

STUDIO DEL FENOMENO DELLA RICOMBINAZIONE TRA STIPITI DI PRRSV CIRCOLANTI IN ALLEVAMENTI DEL NORD ITALIA.

STUDY OF PRRSV RECOMBINATION AMONG STRAINS CIRCULATING IN HERDS FROM NORTHERN ITALY

DRIGO M.¹, FRANZO G.¹, CEGLIE L.², GIGLI A.², MARCO MARTINI¹.

¹Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS) – Università degli Studi di Padova;

²Istituto Zooprofilattico delle Venezie (IZSVe), 35020 Legnaro, Italy.

Parole chiave: PRRSV, Italia, ricombinazione, ORF5, ORF7.

Keywords: PRRSV, Italy, recombination ORF5, ORF7.

RIASSUNTO

La ricombinazione tra differenti stipiti del virus della PRRSV è stata riportata sia *in vitro* sia *in vivo*. Ciononostante evidenze di ricombinazione da studi di campo sono rare e principalmente ottenute dalla comparazione di sequenze da campionamenti su larga scala. Questo studio è rivolto ad indagare questo fenomeno su piccola scala usando 162 campioni ottenuti da suini di allevamenti di tre regioni del Nord Italia e raccolti tra il 2009 e il 2012.

L'analisi di ricombinazione è stata condotta su ORF5, ORF7 e loro concatenazione tramite il programma RDP3. È stata eseguita la predizione *in silico* degli epitopi target della GP5 degli stipiti ricombinanti più significativi. La storia filogeografica dei pattern di migrazione degli stipiti di PRRSV, considerando la provincia come livello minimo, è stata ricostruita usando l'approccio bayesiano implementato in BEAST. In totale sono state ottenute le sequenze di 114 ORF5, 84 ORF7 e 50 sequenze concatenate. È stata evidente la predizione di tre eventi di ricombinazione. Due mostravano almeno un *breakpoint* nella regione non sequenziata tra ORF5 e ORF7, il terzo evento comprendeva la regione di ORF5 includendo parte del maggiore epitopo di neutralizzazione. L'identificazione a distanza di tempo degli stessi stipiti ricombinanti nella medesima azienda depone a favore di una loro significativa *fitness*. L'analisi filogeografica ha rivelato alcuni tassi di migrazione adeguatamente supportati da significatività statistica.

ABSTRACT

Recombination of different PRRSV strains has been reported both *in vitro* and *in vivo*. However field evidences of recombination are rare and mainly obtained comparing sequences from large-scale sampling. This work aimed to investigate this phenomenon on a smaller scale using 162 samples originating from three regions of northern Italy, collected during 2009-2012. Recombination analysis was performed using RDP3 on ORF5, ORF7 and their concatenation. GP5 structure, T and B cell epitopes of the most significant recombinant strains were predicted *in silico*. Phylogeographic history of migration patterns of PRRSV strains was inferred using the Bayesian framework implemented in BEAST. A total of 114 ORF5, 84 ORF7 and 50 concatenated sequences were obtained. Three recombination events were strongly supported. Two showed at least one breakpoint in the non-sequenced region between ORF5 and ORF7. Another recombination event spanned a region within ORF5 including part of the major neutralizing epitope. Since major and minor parents and recombinant strains

were sampled at different time points in the same farm, co-circulation and a certain fitness of recombinant virus were demonstrated. Phylogeography reveals several strongly supported migration rates among provinces.

INTRODUZIONE

Fin dalla sua prima comparsa la Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome (PRRS) è emersa come la malattia di maggior impatto economico per la suinicoltura mondiale. Una grandissima variabilità genetica è stata dimostrata tra gli stipiti circolanti all'interno dei due genotipi principali (Tipo 1 e Tipo 2) che condividono solo il 50-70% dei nucleotidi e il 50-80% degli aminoacidi (6). Inoltre la diversità nucleotidica media all'interno del Genotipo Tipo 1 e del Genotipo Tipo 2 è stata stimata in circa il 15% e 12,5% rispettivamente (6) e probabilmente in progressivo aumento.

