



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
DI PADOVA



Webinar SIPAS – *PRRSV e sequenziamento: criteri, opportunità e corretto impiego*»

3 Dicembre 2020



Società Italiana di Patologia
ed Allevamento dei Suini

S.I.P.A.S. www.sipas.org

La PRRS tra passato, presente e futuro

Michele Drigo

Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute
Università di Padova

Il percorso di questo incontro

- PRRSV aspetti eziologici e patogenetici
- variabilità genetica PRRSV
- variabilità genetica PRRSV e diagnostica
- variabilità genetica PRRSV e biologia
- variabilità genetica PRRSV e ricombinazione
- At home message

I virus: PRRSV-1 & PRRSV-2

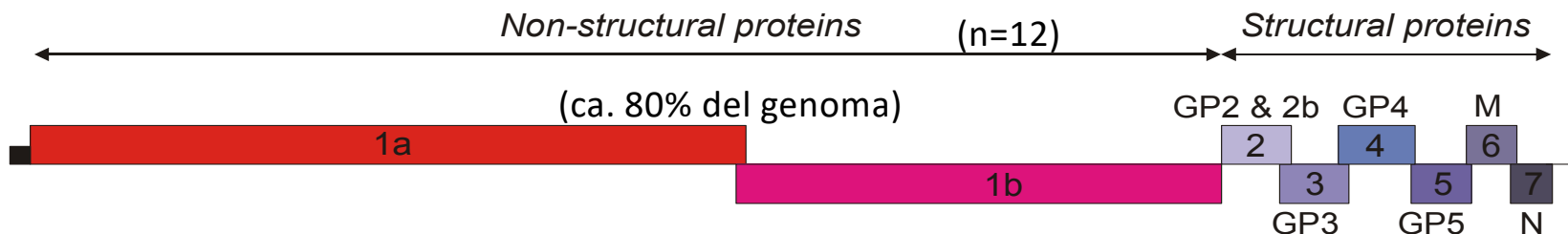
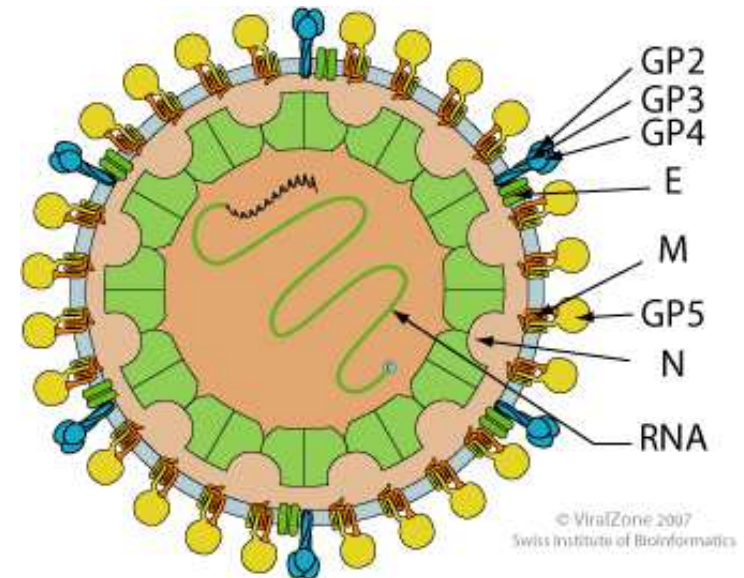
ieri

- PRRSV-1: Paesi Bassi, **Lelystad virus** (Wensvoort et al. 1991) -> (**Ceppo/Genotipo Europeo -> Type1**)
- PRRSV-2: USA, **VR-2332** (Collins et al. 1992) -> (**Ceppo/Genotipo Americano -> Type2**)

- (+)ssRNA virus con envelope
- *Arteriviridae* famiglia
 - *Betaarterivirus* genere

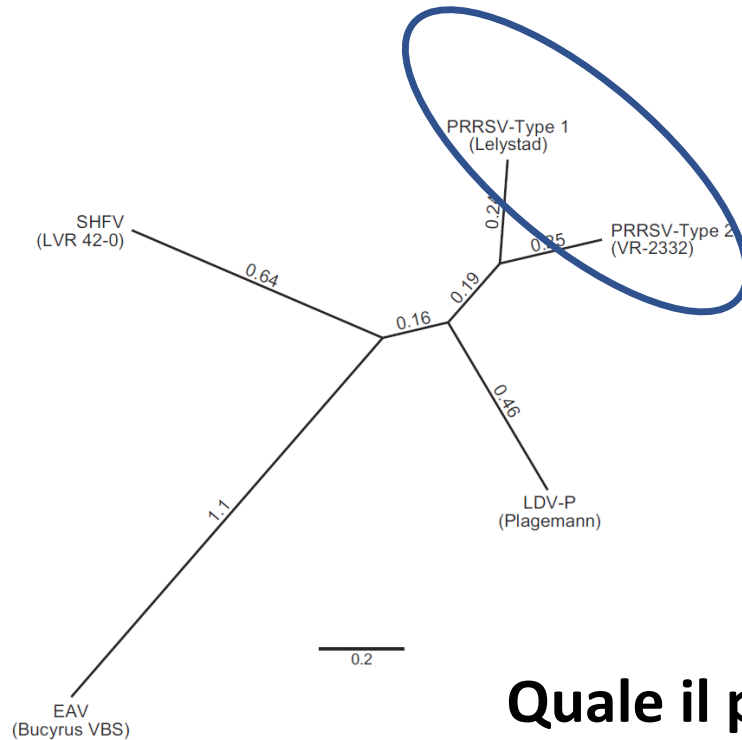
oggi

- **Specie: *betaarterivirus suid 1* (PRRSV-1)**
- **Specie: *betaarterivirus suid 2* (PRRSV-2)**



Arteriviridae tassonomia

domani?

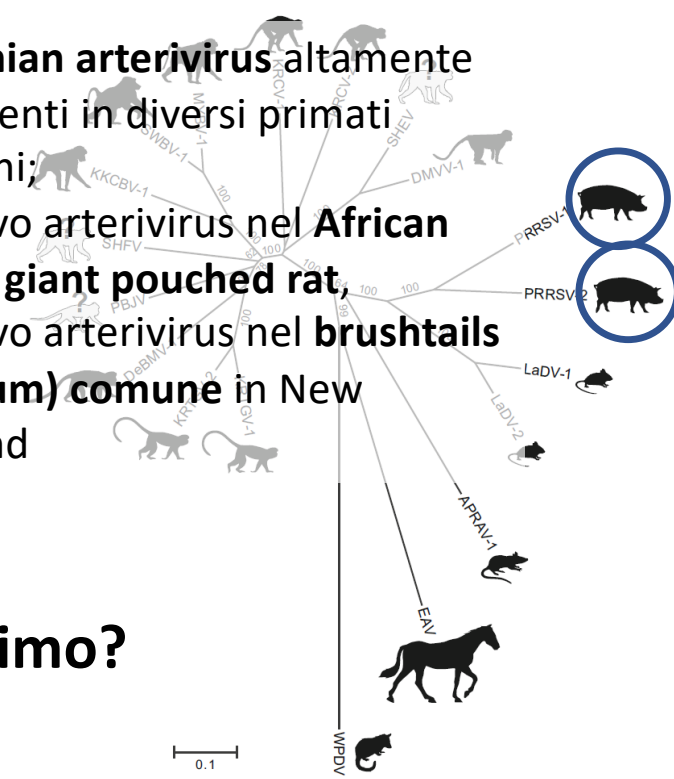


In 2012

Faaberg et al. 2012, Family Arteriviridae.

11 simian arterivirus altamente divergenti in diversi primati Africani;

1 nuovo arterivirus nel African forest giant pouched rat,
1 nuovo arterivirus nel brushtails (possum) comune in New Zealand

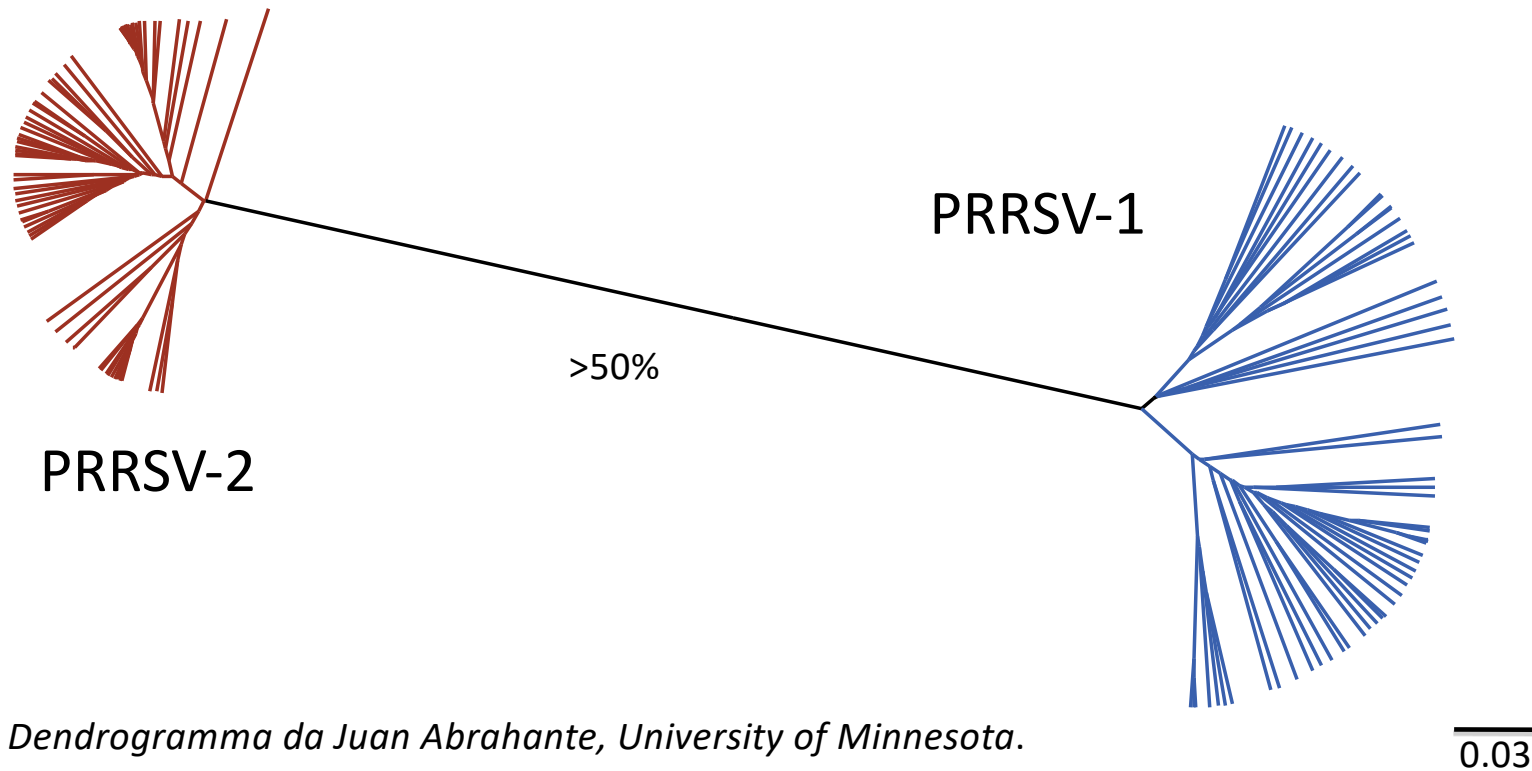


In 2016

Kuhn et al. Arch Virol. 161, 2016

Quale il prossimo?

