

UTILIZZO DELL'ANALISI FILOGENETICA DEL GENE ORF5 PER IL MONITORAGGIO DI FILIERA DI CEPPI DI PRRSV-1

USTULIN M.¹, TARGHETTA C.¹, FERINO L.¹, ZANON C.¹, ROLLA U.², VIO D.¹

¹ *Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Sezione Territoriale di Pordenone, Cordenons (PN)*

² *Martini S.p.A, via Emilia 261, Budrio di Longiano (FC)*

Parole chiave: PRRS, ORF5, sequenziamento

Keywords: PRRS, ORF5, sequencing

RIASSUNTO

L'analisi delle sequenze dei geni ORF5 e/o ORF7 del virus della PRRS è ormai diventata un'attività routinaria per la sorveglianza epidemiologica dei ceppi circolanti all'interno di un allevamento o di una filiera.

L'elevata disponibilità di sequenze del gene ORF5 depositate in database pubblici, permette il confronto con ceppi di varie provenienze geografiche e di valutare l'evoluzione dei ceppi circolanti in un'ottica internazionale.

Nel presente studio vengono presentati i risultati dell'analisi delle sequenze dei geni ORF5 di PRRS raccolti nel corso di 6 anni nell'ambito della attività di sorveglianza epidemiologica della PRRS in una filiera integrata.

ABSTRACT

Sequencing and analysis of ORF5 and/or ORF7 genes of PRRS virus has become common for epidemiologic surveillance of PRRSV strains circulating among farms.

In recent years, the availability of ORF5 genes published in public database, allows extensive comparison among strains of different geographical origins, and therefore to evaluate viral evolution on an international bases.

Results of the phylogenetic analysis of ORF5 sequences collected during a period of 6 years of PRRS monitoring in a multisite company are described in this study.

INTRODUZIONE

La Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino rappresenta (PRRS), a oggi, una delle patologie a maggior impatto economico nell'allevamento del suino.

La malattia determina, nelle scrofe gravide, la perdita del prodotto del concepimento (aborti, natimortalità, parti prematuri) e, nei soggetti in accrescimento, forme respiratorie, ritardi nella crescita a aumento della mortalità.

Pur essendo disponibili diversi vaccini commerciali, l'elevata variabilità genotipica e fenotipica del virus rendono difficoltosa la gestione della PRRS, rendendo essenziale l'applicazione di adeguate misure di biosicurezza (Corzo et al. 2010).

La malattia è causata da due specie virali, *Betaarterivirus suid 1* e *Betaarterivirus suid 2*, appartenenti al genere *Betaarterivirus*, famiglia Arteriviridae (<https://talk.ictvonline.org/taxonomy>). I due virus sono storicamente conosciuti rispettivamente come virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino di tipo 1 (PRRSV-1), o ceppo Europeo e virus della Sindrome Respiratoria e Riproduttiva del Suino di tipo 2 (PRRSV-2), o ceppo Americano. In entrambi i casi, si tratta di virus a RNA a singolo filamento a senso positivo (ssRNA(+)), con un genoma di circa 15 kb, che include 10 ORF (Firth et al., 2011). La Glicoproteina 5 (GP5), codificata da ORF5, è una delle più utilizzate per studi di epidemiologia molecolare (Franzo et al., 2015).

L'elevata disponibilità di sequenze del gene ORF5 e l'analisi filogenetica delle stesse, ha permesso di evidenziare una notevole variabilità elevata all'interno del PRRSV-1. Attualmente sono riconosciuti quattro Sottotipi (Stadejek et al., 2002, 2006, 2008), il Sottotipo 1, a cui appartiene il ceppo prototipo del PRRSV-1 (ceppo Lelystad), circola in Europa Occidentale mentre in Europa Orientale (ex blocco Sovietico) dominano i Sottotipi 2, 3 e 4 con rari riscontri del Sottotipo 1 (Stadejek et al., 2013).

I dati filogenetici riguardanti il Sottotipo 1 mostrano inoltre una suddivisione in *clades* correlati alla provenienza geografica dei ceppi (Shi et al. 2010), ovvero con ceppi originari dello stesso Paese che si raccolgono nello stesso *clade*.

L'analisi filogenetica permette di monitorare la variabilità dei ceppi circolanti in allevamento e di verificare l'eventuale introduzione di nuovi ceppi, permettendo quindi di verificare se un episodio clinico è legato alla ricircolazione di un ceppo già presente in azienda o all'introduzione di un nuovo ceppo.

Nel seguente studio sono state sottoposte ad analisi filogenetica sequenze ORF5 raccolte in corso di attività di monitoraggio di allevamenti appartenenti ad una filiera integrata.