Nonostante il ruolo della ricombinazione nell'evoluzione dei virus ad RNA sia ancora dibattuto, alcuni autori asseriscono che la ricombinazione sia un importante meccanismo nel contribuire alla diversità genetica di PRRSV (3) giocando un ruolo nella patogenesi, nella evasione dalla risposta immunitaria e nell'insuccesso diagnostico. Alcuni studi hanno dimostrato eventi di ricombinazione sia *in vitro* sia *in vivo*, in condizioni sia sperimentali sia di campo (1, 6). In quest'ultimo caso le evidenze sono tipicamente ottenute da studi su larga scala, mentre lo scopo di questo lavoro è stato quello di investigare il fenomeno della ricombinazione su scala spaziale e temporale ristretta.

MATERIALI E METODI

Sono stati utilizzati 162 campioni (siero e polmoni) provenienti da tre regioni dell'Italia settentrionale e risultati positivi per PRRSV durante la normale attività diagnostica dell'Istituto Zooprofilattico delle Venezie nel periodo 2009-2012. Tutti i campioni sono stati testati usando una RT-PCR. ORF5 e ORF7 dei campioni positivi sono stati amplificati usando una RT-PCR *one step* come descritto da Oleksiewicz et al. (4). Gli ampliconi sono stati sequenziati con gli stessi primer, in entrambi i sensi, usando il kit di sequenziamento Big Dye terminator v.3.1. I cromatogrammi sono stati ottenuti usando ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer e il consenso delle sequenze mediante l'uso di ChromasPRO (versione 1.5). L'allineamento delle sequenze ottenute, assieme a quelle derivate dal lavoro di Pesente et al. (5), è stato realizzato e valutato usando il metodo MAFFT implementato nel programma Guidance.

Gli allineamenti di ORF5, ORF7 e delle sequenze concatenate sono stati testati per eventi di ricombinazione usando il programma RDP3. Al fine di ottenere una stima conservativa, è stato accettato un evento di ricombinazione solo quando evidenziato da almeno tre metodi implementati nel programma d'analisi. La significatività statistica dell'incongruenza topologica dovuta alla ricombinazione è stata valutata mediante i test SH, KH, ELW e AU implementati nei programmi TREEPUZZLE and CONSEL. In tutte le analisi la soglia di significatività statistica è stata posta a valori di $P=0.05$.

Sono state valutate le conseguenze strutturali della ricombinazione. La *p-distance* amminoacidica degli stipiti ricombinanti rispetto ai loro parentali è stata calcolata usando MEGA5. I siti di glicosilazione *N-linked* e la topologia transmembrana della GP5 sono stati predetti usando il server NetNGlyc 1.0 e Pspipred, rispettivamente. È stato valutato il possibile ruolo della pressione immunitaria mediante predizione *in silico* degli epitopi per le cellule T. I ligandi coinvolti nelle risposte dei linfociti T citotossici sono stati stimati mediante il software NetCTLpan 1.1. Tutti gli alleli degli SLA (*Swine Leukocytes Antigen*) di classe I depositati nel database del programma sono stati utilizzati per predire i peptidi tra gli 8 e gli 11 AA di lunghezza. I ligandi del MHC II invece sono stati ottenuti usando il server

NetMHCII e cercando i peptidi di 15 AA di lunghezza che contenessero la raccolta degli HLA (*Human Leukocytes Antigen*) di classe II. Per limitare la presenza di risultati falsamente positivi i peptidi sono stati considerati come possibili epitopi quando compresi nel rank 1% e con una IC50nM<50. Il programma BEAST è stato utilizzato per ottenere la ricostruzione filogeografica dei pattern di migrazione tra stipiti di PRRSV tra alcune province del nord Italia, utilizzando le sequenze disponibili, non ricombinanti, ORF5-ORF7 concatenate e di cui erano noti i dati di campionamento. È stato calcolato il Fattore Bayesiano (BF) al fine di definire i tassi di diffusione ben supportati (BF>5) usando il programma SPREAD.

RISULTATI E DISCUSSIONE

In totale si sono ottenute 114 ORF5, 84 ORF7 e 50 sequenze concatenate, includendo quelle derivate dal lavoro di Pesente et al. (5). L'analisi di ricombinazione ha rivelato 3 eventi di ricombinazione (Figura 1).

