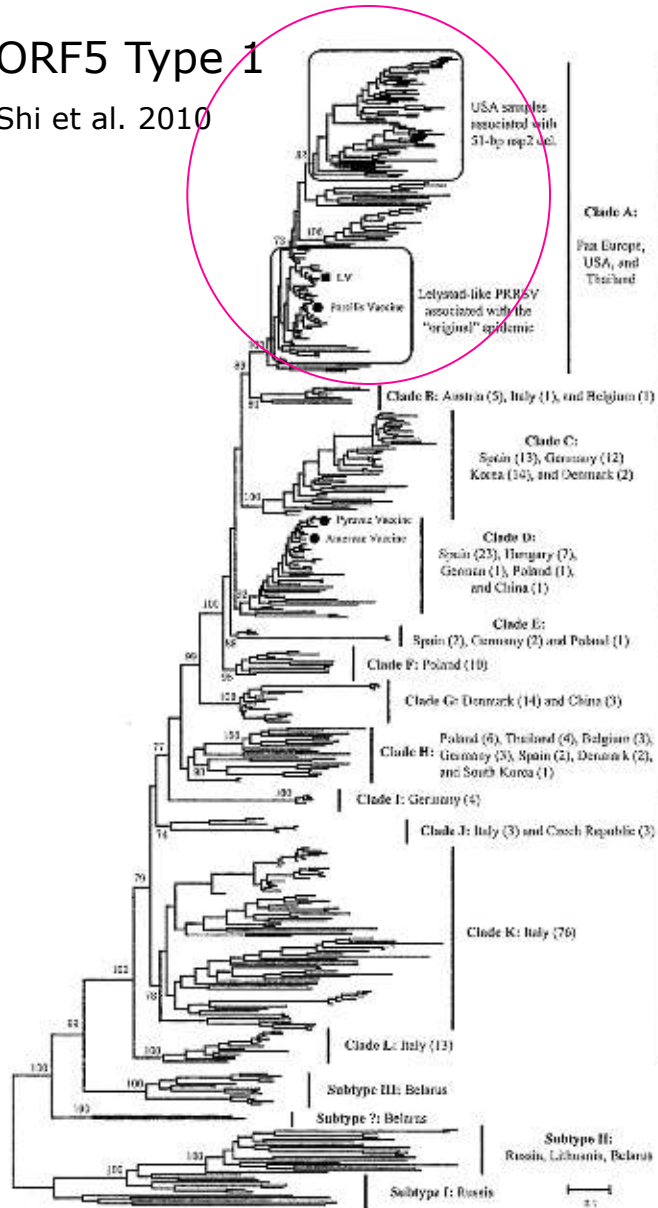


- Type 1 PRRSV er opdelt i mindst 3 undertyper (1-3) (Stadejek et al. 2006)
- Undertype 1 kan videre inddeles i 12 grupper (A-L)
- Nogle af disse grupper indeholder kun virus isoleret fra ét land

