

Partiel genetisk karakterisering af PRRSV påvist i indsendelse fra Hatting Juli/august 2019 – foreløbige resultater

Revideret: 18.08.2019

Lars Erik Larsen, KU/DTU (lael@sund.ku.dk)

Bidrag fra: Lise Kvisgaard, DTU, Pia Ryt-Hansen DTU og Tomasc Stajdek, Warszawa Universitet, Polen

Abstract

DTU Veterinærinstituttet har efter aftale med SEGES og Hatting lavet en genetisk karakterisering af PRRSV PCR positive serum prøver fra orner fra Hatting Ornestation, Horsens. I alt blev der sekventeret en del af genomet (ORF2-ORF7) fra otte prøver fordelt på to indsendelser. Tolkningen af de foreløbige data er, at "Hatting viruset" er et virus der er signifikant forskellig fra andre kendte virus i Danmark. Endvidere er det vurderingen, at det er opstået som en blanding (rekombination) mellem et virus med stor lighed til virus stammen "Amervac", der er indeholdt i vaccinen "Unistrain", og et andet virus som er mere end 7 % forskellig fra alle andre kendte PRRSV virus. De 8 virus er identiske så det tyder på, at der kun har været en enkelt introduktion i besætningen.

Baggrund og Metode

DTU Veterinærinstituttet har efter aftale med SEGES og Hatting Ornestation lavet en genetisk karakterisering af PCR positive serum prøver fra orner fra Hatting Ornestation, Horsens. I alt blev der sekventeret otte pools (hver med fem prøver) fordelt på to indsendelser fra henholdsvis den 24.7 og 31.7. 2019. Området af viruset, der er blevet sekventeret indtil nu, er de såkaldte ORF2-ORF7 som er de dele af PRRSV, der koder for proteiner, der udgør virus partiklen (strukturelle proteiner). Sekvensanalyse af den resterende del (ORF 1) af viruset pågår.

Resultater

ORF 5

ORF5 er det gen, der traditionelt er anvendt til sekvensanalyse af PRRSV, så der er relativt mange sekvenser at sammenligne med både fra Danmark og udlandet. Analysen af ORF5 viste, at de otte prøver fra Hatting indeholdt PRRSV, var mellem 99,3 og 100 % identiske, med en maximal forskel på to baser (tabel 1).

Sekvenserne fra Hatting blev også sammenlignet med danske PRRSV virus isoleret mellem 1992 og 2018, repræsentative prøver fra udlandet, samt de virusstammer, der indgår i levende (MLV) vacciner, som er kommercielt tilgængelig i Europa. Disse fylogenetiske analyser viste at "Hatting virusset" grupperede sig i det fylogenetiske træ i et "cluster" sammen med ældre stammer fra Rumænien, Portugal og Spanien, en kinesisk sekvens af ukendt oprindelse, samt PRRSV stammen "Amervac". "Amervac" er genetisk identisk med stammen, der betegnes VP- 046 BIS. Denne stamme er inkluderet i MLV vaccinen "Unistrain" fra HIPRA, som har været på det danske marked siden 2017.

Hatting sekvenserne var godt 8 % forskellig fra flertallet af de danske PRRS virus og derved også godt 8 % forskellig fra Porcilis vaccine stammen. Forskellen svarer til 38-45 nukleotiders forskel. Derimod var "Hatting sekvenserne" 98,84-99,01 % identiske med Amervac stammen (svarende til 6-8 nukleotiders forskel).

	Intern identitet (%)		Identitet til Amervac (%)	
	Nt	AA	Nt	AA
ORF2	99.9-100	99.6-100	92.67-92.8	93.6-94
ORF3	99.9-100	100	96.7-96.8	94.7
ORF4	99.9-100	100	98.9-99.1	98.9
ORF6	100	100	99.4	98.85
ORF7	100	100	99.7	99.1
ORF2-7	99,9	99.8-99.9	97.3	96.43-96.52

Tabel 1. Graden af lighed imellem "Hatting virus" isolaterne (Intern identitet) og vaccinstammen Amervac. Nt = nukleotider; AA= aminosyrer

ORF2-7

Efterfølgende blev en større del af genomet sekventeret, svarende til ORFs 2, 3, 4, 6 og 7. Der findes signifikant færre sekvenser i databaser for dette område, men sekvenserne blev sammenlignet med alle eksisterende data.

Analysen viste at der, i lighed med ORF 5, var stor lighed i alle ORF mellem de otte Hatting isolater idet de var 99,9 – 100 % identiske på gen niveau. Sammenligning af ORF 4, 6 og 7 viste, at Hatting virus også havde stor lighed med "Amervac" vaccinstammen i disse ORFs – altså samme billede som med ORF5 (tabel 1).

Analyse af ORF2 gav derimod et meget anderledes resultat, idet ORF2 var 7-8 % forskellig fra Amervac vaccine stammen. Endvidere viste analysen, at den højeste grad af lighed mellem ORF2 til alle ORF2 sekvenser fra genbank var 94 %. ORF2 fra Hatting viruset var altså mere end 6 % forskellig fra alle andre kendte PRRS virus. "Hatting viruset" var også mere forskellige (3 %) fra "Amervac" i ORF 3 end i ORF4-7.