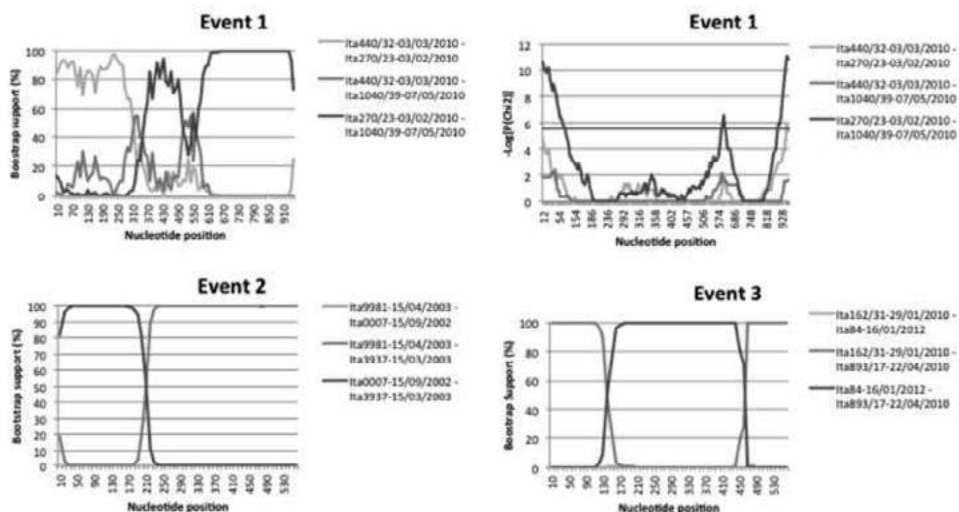


Figura 1. Evidenze di ricombinazione ottenute usando il programma RDP3.

la relazione filogenetica tra gli stipiti viene valutata tramite il supporto di bootstrap assunto come un indice della forza di questa relazione; di conseguenza un cambiamento significativo nel valore di bootstrap è suggestivo di ricombinazione. Per il primo evento, date le minori evidenze ottenute con la bootscaan analisi, viene riportato anche l'output del MaxChi, metodo particolarmente vocato alla evidenziazione dei breakpoint.

Figure 1. Recombination evidences using RDP3 programme.

Phylogenetic analysis evaluated through bootstrap support assumed as an index of the relatedness between strains; a change in the bootstrap support is suggestive of recombination. For the first event also the MaxChi output is also displayed (this programme is particularly oriented in finding breakpoint) since evidence provided by bootscaan analysis were less evident.

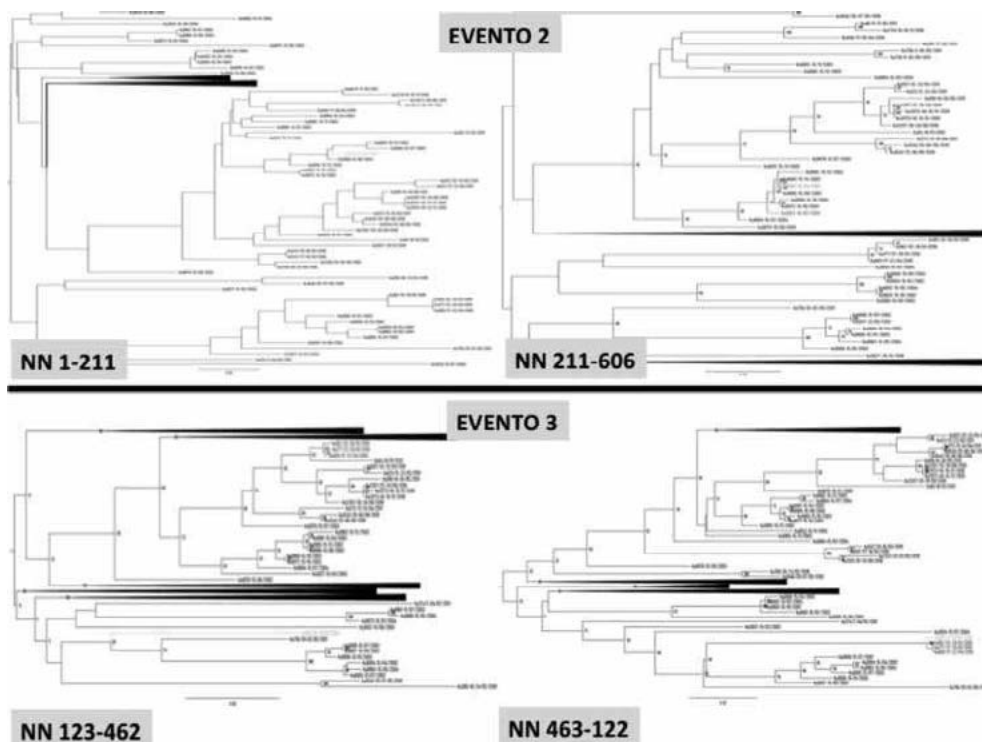


Figura 3. Evento 2-3: relazioni filogenetiche tra stipiti ottenute a partire dalle sequenze nella regione compresa ed esterna ai breakpoint di ricombinazione.