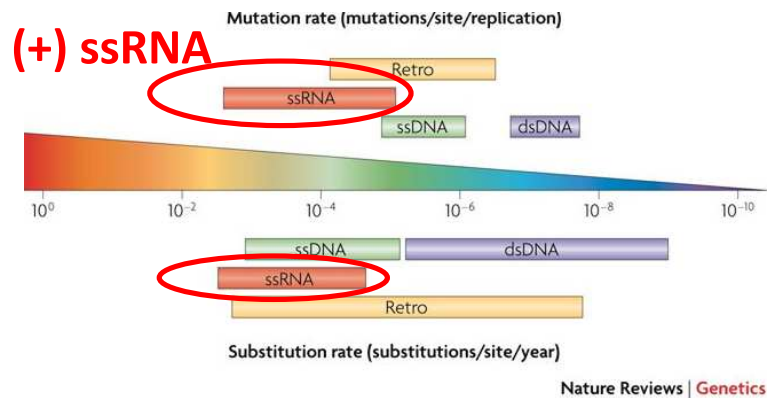
PRRSV-1 and PRRSV-2 sono due specie virali diverse che causano una malattia - PRRS



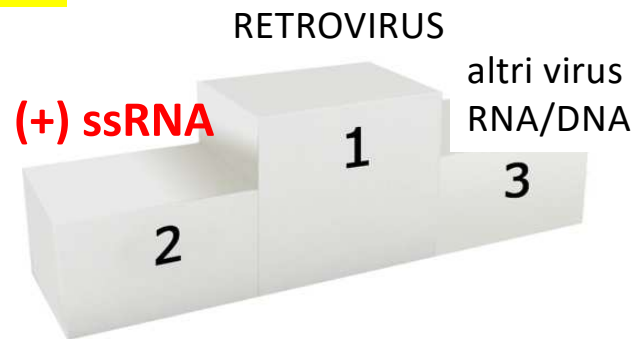
Dendrogramma da Juan Abrahante, University of Minnesota.

VIRUS

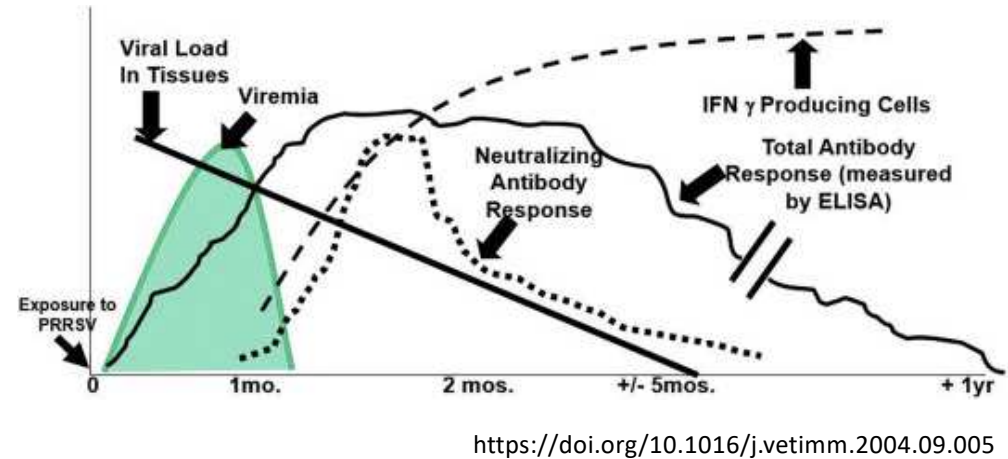
- variabilità genetica (DRIFT)



- ricombinazione



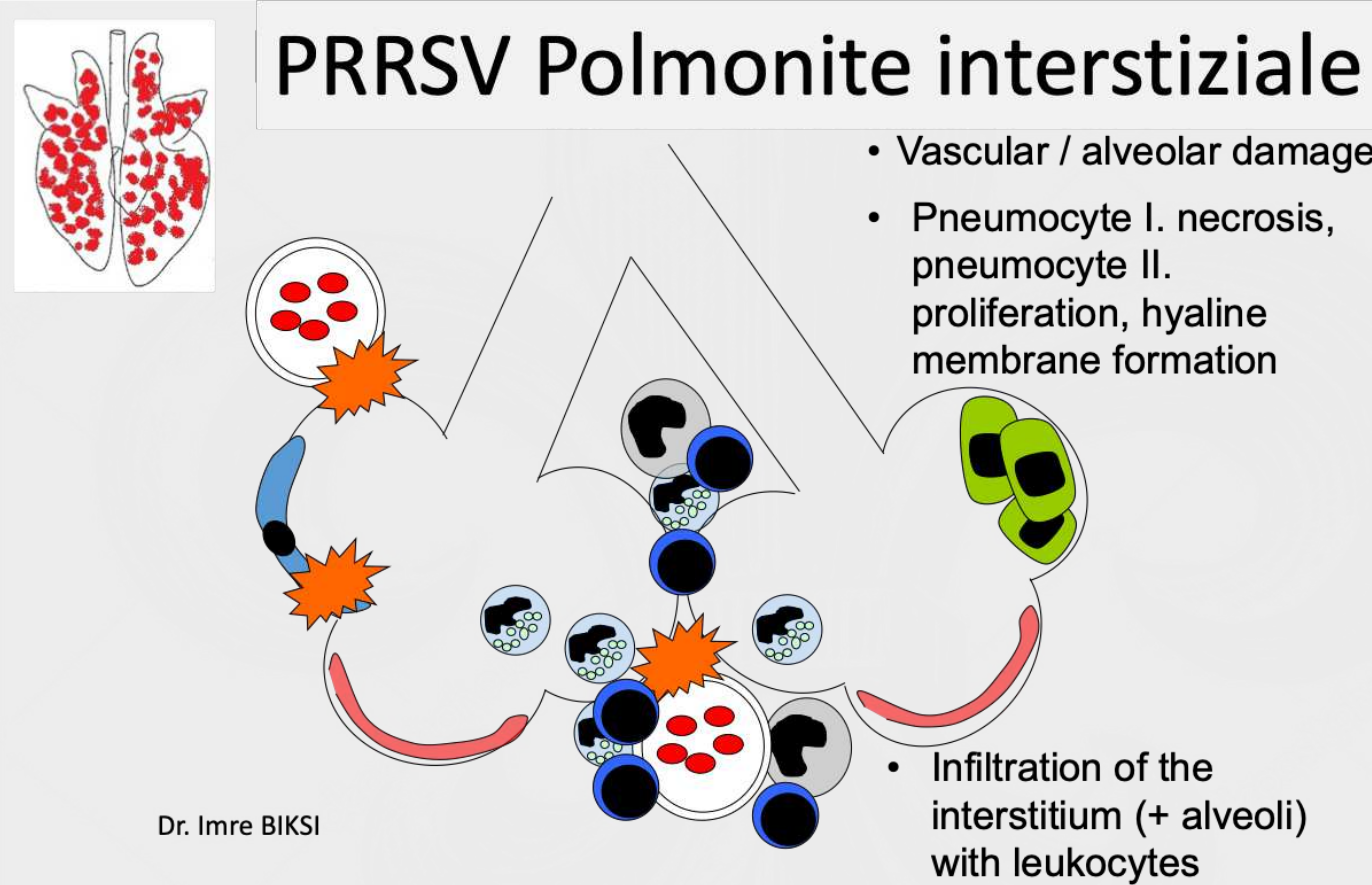
OSPITE



- Viremie piuttosto lunghe
- Tardiva risposta Anticorpale Neutralizzante e Cellulo-mediata
- Risposta Umoreale (non sterilizzante) misurabile (ELISA) per ca. 1 anno

MALATTIA

PRRSV: Danno e Meccanismo patogenetico



- 1) **Replicazione in Macrofagi** di tonsille, tratto respiratorio superiore e polmoni → **viremia in 12h PI che può durare settimane**
- 2) **UP regolazione di citokine pro-infiammatorie** (TNF- α , INF- β)
- 3) **DOWN regolazione di citokine anti-infiammatorie**
- 4) **Aumento Livelli di aptoglobina**
 - Espressione Recettore CD163 che favorisce entrata cellulare e replicazione
 - Diminuzione della attività battericida dei macrofagi**

Immunosoppressione + Immunomodulazione

PRRSV Polmonite interstiziale



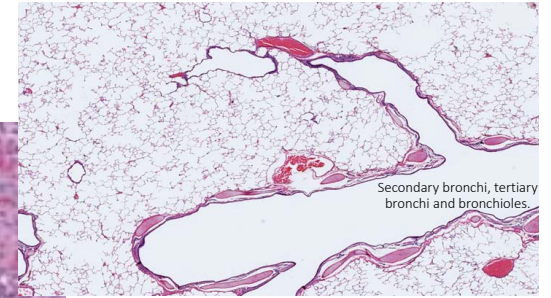
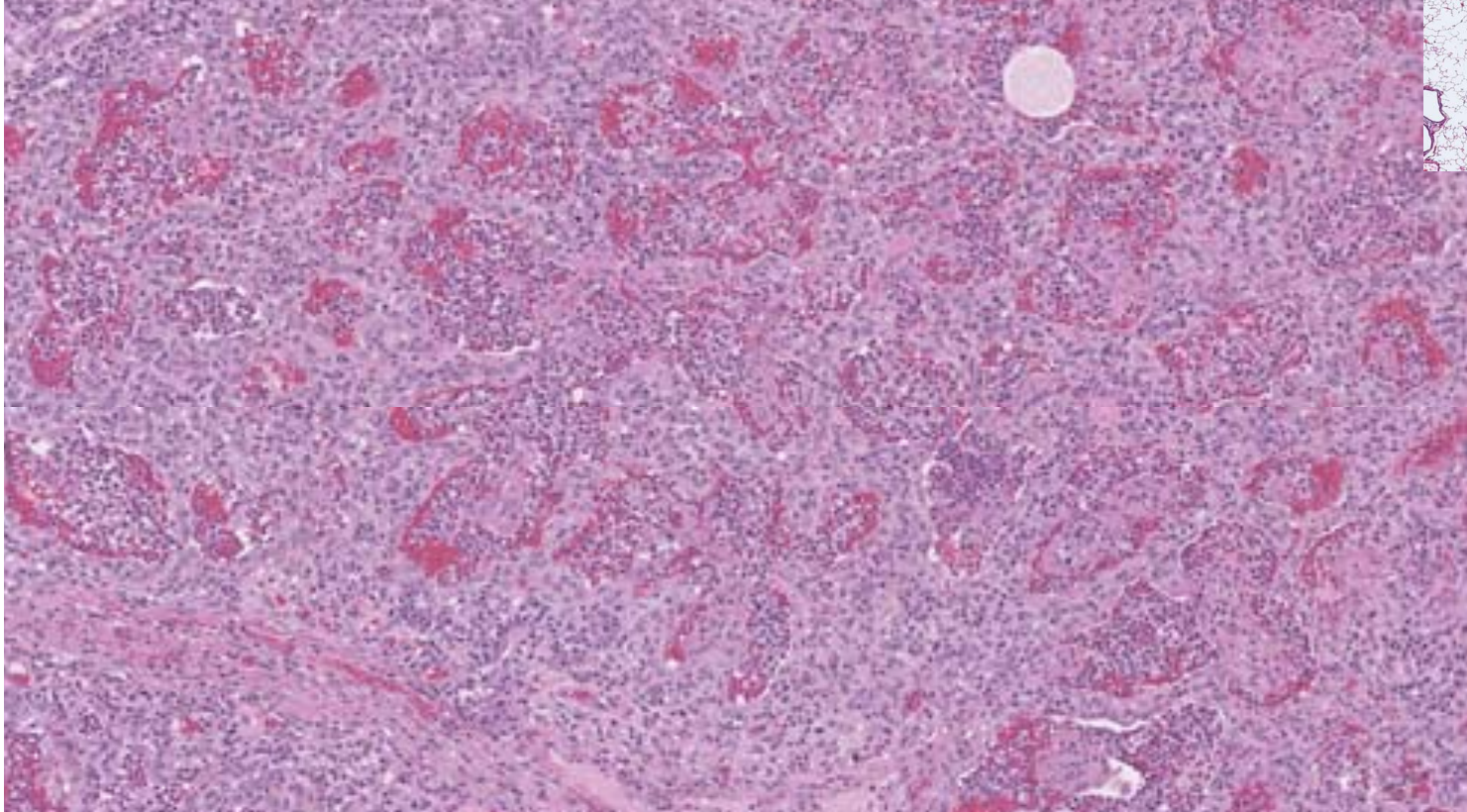
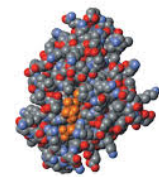
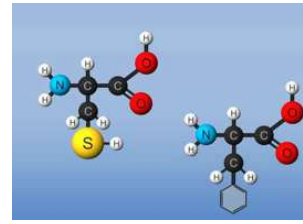