Stor diversitet blandt samme genotype

ORF5 Type 1

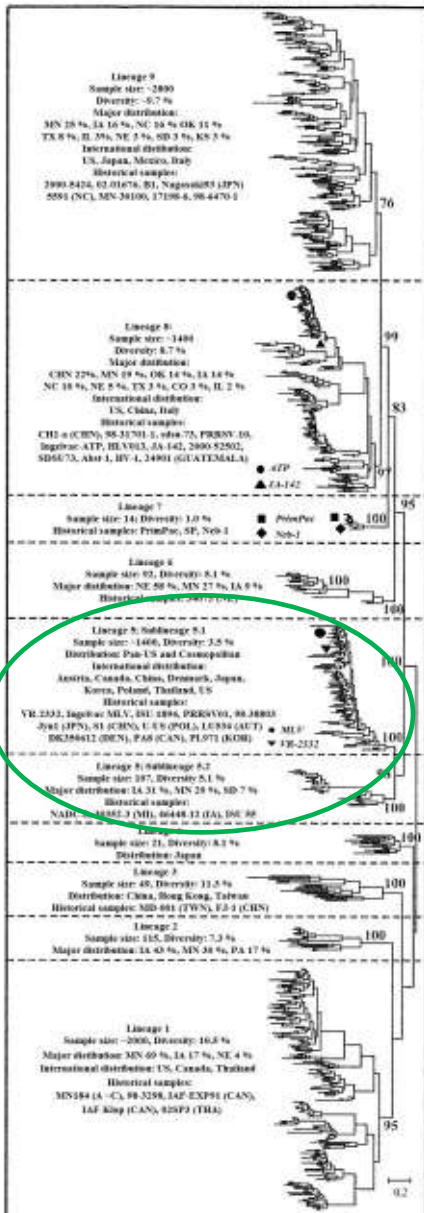
Shi et al. 2010



- Type 1 PRRSV er opdelt i mindst 3 undertyper (1-3) (Stadejek et al. 2006)
 - Undertype 1 kan videre inddeles i 12 grupper (A-L)
- 1 (A-L) ←
- Nogle af disse grupper indeholder kun virus isoleret fra ét land
 - De fleste lande har også vaccine-lignende virus

Stor diversitet blandt samme genotype

ORF5 Type 2 Shi et al. 2010



- Type 2 PRRSV kan inddeles i 9 grupper
- Den største diversitet blandt Type 2 PRRSV er virus isoleret i USA
- Gruppe 5 (5.1 og 5.2) har virus fra flest lande repræsenteret
 - Ingelvac MLV vaccine tilhører gruppe 5.1
 - VR2332

PRRSV isoleret i Østeuropa

- I Østeuropa ses store problemer med PRRSV
- Sekvensanalyser har vist at det er Type 1 undertype 2 og 3 som cirkulerer
- Det er svært at vurdere om PRRSV alene som er skyld i mere klinik eller co-infektioner
- Infektionsstudier i grise har vist at både undertype 2 og 3 giver mere sygdom end undertype 1





Høj patogen (HP) PRRSV i Kina

- 'High fever disease' i Kina i 2006 (Tian et al. 2007)
 - Involverede mere end 2 millioner grise
 - Stor dødelighed også blandt slagtesvin
 - Lang liste af kliniske symptomer, bla. høj feber, lammelse, rysten
 - Spredte til andre asiatiske lande
 - Mistanke om svinekolera eller afrikansk svinepest som ætiologisk agens
 - PRRSV blev fundet ved PCR og immunhistokemi, HP-PRRSV
- Oprindelse af HP-PRRSV
 - Fylogenetiske analyser af ORF5 – lignede andre kinesiske PRRSV
 - Fuld-genom analyser viste at HP-PRRSV nedstammede fra en tidligere kinesisk PRRSV stamme (CH-1a isoleret i 1996)

PRRSVs historie i Danmark

- Type 1:
 - Første sag, 1992
 - Ukendt oprindelse
 - I 1995, spredt til det meste af Danmark
 - Porcilis PRRS vaccine 2001
- Type 2:
 - 1996
 - Oprindelse, reversion af en Type 2 MLV vaccine
 - Efter 1996, spredt til det meste af Danmark
- Status i 2010: både Type 1 og Type 2 cirkulerer i de danske svinebesætninger



Status af PRRSV i Danmark

- 1992-2002 : Signifikant forskningsaktivitet
- Siden 2003: Udover udvikling af diagnostiske test, minimal forskning
- Status i 2010: Manglende viden om diversiteten af cirkulerende PRRS virus i Danmark og resten af Europa



EU projekt: PoRRSCon (2010-2014)

- **PoRRSCon**: New tools and approaches - to control Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in EU and Asia



- Overordnet mål for PoRRSCon:
 - Udvikle nye vacciner
 - Heterogene virus
 - Effektive – inducerer immunrespons
 - Sikker – ikke muterer til høj-virulent
 - Markør – adskille vaccinerede og naturligt inficerede grise

- **WP3: Geno- og serotypning af PRRS virus**

Eget studie

- **Overordnet formål**

- Øge kendskabet til den genetiske diversitet af PRRSV
- Hvorfor er det vigtigt?
 - Effekten af allerede eksisterende vacciner
 - Sensitiviteten af diagnostiske analyser
 - Studere patogenicitet og virulens forskelle
 - Basisviden for udvikling af nye vacciner

- **Specifikke opgaver**

- Optimerer protokoller for sekventering af ORF5 and ORF7
- Udvikle en robust metode til fuld-genom sequencing
- Studere den genetiske diversitet af Type 1 PRRSV i Danmark
- Studere den genetiske diversitet af Type 2 PRRSV i Danmark



