



# A PRRS által okozott szaporodásbiológiai problémák – Mit tudunk a betegség reprodukciós formájáról?

Andrea Ladinig  
University Clinic for Swine  
University of Veterinary Medicine Vienna

[andrea.ladinig@vetmeduni.ac.at](mailto:andrea.ladinig@vetmeduni.ac.at)



Köves Days, May 5<sup>th</sup> 2016



# Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome

## ■ Gazdasági vonatkozások

- Az ágazat egyik legjelentősebb betegsége világszerte
- USA-ban az éves veszteség ágazati szinten : 664 millió \$(Holtkamp et al. 2013)
  - 45 % szaporodásbiológiai forma miatt
  - 55 % növendék-hízó korosztály veszteségeinek köszönhetően
- Európai eredmények (Nieuwenhuis et al. 2012)
  - Átlagos veszteség 126 €/ koca – 18 hétnél tovább tartó járványkitörés esetén
  - Állományok között nagy különbségek : 59 – 379 €

TABLE 3: Losses during the period of outbreak

Herd	Type of herd*	Group	Number of sold pigs/sow Before outbreak (18-week period)	Number of sold pigs/sow During outbreak (18-week period)	Number of sold pigs/sow % Change	Total loss	Loss/sow
1	N	1	5.7 gilts	3.5 gilts	-38.6%	€95,725	€379
2	R	1	6.4 feeder pigs	6.1 feeder pigs†	-4.7%	€27,853	€59
3	N	1	7.2 gilts	5.7 gilts	-20.8%	€134,292	€230
4	R	1	8.8 weaned piglets	7.4 weaned piglets‡	-15.9%	€68,293	€64
5	R	2	9.7 feeder pigs	8.2 feeder pigs	-15.5%	€31,522	€83
6	R	2	8.8 feeder pigs	7.7 feeder pigs	-12.5%	€33,523	€85
7	R	2	8.9 feeder pigs	7.1 feeder pigs	-20.2%	€35,040	€81
8	R	2	9.0 feeder pigs	7.7 feeder pigs	-14.4%	€26,084	€61
9	R	2	7.8 feeder pigs	6.3 feeder pigs	-19.2%	€105,854	€90
Mean					-18.0%	€62,021	€126

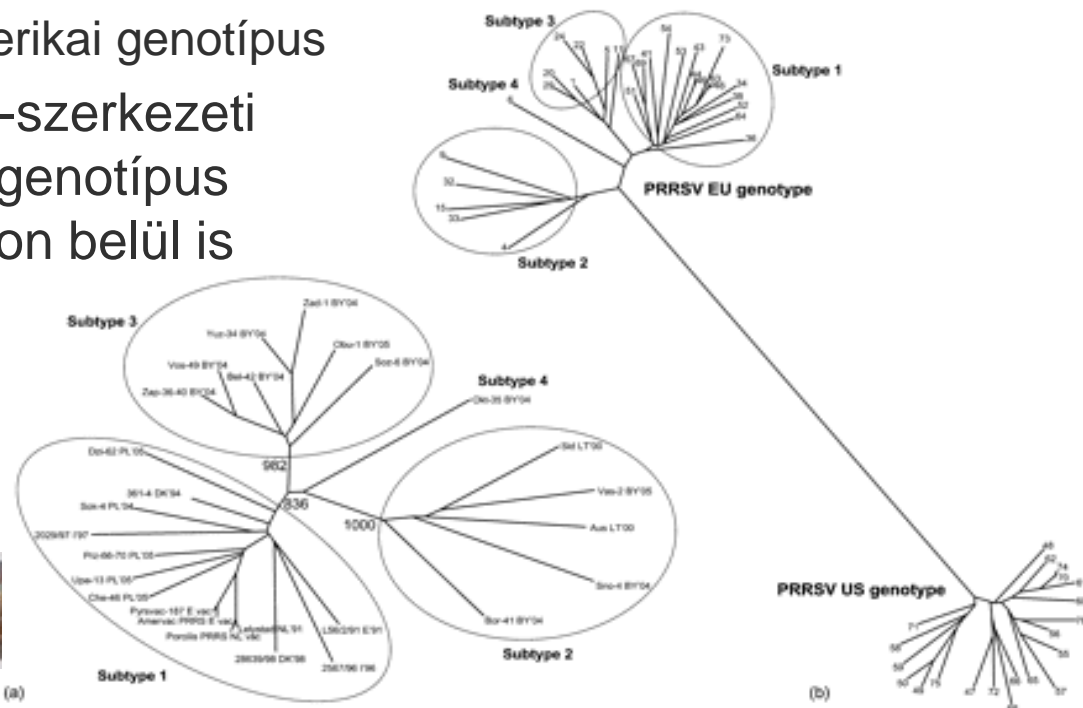
\*N Nucleus herd, R Regular commercial production herd

†Feeder pigs Delivered piglets to fattening phase (at eight to 10 weeks of age)