Figure 3. Event 2-3: phylogenetic relationship among strains reconstructed from segment internal and external to recombination breakpoints.

Le sequenze Ita84-16/01/2012 e Ita162/31-29/01/2010 sono state identificate rispettivamente come parentale minore e maggiore. È di notevole interesse che tutti questi campioni, raccolti in momenti temporali diversi, siano originati dallo stesso allevamento dimostrando una prolungata co-circolazione di stipiti parentali e ricombinanti. Infatti, gli stipiti ricombinanti sono stati campionati due volte a circa tre mesi di distanza, dimostrando quindi anche una certa *fitness* di questo nuovo virus. Il calcolo della *p-distance* ha dimostrato una rilevante differenza aminoacidica tra i rispettivi parentali: circa un 15% nella regione interna ai *breakpoint* (AA 41-154) e circa un 26% in quella esterna.

Al fine di evidenziare le possibili rilevanti differenze strutturali, è stata eseguita la predizione delle regioni transmembrana, senza che però venisse dimostrata una differenza nella GP5 tra parentali e ricombinanti. Sebbene parte dell'epitopo neutralizzante (AA 37-44) (2) fosse incluso in questo segmento, solamente una mutazione aminoacidica influenzata dalla ricombinazione era identificabile (AA 37). L'AA 41 era differente sia negli stipiti parentali che in quelli ricombinanti, questi ultimi caratterizzati dalla condivisione dello stesso residuo aminoacidico. Sono state osservate delle differenze rispetto ai pattern di glicosilazione: per

gli stipiti 162/31, 893/32 e 162/32 la glicosilazione è stata predetta in posizione 36, 46 e 53 rispettivamente. Un simile pattern è stato predetto per lo stipite 84 con la sola differenza che la N-glicosilazione era presente in posizione 37 invece che 36. Una certa differenza è stata evidenziata invece nello stipite 177/22 in cui era stata persa la glicosilazione in posizione 46 (Tabella 1).

Tabella 1. Profili di glicosilazione degli stipiti parentali e dei tre ricombinanti identificati nell'evento 3.

Table 1. Glycosylation profiles of parental and recombinant strains identified in the event 3.

POSITION	Ita162/31-29/01/2010 ^a	Ita893/17-22/04/2010 ^b	Ita162/32-29/01/2010 ^b	Ita177/22-29/01/2010 ^b	Ita84-16/01/2012 ^c
36	X	X	X	X	
37					X
46	X	X	X		X
53	X	X	X	X	X

^aParentale maggiore; Major parent;

^bStipiti ricombinanti; recombinant strains;

^cParentale minore; Minor parent.

L'analisi degli epitopi riconosciuti dalle cellule T, ha evidenziato che tra i parentali sono riconosciuti più o meno gli stessi epitopi e che sono coinvolti gli stessi alleli del MHC, con solamente alcune eccezioni.