Metode til fuld-genom sekventering af PRRSV Type 1 og Type 2

Baggrund

- Før 2010:
 - Ingen robust protokol for fuld-genom sekventering af PRRSV
- Antal af fuld-genom sekvenser publiceret i GenBank
 - Type 1 PRRSV
 - » Isoleret i Europa: 1
 - » Isoleret i USA/Asien: 6
 - Type 2 PRRSV
 - » Isoleret i Europa : 0
 - » Isoleret i USA/Asien : >50



Resultater

- **9 fuld-genomer af Type 1 PRRSV**
 - 8 sekvenser fra virus isoleret i Danmark
 - 1 sekvens fra en spansk virus

- **9 fuld-genomer af Type 2 PRRSV**
 - Alle 9 sekvenser fra virus isoleret i Danmark

- **Genbank i dag:**
 - Type 1 (Europa): 15 (9 fra dette Ph.d. projekt)
 - Type 1 (USA/Asien): 8
 - Type 2 (Danmark): 13 (Alle fra dette Ph.d. projekt)
 - Type 2 (Europa): 0



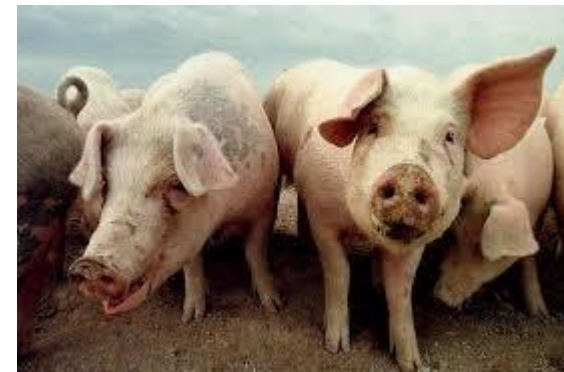
Diversitetsstudier af Type 1 og Type 2 PRRSV i Danmark

Formål

- Studere den genetiske diversitet af Type 1 og Type 2 PRRS virus som cirkulerer i de danske grise
 - Hvilke Type 1 undertyper er tilstede i Danmark
 - Er de danske Type 2 PRRSV stadigvæk ens med vaccinstammen (>98 %)
 - Nye introduktioner af PRRSV stammer
 - Genetisk drift

Metoder

- Sekventering af ORF5 og ORF7 by Sanger sekventering
- Karakterisering af fuld-genom sekvenser
- Fylogenetiske analyser



– Sequences were obtained from viruses isolated from 2003-2013

Type 1:

- 43 ORF5 sekvenser
- 42 ORF7 sekvenser
- 8 fuld-genom sekvenser

Type 2:

- 49 ORF5 sekvenser
- 55 ORF7 sekvenser
- 11 fuld-genom sekvenser

Fylogenetisk analyse af Type 1 ORF5

Rød: DK isoleret 2003-2013

Blå: DK isoleret 1992-1999

Grøn: Porcilis MLV vaccine og Lelystad

Sort: Globale virus isolated 1991-2009



-Mellem de Danske virus (2003-13) var diversiteten: op til 20 %

- Virusserne delte sig i to grupper (I og II)

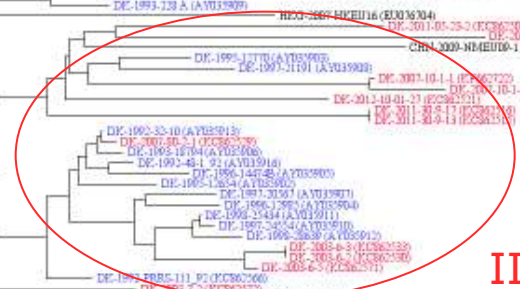
- En vaccine/LV lignende (2008-2013)

- En 'gammel' Dansk (1992-2012)

- Pairwise nucleotide identities:

- Gruppe I til vaccine/LV: 95.2-99.8%

- Gruppe II til vaccine/LV: 84.9-93.6%

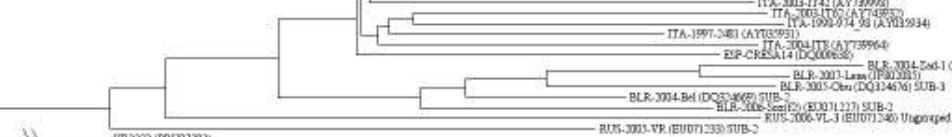


- Alle danske virus tilhører undertype 1

Undertype 2 og 3

DVHS, 8. november 2013

Tree:
Neighbor Joining



Konklusion og diskussion Type 1 PRRSV

- Høj diversitet mellem de danske virus
- Deler sig i to fylogenetiske grupper
- Ingen introduktion af nye undertyper (kun undertype 1)

- Gruppe I
 - Vaccine-lignende virus, isoleret efter 2007
 - Porcilis® PRRS blev introduceret i Danmark i 2001, indikerer cirkulation of vaccine-stammen i de danske svinebesætninger

- Gruppe II
 - Op til 15 % diversitet til vaccinen
 - Hvilken effekt har vaccinen?