Herefter blev der foretaget såkaldt rekombinationsanalyser. Dette er bioinformatiske værktøjer designet til at undersøge, om et virus er dannet ved at to virus (såkaldte forældre virus) har blandet gener (rekombineret) og dannet et nyt virus med noget af gensekvensen fra det ene virus og en anden del fra det andet virus (et rekombinant virus). Man analyserer typiske med flere algoritmer og ser så om de er enige. Analysen af Hatting viruset viste, at 5 ud af 7 algoritmer var enige og fandt at størstedelen af viruset (base 1-137 og base 859-3244) havde 99,3 % lighed med "Amervac" vaccine stammen. En mindre del af gensekvensen (720 baser) i det område, der koder for ORF2 og dele af ORF3, var 8 % forskellig fra "Amervac" og var forskellig fra alle andre publicerede PRRSV sekvenser. Dette område havde den største grad af lighed (90-93 %) med en række andre PRRSV-1, subgruppe 1 stammer, herunder nogle ældre danske PRRSV stammer.

Diskussion

De otte PRRS virus, der blev sekventeret fra to forskellige indsendelser fra Hatting, viste stor grad af lighed, hvilket tyder på, at der har været en enkelt introduktion i besætningen. Dette stemmer også med forløbet og de andre laboratorieanalyser, der er foretaget før, under og efter viruset blev påvist.

Alle analyserede gener af "Hatting" virus er klart forskelligt fra hovedparten af de PRRS virus, der er sekventeret fra Danmark de seneste 20 år og ligeledes klart forskellig fra Porcilis vaccinstammen. Det skal dog understreges, at det er en forsvindende lille del (små promiller) af de cirkulerende PRRS virus i Danmark, der bliver fuld genom sekventeret, så det kan ikke udelukkes, at der cirkulerer en population af felt PRRSV virus med høj grad af lighed med "Hatting" viruset.

Den mest sandsynlige tolkning af resultaterne af sekvensanalyserne, de fylogenetiske analyser samt rekombinationsanalyserne er, at "Hatting" viruset er et rekombinant virus, der er opstået ved en rekombination mellem et ukendt virus og et virus med stor lighed med "Amervac". Dette virus kan enten være et "Amervac-lignende" feltvirus eller vaccine viruset direkte.

Rekombination mellem PRRS virus har været kendt i mange år og er også tidligere påvist i Danmark (Martin-Valls, Kvisgaard et al., 2014). De senere år er der rapporteret om flere og flere fund af rekombination både mellem to feltstammer og mellem feltstammer og vaccinstammer (Chen, Liu et al., 2017; Marton, Szalay et al., 2019) og der er også en enkelt rapport om rekombination mellem 2 vaccinstammer – Unistrain og Porcilis (Eclercy, Renson et al., 2019). Det er ikke klart om dette skyldes at rekombination har haft en stigende tendens som følge af den øgede brug af massevaccination eller om det blot afspejler, at der sekventeres flere fuld genom PRRS virus nu i forhold til tidligere. Af de publicerede rapporter er specielt en rapport fra Ungarn (Marton, Szalay et al., 2019) interessant, da de fandt et virus med rekombination i samme område som "Hatting virus", men forskellen til det ungarske virus er så stor at det med stor grad af sikkerhed kan fastslås at det ikke er det samme virus. Det vides ikke hvornår denne rekombination er sket, men den del af viruset der ligner Amervac har så høj grad af lighed med denne stamme (> 99 %) at det tyder på at denne rekombination er sket for kort tid siden. På baggrund af de data, der er tilgængelig nu, er det heller ikke muligt at fastslå oprindelsen af viruset. Forudsat at den gensekvens der findes for "Amervac" i Genbank er korrekt, kan det dog fastslås med sikkerhed at viruset ikke er et rent "Unistrain" vaccinevirus.

Konklusion

Den foreløbige konklusion er at "Hatting virusset" er opstået som en rekombination mellem et virus med stor lighed til virus stammen "Amervac" og et andet virus, som er mere end 7 % forskellig fra alle andre kendte PRRSV virus. Denne konklusion forudsætter at den stamme, der er uploadet i genbank under navnet "Amervac", er identisk med stammen i vaccinen "Unistrain".

Reference List

- Chen, N., Liu, Q., Qiao, M., Deng, X., Chen, X., Sun, M., 2017. Whole genome characterization of a novel porcine reproductive and respiratory syndrome virus 1 isolate: Genetic evidence for recombination between Amervac vaccine and circulating strains in mainland China. *Infect.Genet.Evol.* 54, 308-313.
- Eclercy, J., Renson, P., Lebret, A., Hirchaud, E., Normand, V., Andraud, M., Paboeuf, F., Blanchard, Y., Rose, N., Bourry, O., 2019. A Field Recombinant Strain Derived from Two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) Modified Live Vaccines Shows Increased Viremia and Transmission in SPF Pigs. *Viruses.* 11.
- Martin-Valls, G. E., Kvisgaard, L. K., Tello, M., Darwich, L., Cortey, M., Burgara-Estrella, A. J., Hernandez, J., Larsen, L. E., Mateu, E., 2014. Analysis of ORF5 and full-length genome sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates of genotypes 1 and 2 retrieved worldwide provides evidence that recombination is a common phenomenon and may produce mosaic isolates. *J.Virol.* 88, 3170-3181.
- Marton, S., Szalay, D., Kecskemeti, S., Forro, B., Olasz, F., Zadori, Z., Szabo, I., Molnar, T., Banyai, K., Balint, A., 2019. Coding-complete sequence of a vaccine-derived recombinant porcine reproductive and respiratory syndrome virus strain isolated in Hungary. *Arch.Virol.*