MATERIALI E METODI

Le sequenze incluse nella presente elaborazione derivano dall'attività di monitoraggio dei ceppi di PRRS circolanti all'interno di una filiera integrata.

L'organizzazione degli spostamenti degli animali prevede l'introduzione di scrofette di 30 kg in strutture dove vengono vaccinate per PRRS all'arrivo, con richiamo ogni tre mesi. Le scrofette fecondate vengono poi trasferite alla scrofaia di destinazione per entrare in produzione. I suinetti, al momento dello svezzamento vengono trasferiti a uno o più siti due e successivamente a siti 3 per l'ingrasso.

La filiera include 14 scrofaie, da sette delle quali provengono 68 delle sequenze incluse in questa analisi. Le restanti sequenze provengono da svezzamenti e ingrassi.

Sono stati inclusi nella presente analisi filogenetica 116 sequenze di ORF5 del virus PRRS-1 raccolte nel corso dell'attività di monitoraggio tra il 2017 e il 2022. Sono state inoltre incluse le sequenze depositate delle ORF5 dei ceppi vaccinali e 134 sequenze depositate in Genbank selezionate in modo da essere rappresentative dei diversi Sottotipi di PRRS-1 e di varie aree geografiche. Sono state incluse solo sequenze complete dell'ORF5. Sono state invece escluse sequenze di scarsa qualità, ad esempio troppo corte o con molte basi degenerate, e sequenze riferibili ai ceppi vaccinali (cut off percentuale di identità = 97%).

La sequenza ORF5 del ceppo prototipo di PRRSV-2, il VR-2332, è stato utilizzato come outgroup.

Le sequenze sono state allineate tramite MAFFT. L'albero filogenetico è stato elaborato con il metodo della massima verosimiglianza utilizzando il programma IQ-TREE versione 1.6.12. La visualizzazione dell'albero è stata eseguita con il programma FigTree v1.4.4.

RISULTATI

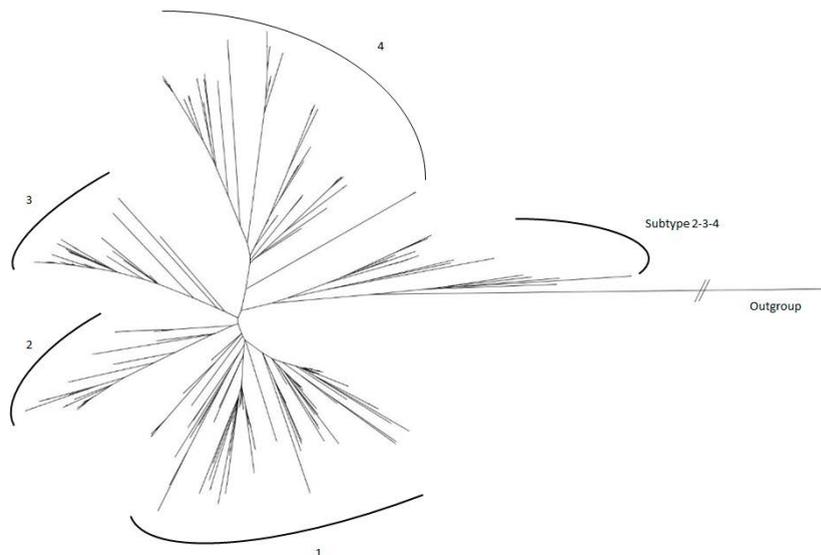


Fig.1: Albero filogenetico

Fig.1: Phylogenetic tree

L'albero filogenetico così ottenuto (Fig. 1) permette di evidenziare che le sequenze incluse nell'analisi si distribuiscono tra 4 distinti cluster, tutti appartenenti al Sottotipo 1, l'unico circolante in Europa Occidentale (Balka et al., 2018).

Tre sequenze di 2 diverse provenienze clusterizzano con i ceppi vaccinali e il ceppo Lelystad, considerato il ceppo prototipo del PRRSV-1 e a sequenze prevalentemente di provenienza Europea depositate in Genbank tra il 1994 e il 2016.

Le restanti sequenze si suddividono in tre cluster, raggruppandosi assieme a sequenze, prevalentemente di provenienza italiana, ricavate dalle banche dati.