Fylogenetisk analyse af Type 2 ORF5

- Konstrueret fra Type 2 PRRSV ORF5 reference sekvens dataset som repræsenterer alle 9 grupper

5.1

- Alle danske Type 2 virus tilhører gruppe 5.1
 - Vaccine/VR2332-lignende virus

- Diversiteten blandt de danske virus:

Optil 9 %

- Diversiteten af de danske virus til vaccinen:

Optil 6 %

5.2

- Danish (1996-2012)
- European
- ▲ Ingelvac MLV vaccine and VR2332
- Global sequences

Konklusion og diskussion Type 2 PRRSV

- Ingen indikationer om nye Type 2 PRRS virus i Danmark
- Op til 9 % diversitet mellem de danske virus i ORF5
- Op til 6 % diversitet til Ingelvac MLV vaccinen
 - Har mere end 2 % forskel til vaccinen nogen betydning for effektiviteten af denne?





Eksperimentel infektion studie med en Type 2 PRRS virus



Baggrund

- I 2010 opstod en alvorlig case af **Type 2 PRRSV** i Nordjylland
 - Højt antal af mumificerede fostre og dødfødte grise
 - Høj dødelighedsrate af levendefødte smågrise
- Prøver var negative for svineinfluenza virus, PCV2, PPV og *Mycoplasma hypneumoniae*
- Forsøgt kontrolleret ved vaccination med Ingelvac MLV
- Virus blev isoleret igen 12 uger efter den første infektion
- 19 uger efter den første infektion: dødeligheden blandt afvænnede grise var tilbage til det normale
- Da de kliniske symptomer virkede til at være mere alvorlig end normalt blev der spekuleret om det kunne være en mere virulent PRRSV som havde udviklet sig

Formål

- Formålet var at lave en genetisk og biologisk karakterisering af case virus
 - Fuld-genom sekvensanalyser af
 - Virus isoleret under den første infektion
 - Virus isoleret 12 uger efter den første infektion
 - Eksperimentel infektion studie
 - Sammenligning af infektionsdynamikken af case virus mod et ældre Dansk Type 2 isolat
 - Undersøge den beskyttende effekt af en MLV Type 2 vaccine mod case virussen

Eksperiment opsætning

- Firetyste 4-uger-gamle SPF grise (Landrace x Yorkshire x Duroc cross-bread)
- Grisene blev inddelt i 4 grupper af 4, 8, 8, and 8 grise:
 - Gruppe 1: Kontrol gruppe, mock inokuleret på DPI 0
 - Gruppe 2: Inokuleret med et 'ældre dansk isolat' (DK-1997-19407B) DPI 0
 - Gruppe 3: Inokuleret med case virus (DK-2010-10-13-1) DPI 0
 - Gruppe 4: Vaccineret med Ingelvac MLV DPI -28
Inokuleret med case virus (DK-2010-10-13-1) DPI 0