Ad ogni modo deve essere sottolineato che i metodi di analisi *in silico* forniscono solo una stima probabilistica della struttura reale degli epitopi cellulari e che per i ligandi del MHC II è stata testata solo una selezione degli HLA, rendendo i risultati probabilmente meno rappresentativi. Sebbene sembrino essere presenti solo minori differenze, il ruolo della ricombinazione nel condizionare la risposta umorale e cellulo mediata non può essere escluso. Infatti, la risposta umorale può essere dipendente non solo dalla sequenza dell'epitopo neutralizzante o del sito di glicosilazione, ma anche dai cambiamenti conformazionali che impediscono l'interazione tra l'epitopo di neutralizzazione e gli anticorpi neutralizzanti (2). Inoltre non può essere escluso che nuove combinazioni di epitopi cellulari contribuiscano a differenti pressioni immunologiche, giocando un ruolo quindi nel condizionare la *fitness* di stipiti ricombinanti. In questo studio una frequenza relativamente alta di eventi di ricombinazione è stata osservata, soprattutto confrontando la ristretta area geografica considerata rispetto a quella di altri studi dove solo uno o al massimo pochi ricombinanti sono stati trovati (6). Alcune considerazioni possono essere fatte a tal riguardo: i) raccogliendo numerosi campioni da un'area piccola e in un ristretto periodo, è più probabile che siano campionati stipiti ricombinanti con bassa *fitness*, la cui sopravvivenza e diffusione tra allevamenti è improbabile; ii) le sequenze analizzate in questo studio, erano piuttosto simili (*p-distance* media: ORF5=0.133, ORF7=0.097 concatenate=0.121) facilitando la ricombinazione come descritto anche da Van Vugt et al. (7); iii) L'analisi filogeografica ha rivelato un tasso di migrazione tra province statisticamente ben supportato in 15 casi; considerato che, per

avere ricombinazione, la stessa cellula deve essere infettata da due differenti stipiti virali, la trasmissione di stipiti differenti tra allevamenti rende più probabile questo fenomeno. L'analisi filogeografica suggerisce quindi che all'interno della suinicoltura del nord Italia esiste un'ampia circolazione di molteplici stipiti di PRRSV e che le misure di biosicurezza atte a minimizzare la trasmissione e l'entrata di nuovi stipiti in un allevamento non sono efficaci, facilitando in questo modo la ricombinazione.

CONCLUSIONI

Questo studio retrospettivo ha dimostrato la presenza di un numero relativamente alto di eventi di ricombinazione all'interno di una limitata area di studio e in un breve arco temporale. Altri esempi della letteratura, riferiti a campionamenti su larga scala, suggeriscono che la ricombinazione possa essere di per se un fenomeno relativamente frequente ma che raramente gli stipiti ricombinanti acquisiscono un vantaggio evolutivo tale da permettere loro di sopravvivere per lungo tempo e quindi di diffondersi (6). Fattori manageriali, epidemiologici e genetici, peculiari della filiera suinicola dell'area geografica considerata, possono contribuire a rendere più probabile questo fenomeno. Inoltre è stata dimostrata la prolungata co-circolazione di virus ricombinanti e parentali in un allevamento. Non vi sono ancora evidenze conclusive che suggeriscano un ruolo della selezione immunitaria nel determinare la *fitness* virale. Il follow up dell'evoluzione epidemiologica, clinica e genetica in questo allevamento per un periodo più lungo permetterà di ottenere una visione più approfondita sulle possibili conseguenze della ricombinazione e sulla sua spinta evolutiva.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Franzo, G., Ceglie, L., Gigli, A., Martini, M., Drigo, M. (2012) "Evidence of Prrsv recombination from field samples in northeastern Italy". EUROPRRS2012 - Understanding and combating PRRS in Europe. :78-84.
- 2) Mateu E., Diaz I. (2008) "The challenge of PRRS immunology". Veterinary Journal 177: 345-51.
- 3) Murtaugh MP., Stadejek T., Abrahante JE., Lam TT., Leung FC. (2010) "The ever-expanding diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome virus". Virus Res 154: 18-30.
- 4) Oleksiewicz MB., Bøtner A., Madsen KG., Storgaard T. (1998) "Sensitive detection and typing of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by RT-PCR amplification of whole viral genes". Vet Microbiol 64: 7-22.
- 5) Pesente P., Rebonato V., Sandri G., Giovanardi D., Ruffoni LS., Torriani S. (2006). "Phylogenetic analysis of ORF5 and ORF7 sequences of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) from PRRS-positive Italian farms: A showcase for PRRSV epidemiology and its consequences on farm management". Vet Microbiol 114: 214-224.
- 6) Shi M., Lam TT., Hon CC., Hui RK., Faaberg KS., Wennblom T., Murtaugh MP., Stadejek T., Leung FC. (2010) "Molecular epidemiology of PRRSV: A phylogenetic perspective". Virus research 154: 7-17.
- 7) van Vugt J., Storgaard T., Oleksiewicz MB., Bøtner A. (2001) "High frequency RNA recombination in porcine reproductive and respiratory syndrome virus occurs preferentially between parental sequences with high similarity". J Gen Virol 82: 2615-20.