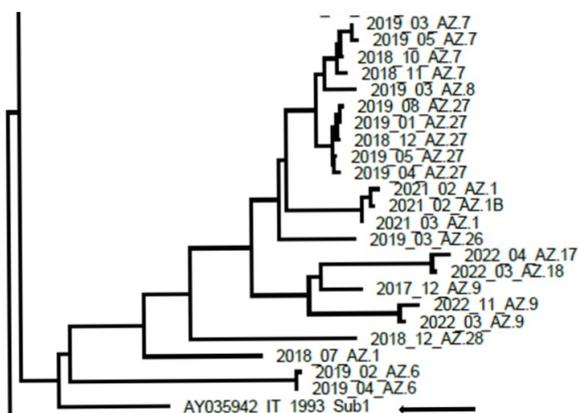


Fig 2: Cluster 2

Scendendo maggiormente nei dettagli, nel cluster 2, assieme a 23 delle sequenze in analisi, è presente una sequenza di provenienza italiana (indicata da una freccia, figura 2).

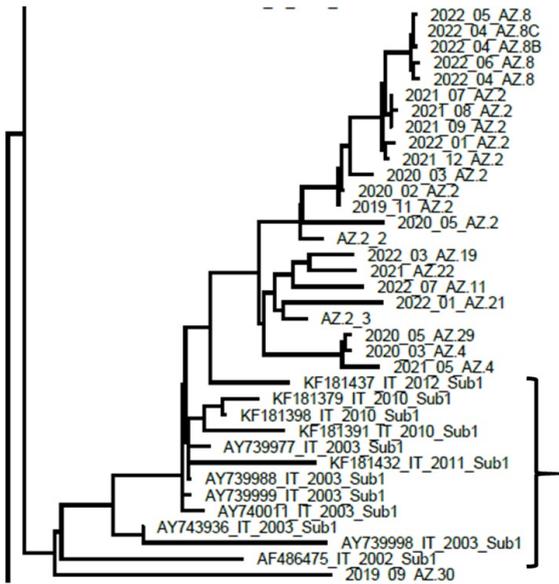


Fig 3. Cluster 3

Nel cluster 3, assieme a 24 delle sequenze in analisi, sono presenti 12 sequenze depositate in GeneBank, provenienti dall'Italia tra il 2002 e il 2012 (indicate dalla grappa in figura 3).



Fig. 4 Cluster 4

Nel cluster 4, assieme a 64 delle sequenze in analisi, sono presenti 8 sequenze depositate in GeneBank, provenienti dall'Italia tra il 2002 e il 2012 (indicate dalla graffa in figura 4).

DISCUSSIONE

L'analisi delle sequenze ha permesso di evidenziare, in linea generale, una buona suddivisione in diversi sotto-cluster dei ceppi circolanti nelle differenti scrofaie; tuttavia, in alcuni casi si osservano, nel corso degli anni, occasionali incursioni di ceppi che mostrano elevata similarità con quelli circolanti in altri allevamenti della filiera.

Queste osservazioni sono importanti ai fini di indirizzare verso indagini retrospettive che permettano di evidenziare eventuali punti critici della biosicurezza (es. personale, attrezzature) e quindi possibili fattori di rischio su cui intervenire.

È interessante osservare che la maggior parte dei ceppi analizzati presenta correlazione con ceppi appartenenti a quello che Balka et al. (2018) definiscono *lineage 3* del Sottotipo 1. Balka suggerisce che questa linea di PRRSV-1 sia comparsa in Italia negli anni '90, abbia circolato in Repubblica Ceca (1995), in Polonia (1996), Spagna (2003), Belgio (2006) per poi diffondersi in Europa Orientale e in Asia (Cina, 2011). Tuttavia, dopo il 2006, l'unico Paese dell'Europa Occidentale hanno continuato a circolare ceppi di PRRS appartenenti a questo *lineage* è l'Italia. I risultati di questo studio confermano quanto evidenziato da Balka mostrando una netta preponderanza del *lineage 3*.

La maggior parte delle sequenze raccolte si raggruppano quindi nel cluster numero 4 (fig.4). È interessante però il caso della scrofaia n. 2 dove vi è evidenza di co-circolazione di ceppi appartenenti al cluster 3 e 4, e della scrofaia 1 caratterizzata da un'occasionale rilevazione di ceppi appartenenti al cluster 2, oltre a quelli relativi al cluster 4. Questo suggerisce che, in entrambi gli allevamenti, si siano verificate più introduzioni di ceppi di PRRS nel tempo, e che tali ceppi tendono ad essere presenti contemporaneamente nella scrofaia 2, e con discontinuità nella scrofaia 1, dove il ceppo appartenente al cluster 2 sembra non circolare più.