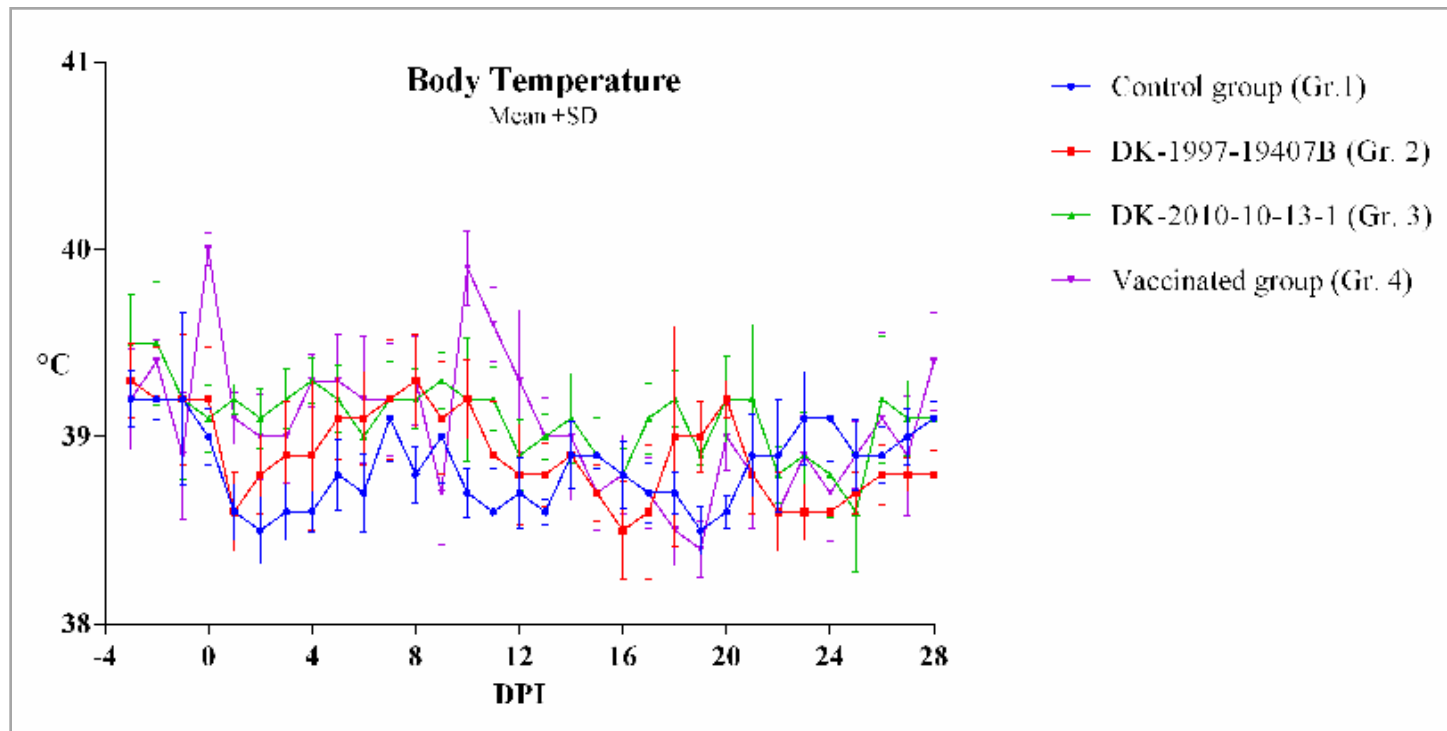
Eksperimentel opsætning

- Klinisk undersøgelse:
 - Grisene blev undersøgt dagligt
 - Kropstemperaturer målt rektalt blev registreret
 - For at kunne sammenligne kliniske tegn blev der brugt et klinisk scoringssystem modificeret for PRRSV
- Prøvetagning:
 - Blodprøver og næsesvaber blev taget på DPI:
-28 (kun blod), 0, 3, 7, 10, 14, 21, 28, and 29/30 (kun blod)
- Aflivning:
 - Gruppe 1 og 4: DPI 29, Gruppe 2 og 3: DPI: 30