Foto Pablo Arruda – ISU/CVM

Perchè l'informazione genetica è utile nello studiare il virus della PRRS?

- Il genoma di PRRSV è altamente predisposto a mutare (ca. 1 errore/10000 lettere)
- La sequenza dell'acido nucleico (l'ordine dei nucleotidi) di ogni stipite virale è unica (quindi la sequenza è come un'impronta digitale!) e potenzialmente influenza la struttura virale (nucleotidi->aminoacidi->proteine)



Identità

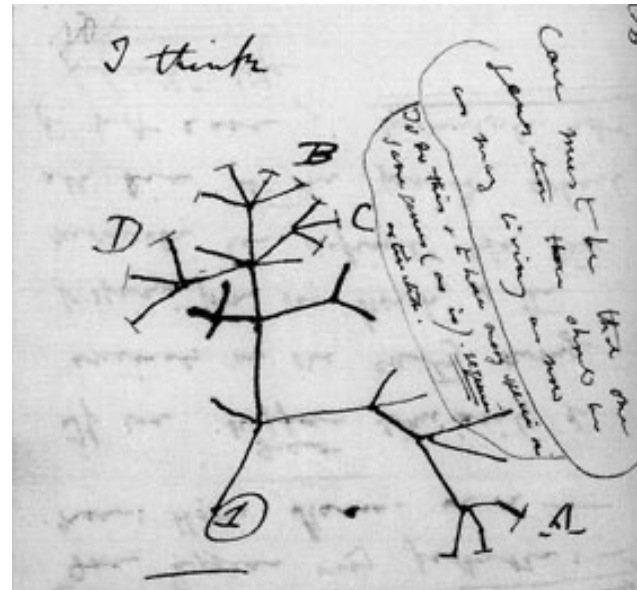


Funzione

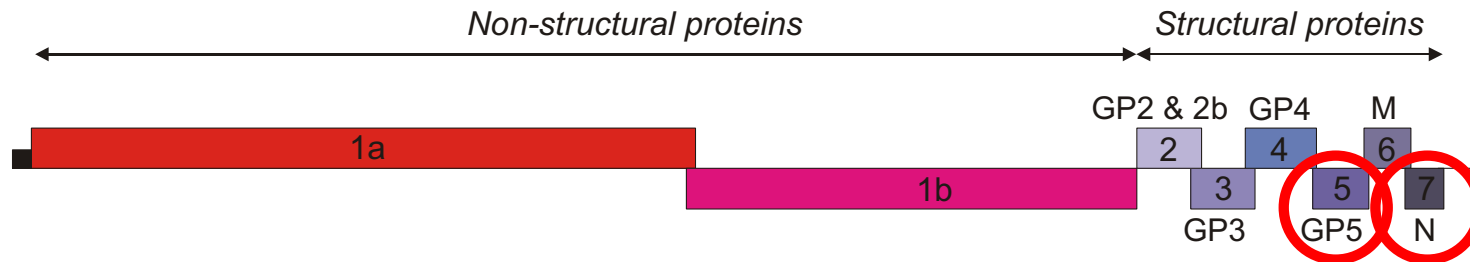
Cos'è la filogenesi?

L'obiettivo della filogenesi (in generale) è quello di **cogliere le relazioni evolutive tra specie diverse!**

(cogliere le relazioni tra stipiti virali nel nostro caso!)

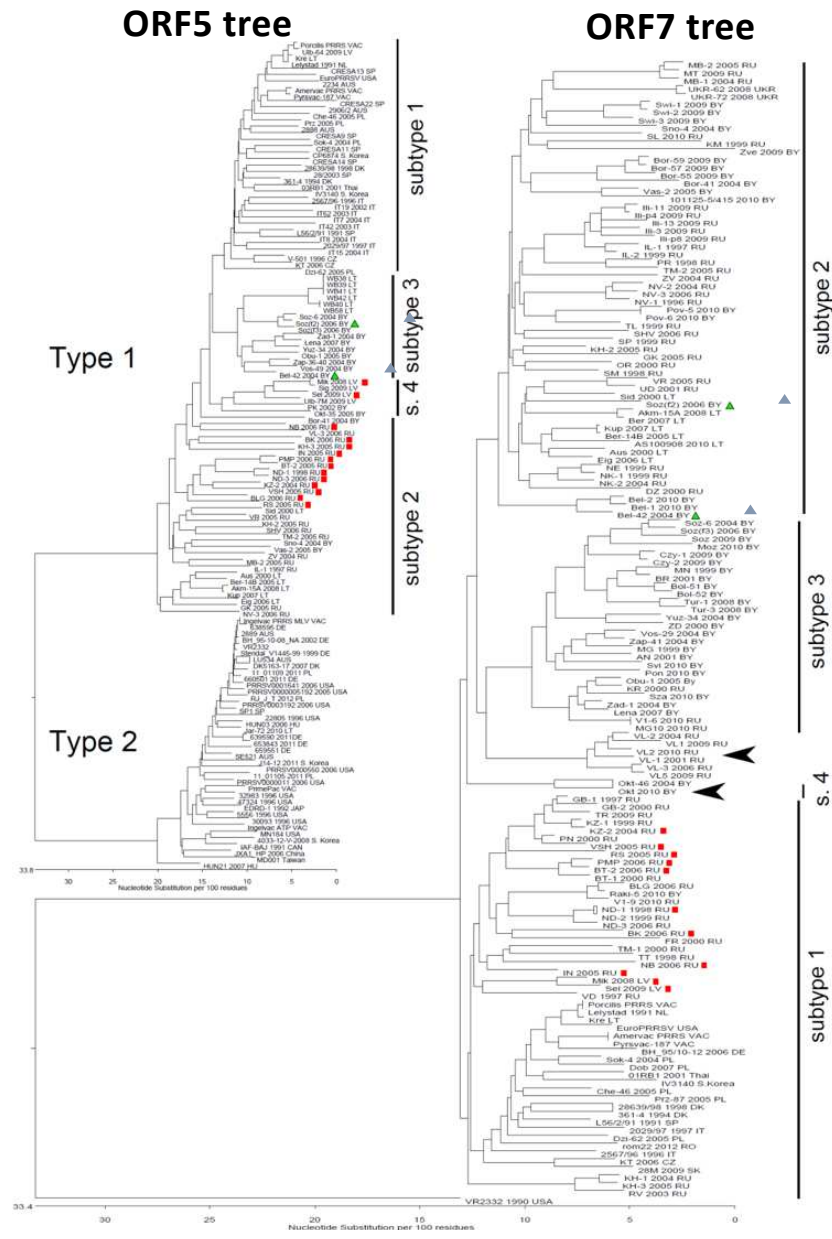


- La ricostruzione di un albero filogenetico (cioè le relazioni) è una **PROCEDURA di STIMA** in cui la storia evolutiva viene fatta sulla base di **INFORMAZIONI INCOMPLETE**
- Cattiva qualità delle sequenze, o impropria selezione del set di referenza possono portare a conclusioni errate



ATTENZIONE: molto spesso la storia evolutiva di PRRSV è ricostruita sulla base di sequenza nucleotidiche di una frazione molto piccola del genoma intero!!

[meno di 1000 nucleotidi (ORF5+ORF7) su 15000 (intero genoma)]≈6-7%

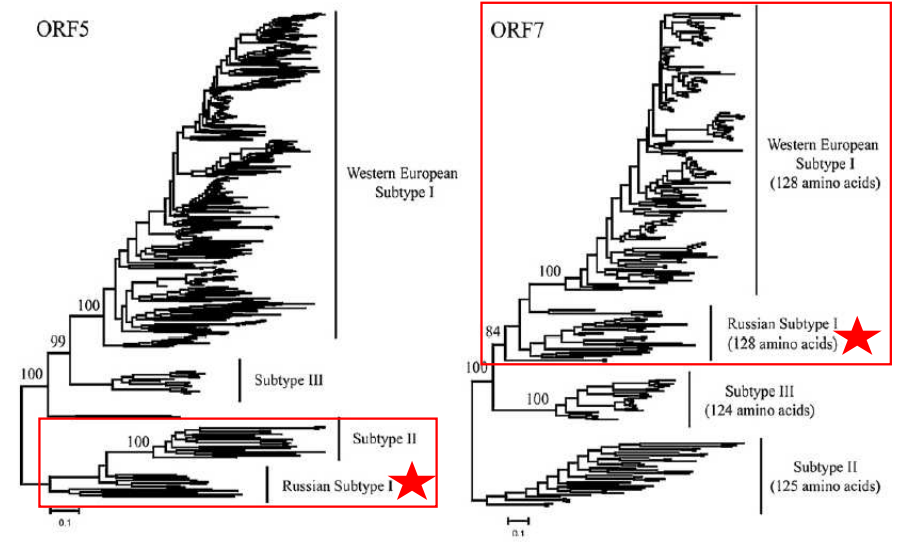


Molecular evolution of PRRSV in Europe: Current state of play

Tomasz Stadejek ^{a,*}, Arunas Stankevicius ^b, Michael P. Murtaugh ^c,
Martin B. Oleksiewicz ^d