La presenza, all'interno di uno svezzamento, di due sequenze che, pur presentando una similarità inferiore al 97% con i ceppi vaccinali, si localizzano in un cluster che comprende i ceppi vaccinali e il ceppo Lelystad indica, anche in Italia, un'occasionale circolazione di ceppi con caratteristiche simili al ceppo prototipo.

CONCLUSIONI

L'analisi filogenetica, associata a dati geografici e a informazioni relative alle movimentazioni degli animali, rappresenta un importante strumento epidemiologico per monitorare la variabilità e studiare l'evoluzione dei ceppi virali circolanti in un'azienda, una filiera o un'area geografica. Questi dati oltre ad avere valenza epidemiologica, hanno un'utilità pratica andando ad evidenziare eventuali criticità della biosicurezza, che qualora correttamente identificate, permettono l'adozione di misure correttive.

È importante tenere in considerazione che queste elaborazioni si basano su stime e informazioni incomplete, non vi è infatti, nella pratica, possibilità di identificare ogni singola variazione del o dei ceppi virali circolanti, considerato l'elevato tasso di mutazione del virus. Si sottolinea inoltre il limite dell'utilizzo della sola ORF5 ai fini dell'analisi filogenetica, in quanto essa rappresenta solo una piccola porzione del genoma di PRRSV-1. La disponibilità, in futuro, di un protocollo NGS ottimizzato e standardizzato potrà consentire di ottenere ed analizzare la sequenza completa del genoma di PRRS-1 e permetterà di costruire alberi filogenetici molto più affidabili e informativi.

BIBLIOGRAFIA

1. Balka G, Podgórska K, Brar MS, Bálint Á, Cadar D, Celer V, Dénes L, Dirbakova Z, Jedryczko A, Márton L, Novosel D, Petrović T, Sirakov I, Szalay D, Toplak I, Leung FC, Stadejek T. Genetic diversity of PRRSV 1 in Central Eastern Europe in 1994-2014: origin and evolution of the virus in the region. *Sci Rep.* 2018 May 17;8(1):7811. doi: 10.1038/s41598-018-26036-w. PMID: 29773820; PMCID: PMC5958080.
2. Corzo, C.A.; Mondaca, E.; Wayne, S.; Torremorell, M.; Dee, S.; Davies, P.; Morrison, R.B. Control and Elimination of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus. *Virus Res.* 2010, 154, 185–192.
3. Firth, A. E. et al. Discovery of a small arterivirus gene that overlaps the GP5 coding sequence and is important for virus production. *J. Gen. Virol.* 92, 1097–1106 (2011).
4. Franzo, G.; Dotto, G.; Cecchinato, M.; Pasotto, D.; Martini, M.; Drigo, M.; Franzo, G. Phylodynamic Analysis of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV) in Italy: Action of Selective Pressures and Interactions between Different Clades. *Infect. Genet. Evol.* 2015, 31, 149–157.
5. Minh B.Q., Schmidt H.A., Chernomor O., Schrempf D., Woodhams M.D., von Haeseler A., Lanfear R. (2020) IQ-TREE 2: New models and efficient methods for phylogenetic inference in the genomic era. *Mol. Biol. Evol.*, 37:1530-1534. <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>
6. Shi, M.; Lam, T.T.Y.; Hon, C.C.; Hui, R.K.H.; Faaberg, K.S.; Wennblom, T.; Murtaugh, M.P.; Stadejek, T.; Leung, F.C.C. Molecular Epidemiology of PRRSV: A Phylogenetic Perspective. *Virus Res.* 2010, 154, 7–17.
7. Stadejek, T., Stankevicius, A., Storgaard, T., Oleksiewicz, M.B., Belak, S., Drew, T.W., Pejsak, Z., 2002. Identification of radically different variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in Eastern Europe: towards a common ancestor for European and American viruses. *J. Gen. Virol.* 83, 1861–1873.
8. Stadejek, T. Porcine reproductive and respiratory syndrome virus strains of exceptional diversity in eastern Europe support the definition of new genetic subtypes. *J. Gen. Virol.* 87, 1835–1841 (2006).
9. Stadejek, T.; Oleksiewicz, M.B.; Scherbakov, A.V.; Timina, A.M.; Krabbe, J.S.; Chabros, K.; Potapchuk, D. Definition of Subtypes in the European Genotype of Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus: Nucleocapsid Characteristics and Geographical Distribution in Europe. *Arch. Virol.* 2008, 153, 1479–1488.
10. Stadejek, T.; Stankevicius, A.; Murtaugh, M.P.; Oleksiewicz, M.B. Molecular Evolution of PRRSV in Europe: Current State of Play. *Vet. Microbiol.* 2013, 165, 21–28.