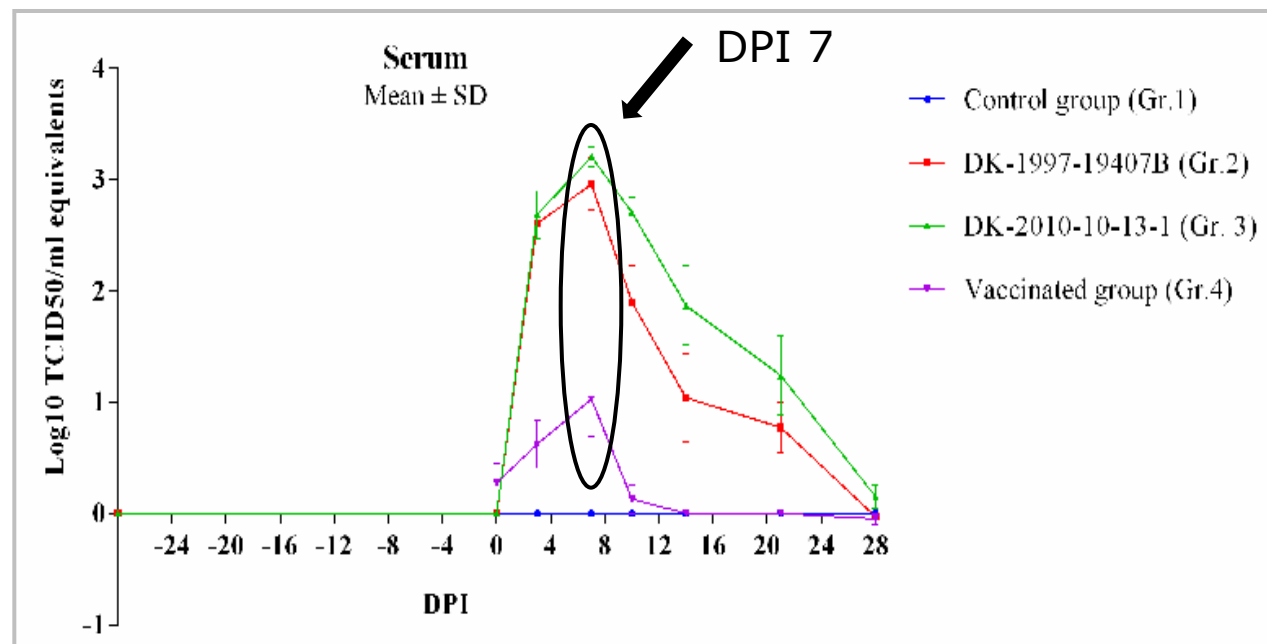
Resultater: Kliniske observationer

- Generelt forblev alle grise raske
 - Korte episoder(1-3 dage) med semi-flydende fæces blev observeret i alle grupper
 - Øget kropstemperatur på DPI 0 og 10 kan skyldes semi-flydende fæces
 - Gennemsnitlig kropstemperatur var ikke over 40°C



Resultater: Virus detektion

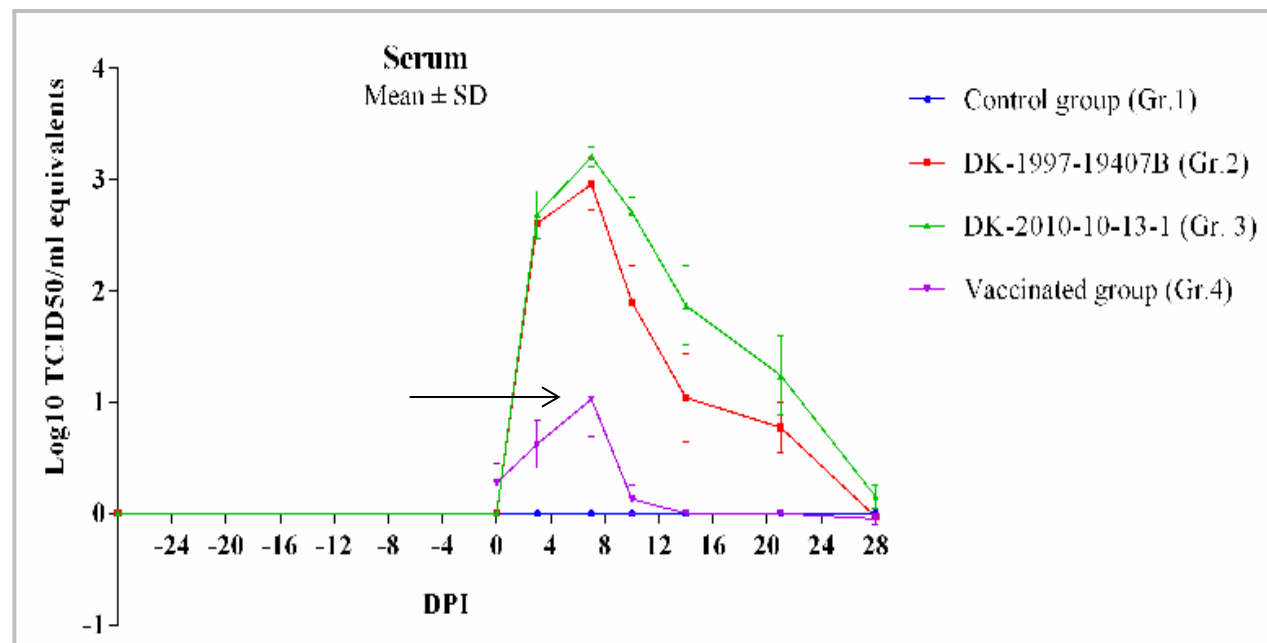
- PRRSV blev påvist ved real-time RT-PCR i alle grise inokuleret med virus (Gruppe 2-4)