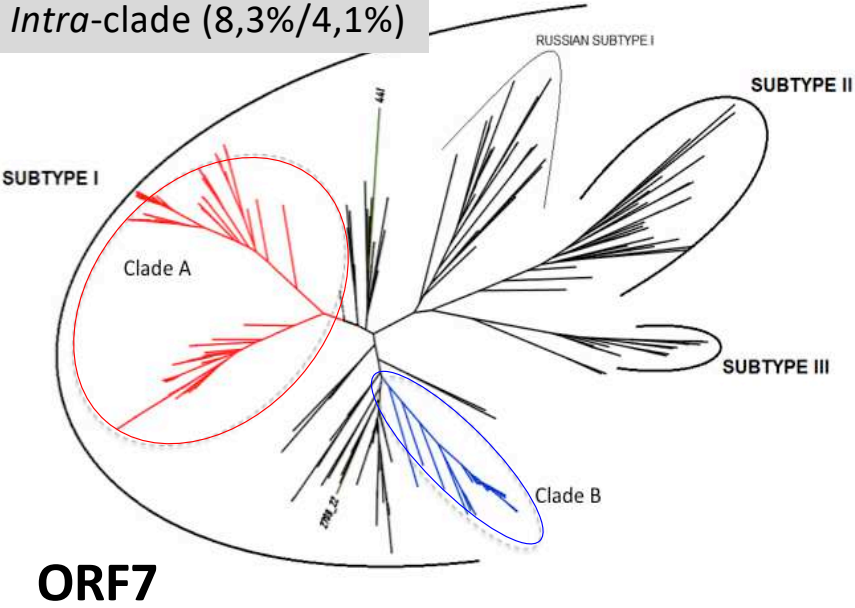
^a Department of Pathology and Veterinary Diagnostics, Faculty of Veterinary Medicine, Warsaw University of Life Sciences – SGGW, Nowoursynowska 159c, 02-776 Warsaw, Poland
^b Laboratory of Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, Lithuanian University of Health Sciences, LT-47181 Kaunas, Lithuania
^c Department of Veterinary and Biomedical Sciences, University of Minnesota, 1971 Commonwealth Avenue, St. Paul, MN 55108 USA
^d Ministry of Education and Research, Government of Greenland, Greenland

M. Shi et al. / Virus Research 154 (2010) 7–17



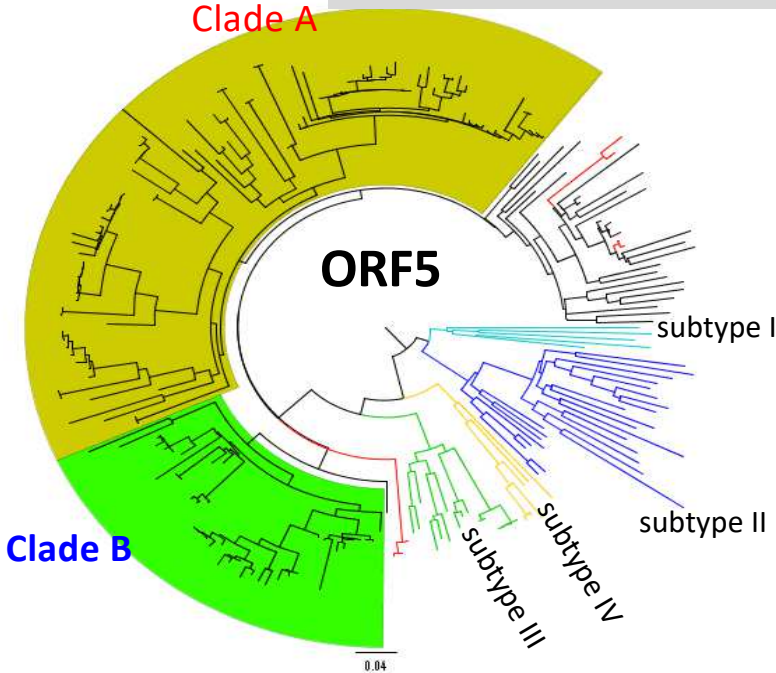
Quale la situazione italiana?

Inter-clade (12%)
Intra-clade (8,3%/4,1%)



Due Clades principali ben distinti!

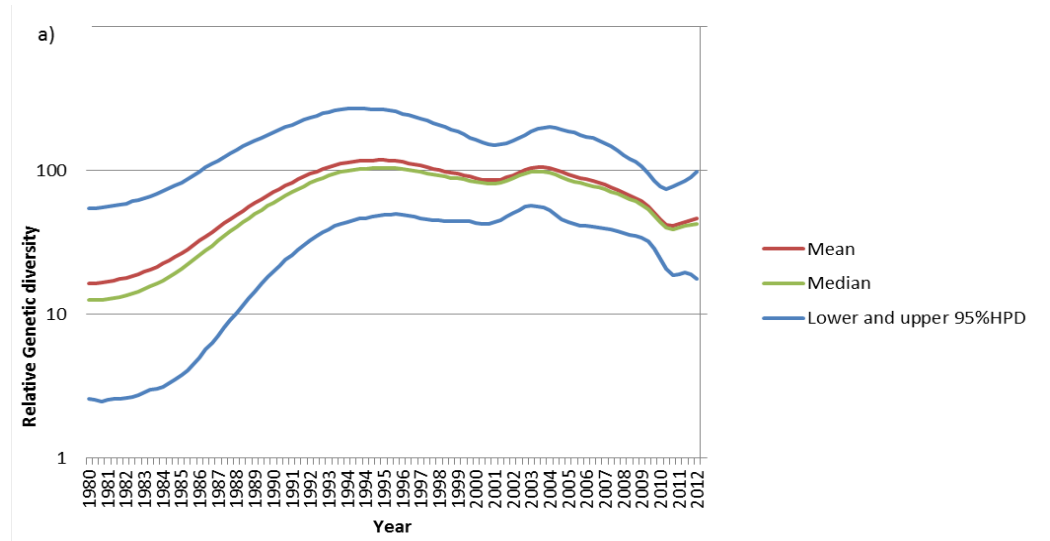
Inter-clade (15,3%)
Intra-clade (12,4%/8,8%)



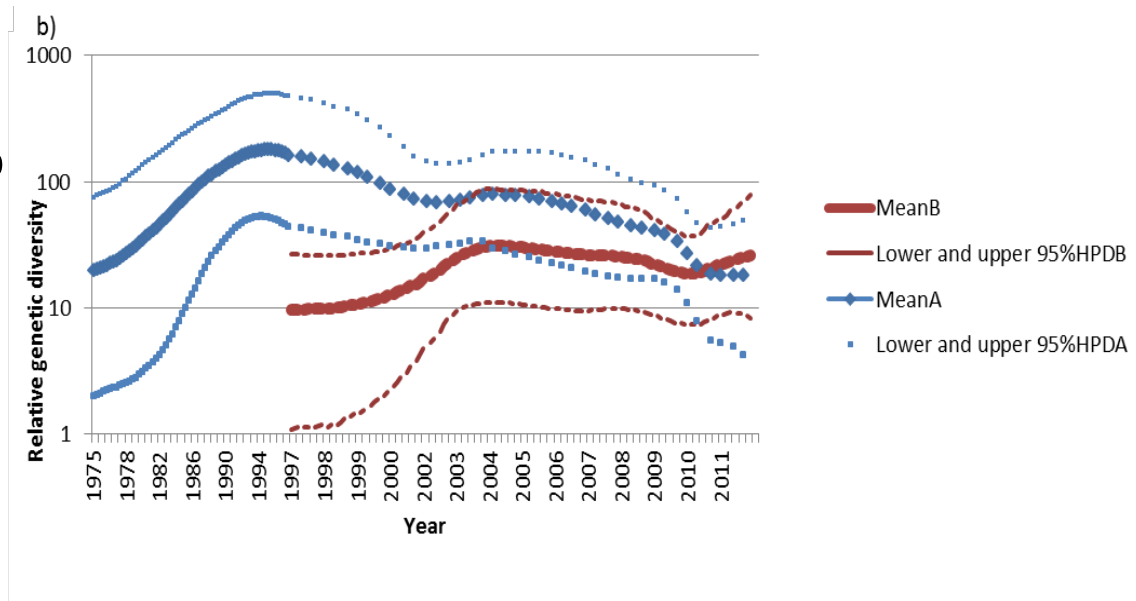
Cosa comporta una ampia variabilità genetica?

- Differenti dinamiche delle diverse popolazioni virali nel tempo e nello spazio
- Possibili ripercussioni su performances diagnostiche (PCR) - “mismatches”
- Possibili ripercussioni sul rapporto virus-ospite

Differenti dinamiche delle diverse popolazioni virali nel tempo e nello spazio



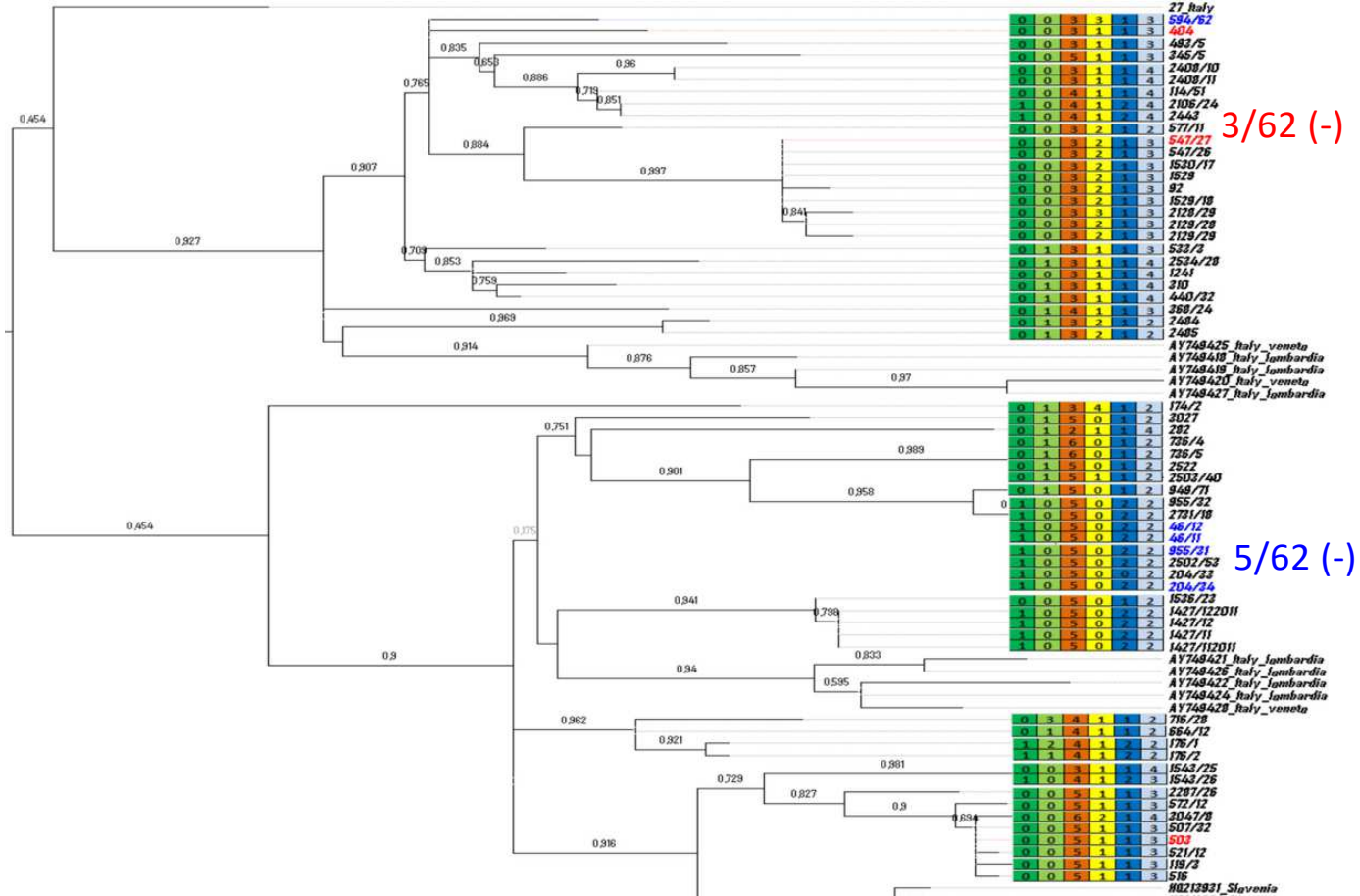
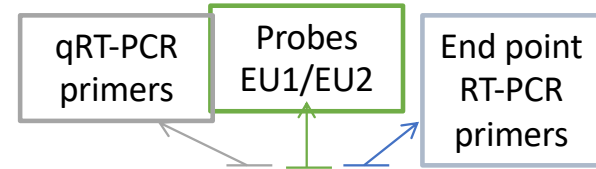
Cosa comportano DUE Clade?