- Viræmien toppede på DPI 7, men var lavere og med meget kortere varighed for den vaccinerede gruppe

Resultater: Virus detektion

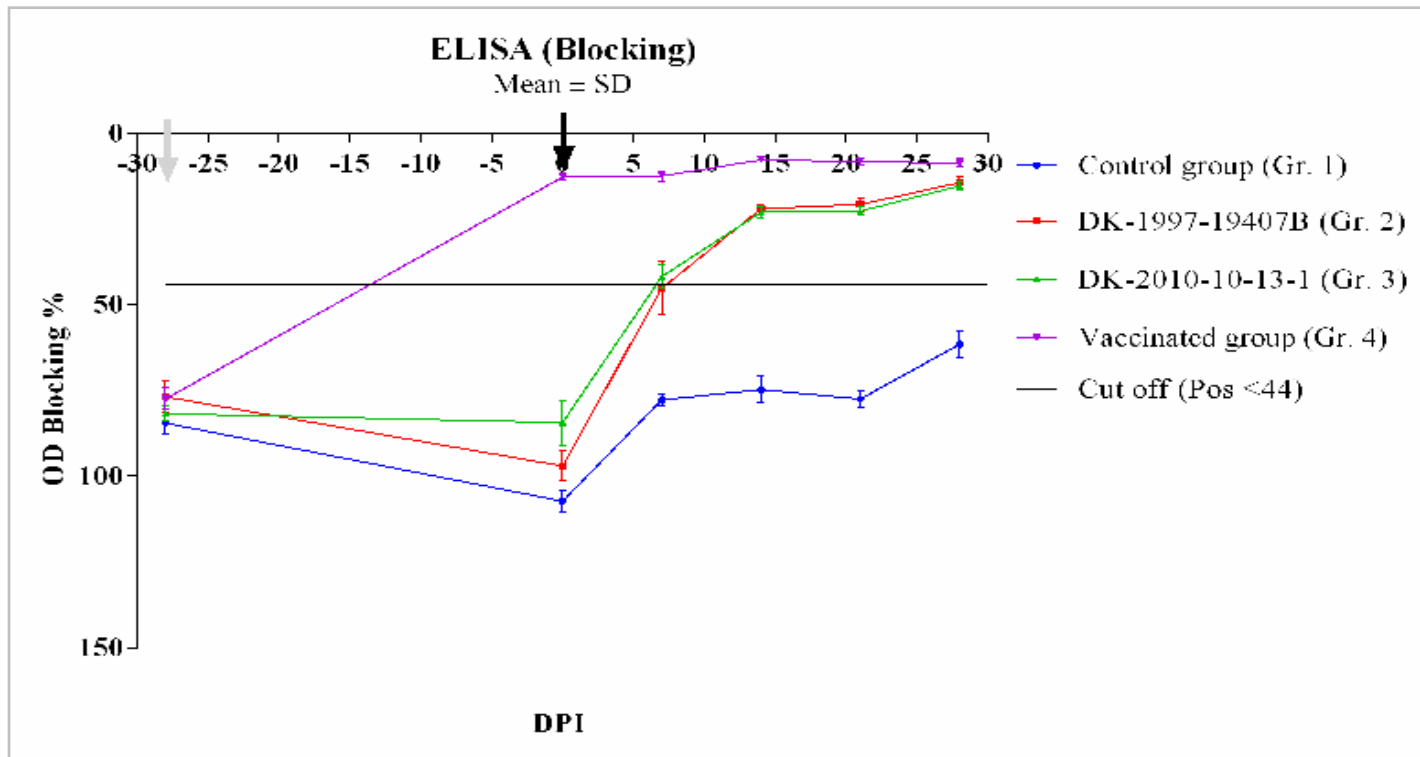
- PRRSV blev påvist ved real-time RT-PCR i alle grise inokuleret med virus (Gruppe 2-4)



- Viræmien toppede på DPI 7, men var lavere og med meget kortere varighed for den vaccinerede gruppe