Differente dinamica di popolazione virale nel tempo per **origine, trend, evoluzione**

Possibili ripercussioni su performances diagnostiche (PCR) – “mismatches”

Clade A



3/62 (-)

5/62 (-)

Possibili ripercussioni su performances diagnostiche (PCR) – “mismatches”

Differences in performance of commercial real-time RT-PCR kits in detection of diverse PRRSV strains

K. Podaorska, K. Szymanek, K. Kus, K. Stepniewska and B. Malek
Department of Swine Diseases, National Veterinary Research Institute, Pulawy, Poland*

- 20 stipiti, differenti diluizioni
- **Type 1, sottotipi 1,2, 3, 4**
- **Type 2, inclusi HP-PRRS**
- 8 Kit commerciali Real-Time PCR

- I kit hanno trovato dal 50 al 95% dei campioni
- **Solo 3 kits (I, VII and VIII) hanno trovato tutti gli stipiti di PRRSV**
- Il kit III non ha trovato nessuno degli stipiti sottotipo 3

QUINDI: molti dei kit disponibili in commercio di real time RT-PCR non sono in grado di rinvenire i sottotipi est europei di PRRSV-1

Sample	Type/subt	Strain	Origin	Notes	Dilution series	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
1				serum, exp. infection, pid 24		1	1	1	1	neg	1	1	1
2	1/1	18794_dks	Denmark	tonsils, exp. infection, pig2/pid 24		1	1	1	1	1	1	1	1
3				tonsils, exp. infection, pig1/pid 24		1	neg	1	1	1	1	1	1
4	1/1	13_19021	Poland	isolate		1	1	1	1	1	1	1/2	1
5	1/1	13_18230	Poland	isolate		1	1	1	1	1	1	1/2	1
6	1/1	13_20607	Poland	field sample, lungs		1	1	1	1	1	1	1/2	1
7	1/1-2 ^a	13_00779	Belarus	isolate		1	1	1	1	1	1	1	1
8	1/1-2 ^a	13_00999	Belarus	isolate		1	1	1	1	neg	1	1	1
9					N ^b	1	neg	neg	1	1	1	1	1
10	1/2	13_05301	Belarus	isolate	10-1	1	neg	neg	1	1	1	1	1
11					10-2	1	neg	neg	1	neg	1	1	neg
12					10-3	1	neg	neg	neg	neg	1	1	neg
13	1/2	Bor	Belarus	lungs, exp. infection, pid 17		1	neg	1	neg	neg	1	1	1
14	1/2	Bor	Belarus	tonsils, exp. infection, pid 22		1	neg	1	1	1	1	1	1
15	1/2	Ili	Russia	serum, exp. infection, 17 dpi		1	neg	neg	neg	neg	neg	1	neg
16	1/2	Ili	Russia	tonsils exp. infection, pid 17		1	neg	1	neg	neg	1	1	1
17	1/2	Ili	Russia	tonsils, exp. infection, pid 23		1	1	1	neg	1	1	1	1
18	1/2	Ili	Russia	tonsils, exp. infection, pid 23		1	1	1	neg	1	1	1	1
19					N ^b	1	neg	neg	1	1	1	1	1
20	1/3	13_04929	Belarus	isolate	10-1	1	neg	neg	1	1	1	1	1
21					10-2	1	neg	neg	1	1	1/2	1	1
22					10-3	1	neg	neg	1	neg	1	2	1
23	1/3	13_05300	Belarus	isolate		1	neg	neg	1	1	1	1	1
24	1/3	12_13468	Belarus	field sample, ungs		1	neg	neg	1	1	neg	1	1
25	1/3	12_14991	Belarus	field sample, lungs		1	1	neg	1	1	1	1	1
26	1/3	12_09513	Belarus	field sample, lungs		1	1	neg	1	1	1	1	1
27					N ^b	1	1	1	1	1	neg	1	1
28	1/4?	13_00527	Belarus	isolate	10-1	1	1	1	1	1	neg	1	1
29	Atypical				10-2	1	neg	1	1	neg	neg	neg	neg
30					10-3	1	neg	neg	1	neg	neg	neg	neg
31	1/4	12_14989	Belarus	field sample, lungs		1	1	neg	1	1	1	1	1
32	2	11_15274	Poland	field sample, serum		2	2	2	neg	2	2	1/2	2
33	2	13_11363	Poland	field sample, lungs		2	2	2	2	2	2	1/2	2
34	2	13_12625	Ukraine	field sample, lungs		2	2	2	2	2	2	1	2
35					10-4	2	2	2	2/HP	2	2	2	2
36					10-5	2	2	2	2/HP	2	2	neg	2
37					10-6	2	2	2	2	neg	2	2	2
38	2HP	Wie 13_1390	Vietnam	isolate, high pathogenic strain	10-7	2	neg	2	neg	neg	2	2	neg
39					10-8	neg	neg	neg	neg	neg	neg	2	neg
40					10-9	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg	neg
Samples pos						38	20	23	30	25	31	36	32
% of pos samples						95	50	57.5	75	62.5	77.5	90	80
No. of strains not detected						-	5	7	2	1	2	-	-

[PRRS Symposium, Gent 2015]

Evoluzione (variabilità) PRRSV e diagnostica:

1. Non esiste una PCR che vada bene per tutti i sottotipi e alcuni metodi risentono anche dell'influenza del Clade!
Quindi in situazioni particolari, accoppiare più test!
2. Diagnostica biomolecolare va continuamente saggiata e aggiornata!
(**ring test** e confronto *in silico* con **sequenze**).
3. Necessità di sequenziare di più, (anche porzioni diverse da **ORF5 e ORF7**), ma soprattutto condividendo le informazioni!

**Possibili ripercussioni
sul rapporto virus-ospite**

**Le caratteristiche genetiche di uno stipite
determinano la sua patogenicità?**

Apparentemente Sl...

Karniychuk et al. BMC Veterinary Research 2010, 6:30
http://www.biomedcentral.com/1746-6148/6/30



Veterinary Microbiology 163 (2013) 13–22

RESEARCH ARTICLE

Open Access

Pathogenesis and antigenic characterization of a new East European subtype 3 porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolate

Increased pathogenicity of European porcine reproductive and respiratory syndrome virus is associated with enhanced adaptive responses and viral clearance

S.B. Morgan^{a,b}, S.P. Graham^a, F.J. Salguero^c, P.J. Sánchez Cordon^{a,d}, H. Mokhtar^a, J.M.J. Rebel^c, E. Weesendorp^e, K.B. Bodman-Smith^b, F. Steinbach^a, J.P. Frossard^{a,*}

Uladzimir U Karniychuk¹, Marc Geldhof¹, Merlijn Vanhee¹, Jan Van Doorselaere², Tamara A Saveleva³ and Hans J Nauwynck^{*1}

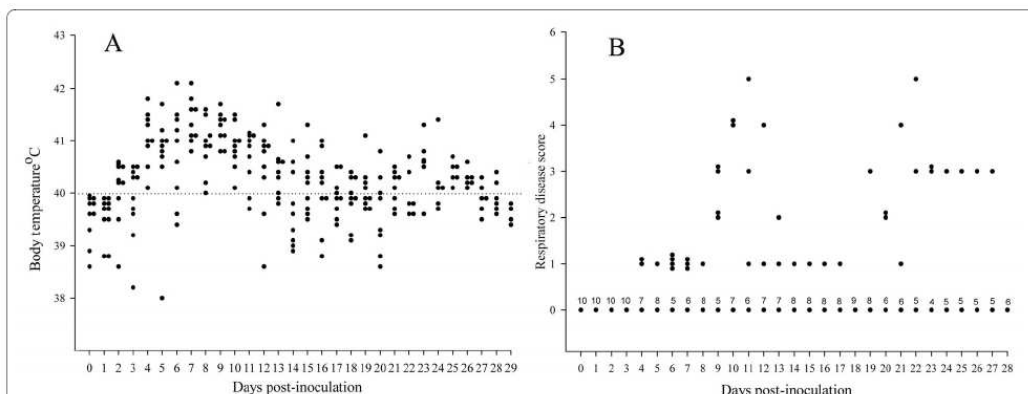


Figure 1 Body temperature and respiratory disease scores in pigs inoculated with PRRSV (Lena). (A) Body temperature of pigs at different time points post-inoculation with PRRSV Lena. Temperature >40°C was considered as fever (dotted line). (B) The respiratory disease scores ranged from 0 to 6: 0 = normal; 1 = mild dyspnea and/or tachypnea when stressed; 2 = mild dyspnea and/or tachypnea at rest; 3 = moderate dyspnea and/or tachypnea when stressed; 4 = moderate dyspnea and/or tachypnea at rest; 5 = severe dyspnea and/or tachypnea when stressed; 6 = severe dyspnea and/or tachypnea at rest. Stress was induced by holding the pig for 45 sec. The numbers above the dots represent the number of animals.

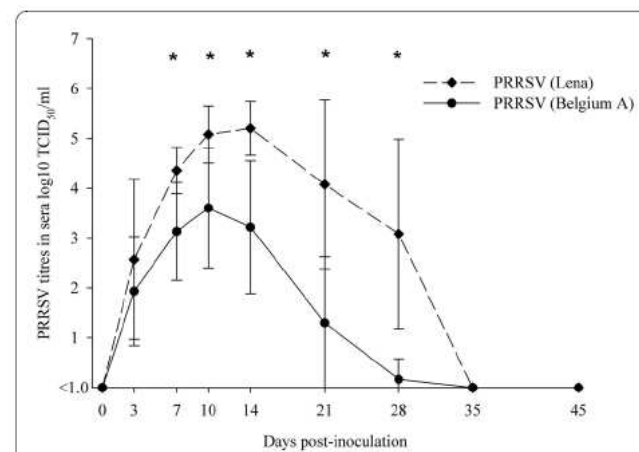
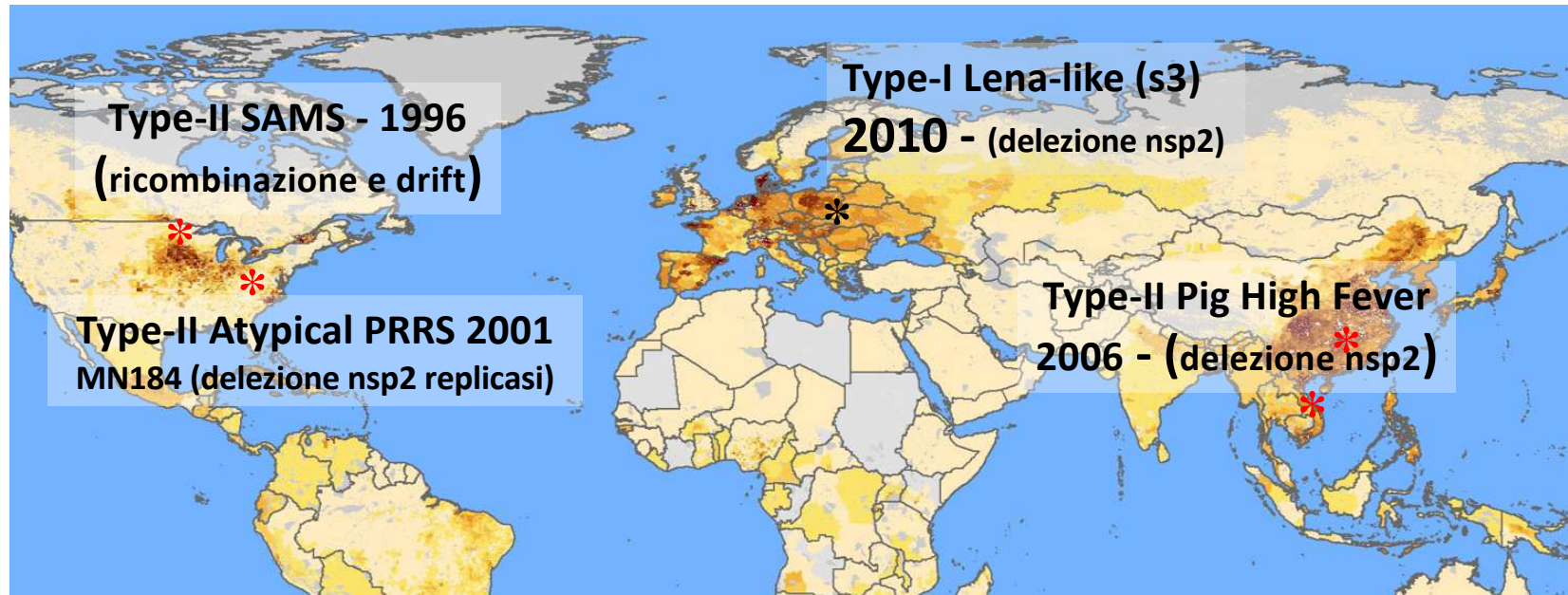


Figure 2 Virus titres in sera of pigs at different days post-inoculation with PRRSV (Lena) and PRRSV (Belgium A). Symbols represent mean titres, whiskers above and below are standard deviations. Titres lower than $10^{1.0}$ TCID₅₀/ml were considered to be negative. *The difference is significant between virus titres.

Stipite Lena (subtype-3)

Comparsa di stipiti di diverso comportamento patogenetico



Research in Veterinary Science
Volume 95, Issue 1, August 2013, Pages 1-7



Non-structural protein 2 of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus: A crucial protein in viral pathogenesis, immunity and diagnosis

Feng-Xue Wang ^a, Ni Song ^a, Li-Zhi Chen ^a, Shi-Peng Cheng ^a, Hua Wu ^{b, c, d}, Yong-Jun Wen ^{a, e}

Journal of General Virology (2010), 91, 1047–1057

DOI 10.1099/vir.0016212-0

Immunodominant epitopes in nsp2 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus are dispensable for replication, but play an important role in modulation of the host immune response

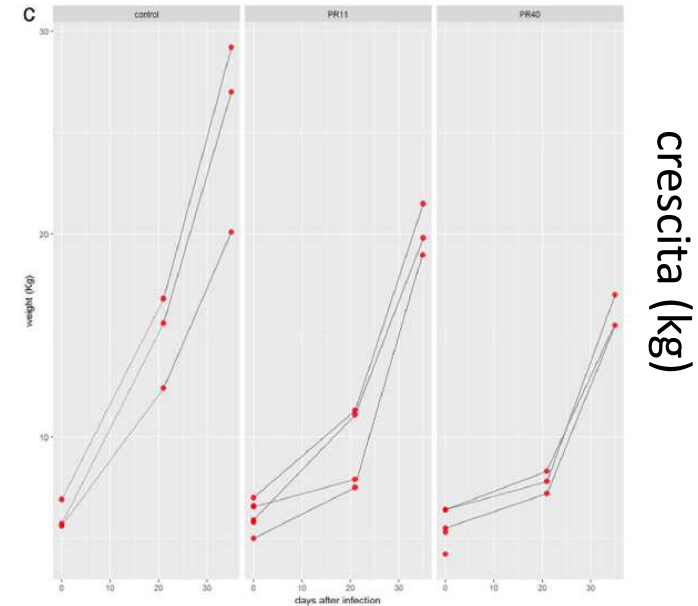
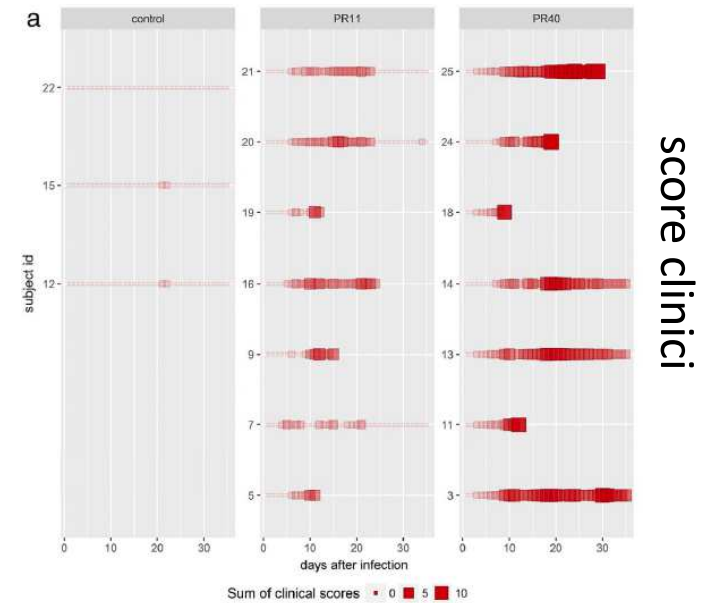
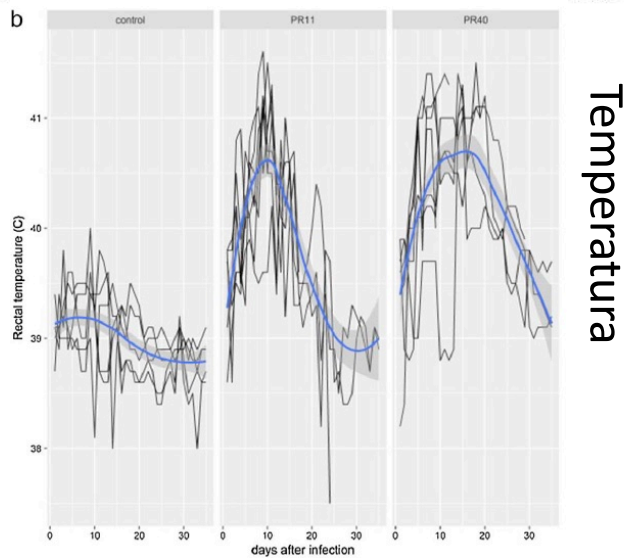
Zhenhai Chen,^{1†} Xiaoxin Zhou,^{1†} Joan K. Lunney,² Steven Lawson,¹ Zhi Sun,¹ Elizabeth Brown,¹ Jane Christopher-Hennings,¹ David Knudsen,¹ Eric Nelson¹ and Ying Fang¹

Phenotypic characterization of a highly pathogenic Italian porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) type 1 subtype 1 isolate in experimentally infected pigs

Elena Canelli^{a,*}, Alessia Catella^a, Paolo Borghetti^a, Luca Ferrari^a, Giulia Ogno^a, Elena De Angelis^a, Attilio Corradi^a, Benedetta Passeri^a, Valeria Bertani^a, Giampietro Sandri^b, Paolo Bonilauri^c, Frederick C. Leung^{d,e}, Stefano Guazzetti^f, Paolo Martelli^a

A B S T R A C T

Highly pathogenic (HP) isolates of the PRRS virus started emerging in North America and Asia in the late 1990s. More recently, they have emerged in Europe. These isolates are characterized by high viral loads, severe general clinical signs and high mortality, in sows, weaners and growers. Their genome shows a discontinuous aminoacids deletion in the non-structural protein 2 (NSP2). The present study was aimed at characterizing the clinical, pathological and immunological features of a highly pathogenetic, Italian PRRSV-1 subtype 1 isolate (PRRSV1_PR40/2014), following experimental infection in conventional 4-weeks-old pigs. The PRRSV1_PR40/2014 infected group showed severe clinical signs (high fever and dispnoea). Pathological lesions, including severe lymphocytopenia in bronchial lymph-nodes and thymus were also recorded. Higher serum PRRSV genome copies and lower virus neutralizing antibody titer were observed in the PR40 group, when compared to the group infected with a conventional PRRSV strain. The genetic analysis of the strain, and the phenotypic features observed in the field and reproduced in the experimental study, confirmed the high pathogenicity of the Italian PRRSV-1 subtype 1 PR40 isolate.



**Le caratteristiche genetiche di uno
stipite determinano la sua patogenicità?**

**La risposta è SI,
ma non sappiamo esattamente dove guardare!**

**Non sono stati ancora identificati
i Marker di Virulenza!**

...e poi PRRSV non agisce da solo...

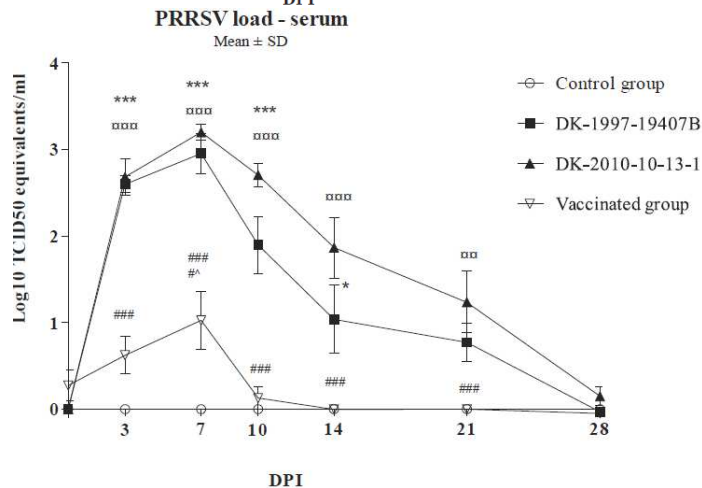
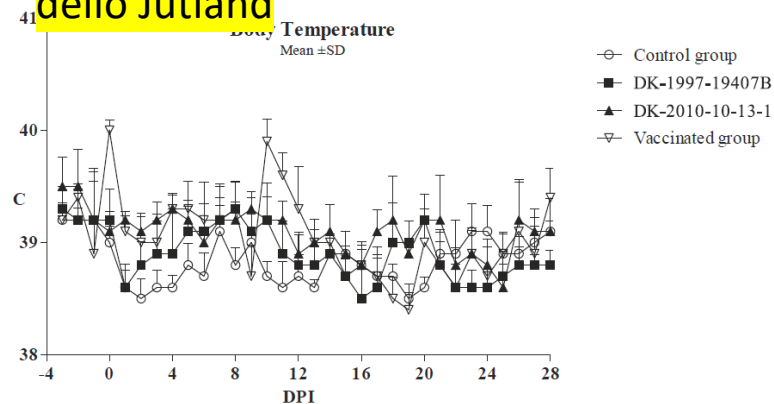
Genetic and biological characterization of a Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 2 (PRRSV-2) causing significant clinical disease in the field

L.K. Kvisgaard^{a,*}, L.E. Larsen^a, C.K. Hjulsager^a, A. Bøtner^b, P.H. Rathkjen^c, P.M.H. Heegaard^a, N.P. Bisgaard^d, J. Nielsen^{b,1}, M.S. Hansen^a

- Novembre 2010 un caso di PRRS molto grave (severe) avvenuto in ciclo chiuso dello Jutland (DK)
- **Mortalità pre-svezzamento fino al 50%**
- **Fino al 70% di feti mummificati**
- Campioni sono risultati positivi per PRRSV-2, e negativi per PCV2, PPV, leptospira
- Le **perdite totali** per la durata dell'episodio di **15 settimane sono state del 30%**
- Le perdite medie in sala parto del 9.3%
- **E' entrato un nuovo stipite altamente patogeno in Danimarca??**

ma nell'infezione sperimentale...