Resultater: Detektering af antistoffer

- Alle grise i gruppe 2 og 3 var serokonverterede på DPI 7
- Den vaccinerede gruppe havde antistoffer mod PRRSV på DPI 0



Resultater: Genetisk karakterisering

- Fuld-genom sekvenser:
 - Case virus brugt til det eksperimentelle infektions studie (DK-2010-10-13-1)
 - Virus isoleret 12 uger efter den første infektion
- De to virus var 99.7 % identiske
- De var 97.8 % identiske til vaccine stammen
- En 9 nucleotid lang deletion blev fundet in NSP2



3 aminosyre deletion

Aminosyre alignment af partial nsp2

Konklusion og diskusion

- Ikke muligt at reproducere sygdom som set I felten ved dette set-up
- Påvisning af virus ved real-time RT-PCR og antistoffer med ELISA viste at grisene var blevet inficeret
- Vaccination med Ingelvac MLV på DPI -28 reducerede viræmien signifikant
- Case virus lignede vaccinstammen genetisk (97.8 %)
 - Deletion i NSP2 → ikke unik, fundet i andre Danske Type 2 virus
 - Kan måske betragtes som en epidemiologisk markør
- Den alvorlige case af PRRSV set i felten kan være influeret af andre faktorer:
 - Generelle sundhedsstatus, andre infektioner
 - Immunitet
 - Håndtering og management procedure
- Gentage forsøget i en so-model

A fast and robust method for full genome sequencing of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) Type 1 and Type 2[☆]

Lise K. Kvisgaard^{a,*}, Charlotte K. Hjulsager^a, Ulrik Fahnøe^b, Solvej Ø. Breum^a, Tahar Ait-Ali^c, Lars E. Larsen^a

^a National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Frederiksberg C, Denmark

^b National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, Lindholm, Denmark

^c The Roslin Institute and Royal (Dick) School of Veterinary Studies, The University of Edinburgh, UK

Genetic and antigenic characterization of complete genomes of Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome viruses (PRRSV) isolated in Denmark over a period of 10 years[☆]

Lise K. Kvisgaard^{a,*}, Charlotte K. Hjulsager^a, Charlotte S. Kristensen^b, Klara T. Lauritsen^a, Lars E. Larsen^a

^a National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark

^b Pig Research Centre, Danish Agriculture & Food Council, DK-8620 Kjellerup, Denmark

Genetic dissection of complete genomes of Type 2 PRRS viruses isolated in Denmark over a period of 15 years[☆]

Lise K. Kvisgaard^{a,*}, Charlotte K. Hjulsager^a, Manreetpal Singh Brar^b, Frederick C.C. Leung^{b,c}, Lars E. Larsen^a

^a National Veterinary Institute, Technical University of Denmark, DK-1870 Frederiksberg C, Denmark

^b School of Biological Sciences, University of Hong Kong, Hong Kong, China

^c Bioinformatics Center, Nanjing Agriculture University, Nanjing, China

Tak!

- **Ph.d.-vejleder**

- Lars E. Larsen
- Charlotte K. Hjulsager

- **Laboranter**

- Helene
- Hue
- Kristine
- Sari
- Tine

- **Virologi, Bülowsvej**

- Ramona
- Solvej
- Jesper
- Kristina
- Simon

- **PCR Diagnostikken (DTU-Vet)**

- Sofie
- Rana
- Ivan
- Cathrine
- Jonas

- **Alle medarbejdere i Sektion for Virologi and DTU-Vet**

- **Medforfattere**

- Ulrik Fahnøe (DTU)
- Tahar Ait-Ali (University of Edinburgh)
- Charlotte S. Kristensen (VSP)
- Klara Tølbøll Lauritsen (DTU)
- Manreetpal S. Brar (University of Hong Kong)
- Frederick C.C.C. Lueng (University of Hong Kong)
- Anette Bøtner (DTU)
- P.H. Rathkjen (Boehringer Ingelheim Denmark)
- Peter M.H. Heedegaard
- Mette Sif Hansen
- Jens Nielsen

- **PoRRSCon and COST økonomisk støtte**

- **Tak til:**

- Thomas Bruun Rasmussen (DTU)
- Janne Holm Hansen (tidl. på DTU)
- Natalie Lowe (University of Edinburgh)
- Heather Finlayson (University of Edinburgh)
- Richard Talbot (ARK genomics)