- Suinetti di 4 settimane negativi da patogeni specifici (Mhyo, PRRSV, App 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10)
- Vaccinazione con Ingelvac PRRS MLV e challenge con l'isolato dal caso clinico dello Jutland



Lo stipte di PRRSV-2 isolato dal caso clinico era molto simile agli altri stipti danesi

“Ingelvac PRRS MLV related”

Lo stipte di PRRSV-2 isolato dal caso clinico ha fallito nell'indurre segni clinici, lesioni patologiche e alti livelli di viremia

La gravità clinica in campo deve essere stata causata da altri fattori rispetto o in aggiunta a PRRSV
I segni clinici in campo, non sono sempre affidabili indicatori della virulenza di PRRSV!

riassumendo fin qui...

Variabilità genetica di PRRSV cosa comporta?

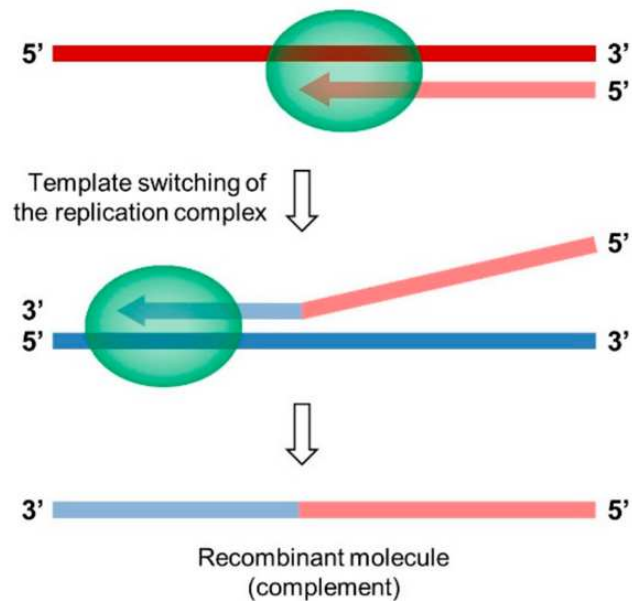
- possibili difficoltà diagnostiche
- differenti interazioni virus-ospite
- differenti andamenti epidemiologici nel tempo per selezione di stipti virali di maggior successo riproduttivo (evoluzione)

e il ruolo della ricombinazione?

...sicuramente non è un ruolo passivo...

1) la ricombinazione cos'è?

scambio di materiale genetico tra virus diversi nel momento in cui riescono ad infettare contemporaneamente la stessa cellula (coinfezione) –
Template switching (che avviene in fase replicativa)



**si hanno due «genitori»
in realtà un parente maggiore e uno minore**

2) la ricombinazione avviene casualmente? ed è un successo biologico?

è un fenomeno stocastico (probabilistico)
che può essere **facilitato quando:**



- a) esistono popolazioni virali caratterizzate da **variabilità genetica** come PRRSV (1/10000 tasso di mutazione)
- b) si ha **coinfezione cellulare**, quindi la presenza di due popolazioni virali genitrici bilanciate e abbondanti
- c) più facile tra «simili nella diversità» (PRRSV1 e PRRSV2 mai dimostrata!)
- d) favorita da **animali viremici** per lunghi periodi
- e) deve produrre una **progenie** (generazione) **trasmissibile** e non deve essere rimpiazzata da altre popolazioni virali (***fitness virale per il successo riproduttivo***)

Studio a livello GLOBALE...

Virus Research 194 (2014) 159–166

Observation of high recombination occurrence of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus in field condition



Giovanni Franzo^a, Mattia Cecchinato^a, Marco Martini^a, Letizia Ceglie^b, Alessandra Gigli^b, Michele Drigo^{a,*}

^a Department of Animal Medicine, Production and Health (MAPS), Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD), Italy

^b Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy

ARTICLE INFO

Article history:
Available online 21 August 2014

Keywords:
PRRSV
Italy
Recombination
ORF5
ORF7

ABSTRACT

Recombination in Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) is a well-documented phenomenon. A high recombination frequency has been reported in experimental conditions both *in vitro* and *in vivo*, and its role in driving viral evolution has been postulated by several authors. However field evidences are rare, mainly obtained from large-scale sampling and typically represented by single sequences rather than by groups of circulating “recombinant progenies”. The present work was aimed to investigate the gray area between experimental studies and large-scale epidemiological investigations. The study was performed on ORF5, ORF7 and concatenated sequences obtained in our laboratory or available in GenBank collected between 2009 and 2012 in northern Italy. Six independent recombinant strains out of 66 concatenated sequences (~9%) were found, demonstrating a high recombination frequency respect to previous field studies but comparable to *in vitro* experiments. *In silico* analysis let speculate that this new strain displayed physicochemical features diverse enough to potentially alter its immunological properties. Taken altogether, the results of our study support previous experimental evidences that depict PRRSV to be extremely prone to recombination. The limited temporal and geographical spread of recombinant strains however states in favor of a limited fitness of the recombinant progeny compared to parental strains and the marginal role of this phenomenon in PRRSV evolution.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

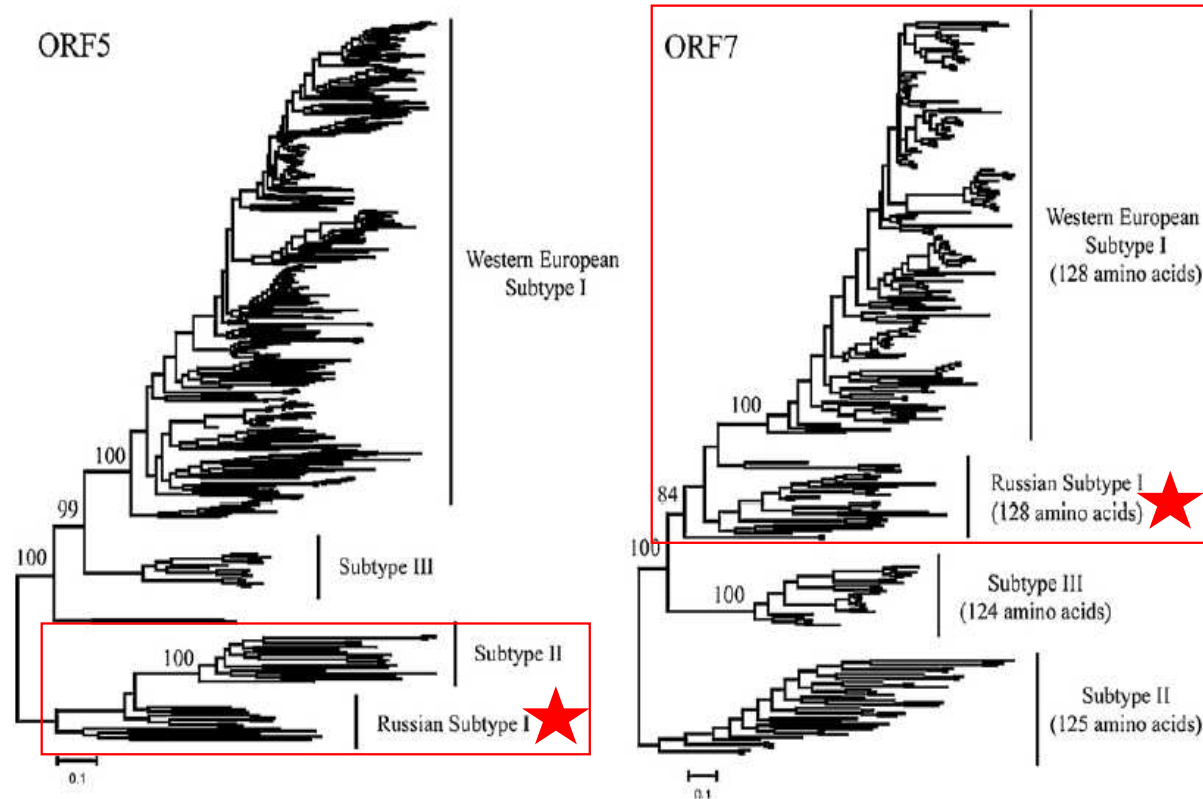
CONSIDERAZIONI:

- 1) Intensità di campionamento?
- 2) ORF5/ORF7

“6 delle 66 sequenze concatenate (ORF5+ORF7) erano ricombinanti” ≈ 10%

“La limitata diffusione spazio-temporale degli stipiti ricombinanti depone a favore di una limitata fitness dei ricombinanti rispetto agli stipiti parentali e quindi anche di un ruolo epidemiologico marginale di questo fenomeno”

M. Shi et al. / Virus Research 154 (2010) 7-17



Ma la ricombinazione avviene solo tra ORF5 e ORF7?

Ma la ricombinazione avviene solo tra ORF5 e ORF7?

RESEARCH ARTICLE

Molecular characterization of type 1 porcine reproductive and respiratory syndrome viruses (PRRSV) isolated in the Netherlands from 2014 to 2016

J. C. F. M. Dortmans*, G. J. Buter, R. Dijkman, M. Houben, T. F. Duinhof

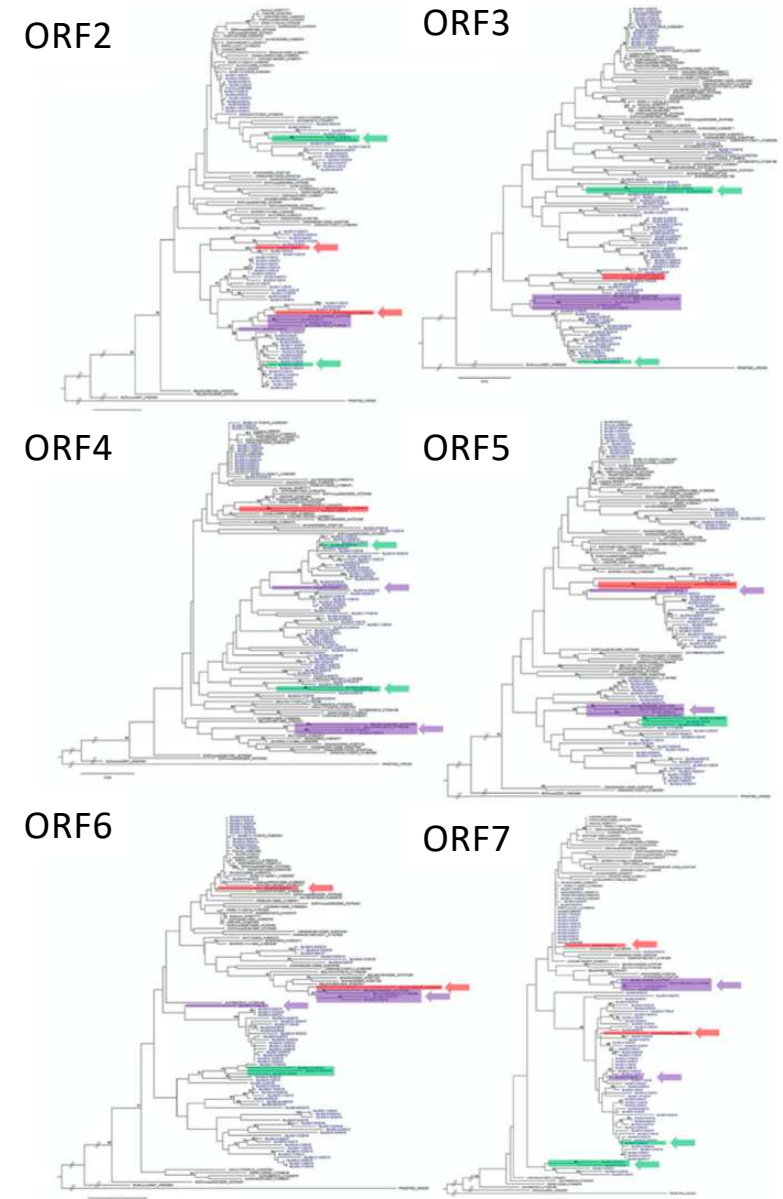
GD Animal Health, Deventer, The Netherlands

* j.dortmans@gdanimalhealth.com

Abstract

Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) is the causative agent of a devastating pig disease present all over the world. The remarkable genetic variation of PRRSV, makes epidemiological and molecular analysis of circulating viruses highly important to review current diagnostic tools and vaccine efficacy. Monitoring PRRS viruses supports modern herd management by explaining the source of found viruses, either internally or externally from the herd. No epidemiological or molecular study has been published on circulating PRRS-viruses in the Netherlands, since the early nineties. Therefore, the objective of this study is to investigate circulating PRRS-viruses in the Netherlands in 2014, 2015 and 2016 on a molecular level by sequencing ORF2, ORF3, ORF4, ORF5, ORF6 and ORF7. The results demonstrate that the 74 PRRSV strains belong to PRRSV-1, but the diversity among strains is high, based on nucleotide identity, individual ORF length and phylogenetic trees of individual ORFs. Furthermore, the data presented here show that the phylogenetic topology of some viruses is ORF dependent and suggests recombination. The identity of the strain of interest might be misinterpreted and wrong conclusions may be drawn in a diagnostic and epidemiological perspective, when only ORF5 is analyzed, as performed in many routine sequencing procedures.

IN REALTA' la ricombinazione può coinvolgere differenti parti (ORFs) del genoma di PRRSV!



QUINDI, la ricombinazione è un fenomeno naturale che connota l'evoluzione virale di virus come PRRSV [(+) ssRNA], di tipo probabilistico, **condizionato da più fattori, alcuni influenzati esternamente all'ospite**

Fattori di **possibile MANAGEMENT**

- 1) coinfezione di stipti/varianti
- 2) la replicazione delle varianti a livello significativo

Fattori di **NON** possibile **CONTROLLO**

- 3) produzione di progenie virale di successo per replicazione e trasmissione
- 4) progenie deve avere forza evolutiva (*fitness*) ovvero non essere soppiantata da altre varianti

conseguenze della ricombinazione: nessuna, successo, insuccesso



**epidemiologicamente
dipendenti**



**biologicamente
dipendenti**

gli stipiti vaccinali ricombinano?

**E' POSSIBILE!
con stipiti virali WILD
(di campo)**

> *Transbound Emerg Dis.* 2018 Aug;65(4):1078-1086. doi: 10.1111/tbed.12852. Epub 2018 Mar 8.

A natural recombinant PRRSV between HP-PRRSV JXA1-like and NADC30-like strains

H-M Wang¹, Y-G Liu¹, Y-D Tang¹, T-X Liu¹, L-L Zheng¹, T-Y Wang¹, S-G Liu¹, G Wang¹,
X-H Cai¹

Article DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2512.191111>

**Recombination between Vaccine and Field
Strains of Porcine Reproductive and
Respiratory Syndrome Virus**

gli stipiti vaccinali ricombinano?



AMERICAN
SOCIETY FOR
MICROBIOLOGY

genomeAnnouncements™

Complete Genome Sequence of a Recombinant Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus Strain from Two Genotype 1 Modified Live Virus Vaccine Strains

Patricia Renson,^{a,d,f} Fabrice Touzain,^{c,d} Arnaud Le Bret,^g Mireille Le Dimna,^{a,d} Hélène Quenault,^{c,d} Valérie Normand,^g Jean-Baptiste Claude,^e Floriane Pez,^e Nicolas Rose,^{b,d} Yannick Blanchard,^{c,d} Olivier Bourry^{a,d}

E' POSSIBILE! anche tra stipiti vaccinali

(primo esempio)

- Allevamento francese che stava seguendo un programma di stabilizzazione, prima usando **VaccinoA** e poi con **VaccinoB**
- Alla fine del 2013 una banda di 500 suinetti è stata **vaccinata per sbaglio** con entrambi i vaccini a poche settimane di distanza.
- Lo stipite PRRS-FR-2014-56-11-1 fu isolato dal siero di suinetti sani raccolto nel 2014
- **3 eventi di ricombinazione sono stati evidenziati tra VaccinoA (parente maggiore) e il VaccinoB (parente minore) in ORF1**
- **Nessun segno clinico osservato in allevamento!**

gli stipiti vaccinali ricombinano?

> [Transbound Emerg Dis.](#) 2020 Mar 27;67(5):1786-1796. doi: 10.1111/tbed.13555.
Online ahead of print.

A recombination between two Type 1 Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV-1) vaccine strains has caused severe outbreaks in Danish pigs

[Lise Kirstine Kvisgaard](#)¹, [Charlotte Sonne Kristensen](#)², [Pia Ryt-Hansen](#)¹, [Kasper Peder Tomasz Stadejek](#)³, [Ramona Trebbien](#)⁴, [Lars Ole Andresen](#)¹, [Lars Erik Larsen](#)^{1 5}

E' POSSIBILE! anche tra stipiti vaccinali

(secondo esempio)

- **vaccinazione sequenziale** con due diversi MLV
- generazione di un ricombinante
- disseminazione tramite centro verri positizzato (seme)

- **Patologia evidente e aggressiva in soggetti naive riceventi!**

puntualizzando...

Un ricombinante può sparire (bassa *fitness*) o predominare nell'allevamento. Può essere attenuato o maggiormente virulento.

Ad oggi non è possibile prevedere le caratteristiche di un ricombinante basandosi solamente sulla sequenza genica.



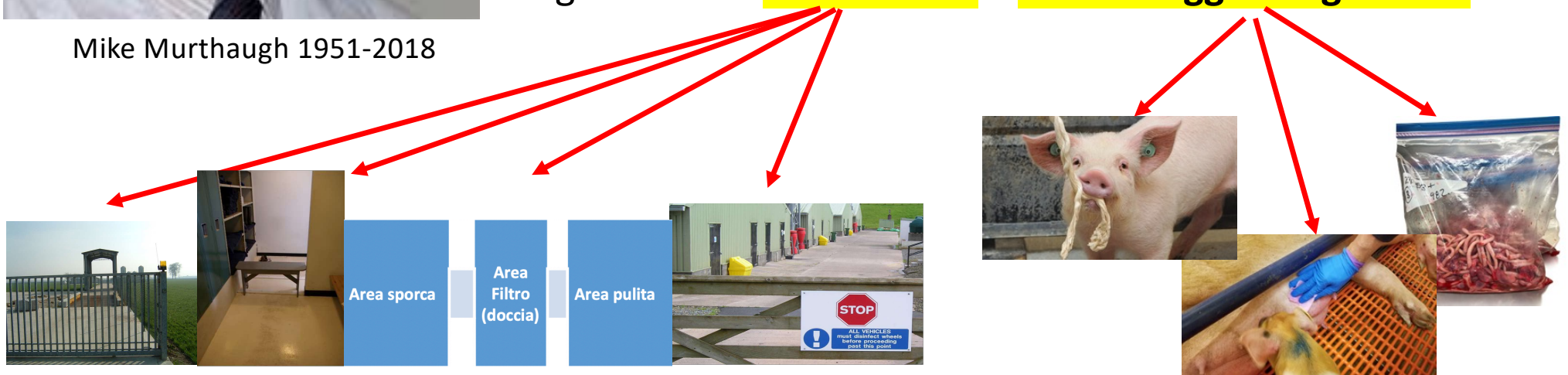
usare o non usare i vaccini?



Mike Murthaugh 1951-2018

«Sebbene non ci siano ancora vaccini perfetti e non siano chiari tutti i meccanismi immunologici di PRRSV sarà l'uso della vaccinazione a livello globale che permetterà il controllo della Sindrome Riproduttiva e Respiratoria del Suino»

Ma il vaccino deve essere considerato uno strumento di management e quindi va usato consapevolmente garantendo **Biosicurezza** e **Monitoraggio diagnostico**



Riduzione della probabilità di coinfezione

1. **NON vaccinare animali viremici** (emergenza?) = controllare regolarmente svezzati e scrofette
2. NON usare differenti vaccini (MLV) contemporaneamente = **vaccinazione uno-alla-volta!**
3. NON usare differenti vaccini (MLV) uno subito dopo l'altro = **rispettare un periodo di pulizia/raffreddamento vaccinale** (almeno 5 settimane)
4. Aumentare biosicurezza sptt. per ridurre le introduzioni laterali = **quarantena e trasporti sono l'HOT ISSUE**

Riduzione della replicazione virale

1. NON vaccinare in allevamenti indenni!
2. In aziende positive, **tenere un solido e costante piano vaccinale delle scrofe** (se infette riduce la viremia e aumenta MDA (immunità passiva))
3. Controllare **l'effetto di MDA** se si implementa la vaccinazione dei suinetti
4. **Controllare regolarmente la dinamica di circolazione virale**

AT home message

- a. **PRRSV** è causa tuttora di gravi danni economici e nella sua storia **ha dimostrato un potenziale evolutivo** molto forte
- b. **Non conosciamo** ancora tutte le relazioni tra variabilità genetica e meccanismo patogenetico (**marker di malattia**)
- c. La variabilità genetica di PRRSV impone il **continuo aggiornamento degli strumenti diagnostici biomolecolari**
- d. La **ricombinazione di PRRSV** è un **fenomeno naturale** e può coinvolgere anche gli **stipiti vaccinali**; **NON** è attualmente **possibile prevedere le caratteristiche di un ricombinante basandosi solo sulla sequenza genetica**
- e. **Necessario sequenziare regolarmente** (e più tratti genomici), soprattutto quando si vaccinano grandi popolazioni (suinetti)
- f. **Controllare la scomparsa di uno stipite vaccinale** quando si vuole cambiare prodotto
- g. **Sequenziare l'intero genoma se compaiono focolai di PRRS in aziende vaccinate**

THE END...