‡Weaned piglets Delivered piglets at weaning age

# PRRS Vírus

- *Arteriviridae* család
- Burkos vírus
- RNS Vírus
- 2 Genotípus
  - Genotype 1 – Európai genotípus
  - Genotype 2 – Észak-Amerikai genotípus
- Nagy genetikai és antigén-szerkezeti változékonyság az egyes genotípus csoportok között illetve azon belül is



(a)

(b)

# PRRSV – Klinikai tünetek

- Légzőszervi megbetegedés és csökkent fejlődési teljesítmény növendék és hízó sertéseknél
  - PRRSV a leggyakoribb vírus klinikai PRDC esetében
  - PRRSV és egyéb kórokozó (PCV2, *Bordetella bronchiseptica*, *Mycoplasma hyopneumoniae*, etc.) együttes fertőzése esetén sokkal súlyosabb kép alakul ki, mint egyszerű esetben
- Szaporodásbiológiai problémák kocákban



# PRRSV – Klinikai tünetek

## ■ Szaporodásbiológiai PRRS

- A mechanizmus nem teljesen tisztázott
- Klinikai megjelenése függ a vemhességi stádiumtól
  - Korai vemhesség: embrió elhalás, visszaivarzók számának emelkedése (Prieto et al. 1996, 1997)
  - Vemhesség közepe: a vírus nem jut át a placenta barrieren (Christianson et al. 1993, Kranker et al. 1998)
  - Késői vemhesség: fő hatásai
    - Késői vetélés
    - Kora-ellés
    - Halva-ellett és mumifikált malacok számának emelkedése
    - Gyenge életképességű malacok
    - Választás előtti elhullás növekedése



# PRRSV – Átvitel

## ■ Közvetlen

### ■ Vertikális

- Magzatburkon keresztül (kocából embrióba) vagy ondóval

### ■ Horizontális

- Legfogékonyabb malacok
  - Választott malacok a maternális védelem kiürülését követően
  - A falkába hozott utánpótlás állatok (kocasüldő vagy kan)

## ■ Közvetett

### ■ Élő vektorok

- rovarok, emberek

### ■ Közvetítő tárgyak

- Szállító járművek, ragályfogó tárgyak, csizmák, tű, stb.

### ■ Aerosol



# PRRSV – Átvitel

- Magzatburkon keresztül
  - PRRSV megfertőzheti az embriót és a magzatot a beágyazódás után a vemhesség bármely szakaszában, közvetlenül az amnion-üregbe történő fertőzéssel
  - Magzatburkon keresztül történő fertőzés a vemhesség utolsó harmadában
    - Függetlenül a vírus virulenciájától
  - A vírus placentán való átjutásának módja nem ismert
  - A PRRSV endometriumban történő szaporodása előzi meg a magzat fertőzését
  - Nem minden magzat fertőződik (egy időben)
  - A PRRSV szaporodása a magzat különböző primer nyirokszöveteiben megy végbe
    - A magzati thymus a vírus szaporodásának elsődleges helye



# PRRSV – A vírus telepre jutásának módjai

Kocasüldő utánpótlás



Kan/sperma



Ragályfogó tárgyak



emberek



szél



szállítójármű



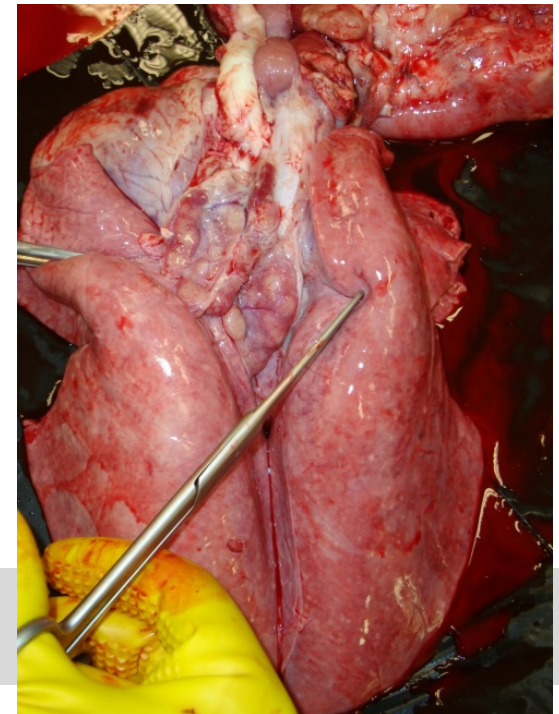
Lég, rovarok





# PRRSV kórfejlődés

- PRRSV célsejtjei
  - Bizonyos receptorokkal bíró macrophagok
    - Sialoadhesin (CD169) és CD163
- Virémia
  - A fertőzés után gyorsan (12 – 24 órán belül)
  - Csúcs 7 – 14 nappal a fertőzés után
  - Időtartam
    - Általában <28 nap
    - Függ az állat korától, a vírustörzstől, stb.
- Vírus-perzisztencia
  - Lymphoid szövetekben
  - Kimutatható akár 250 napig is (Wills et al. 2003)
  - Mechanizmus nem tisztázott

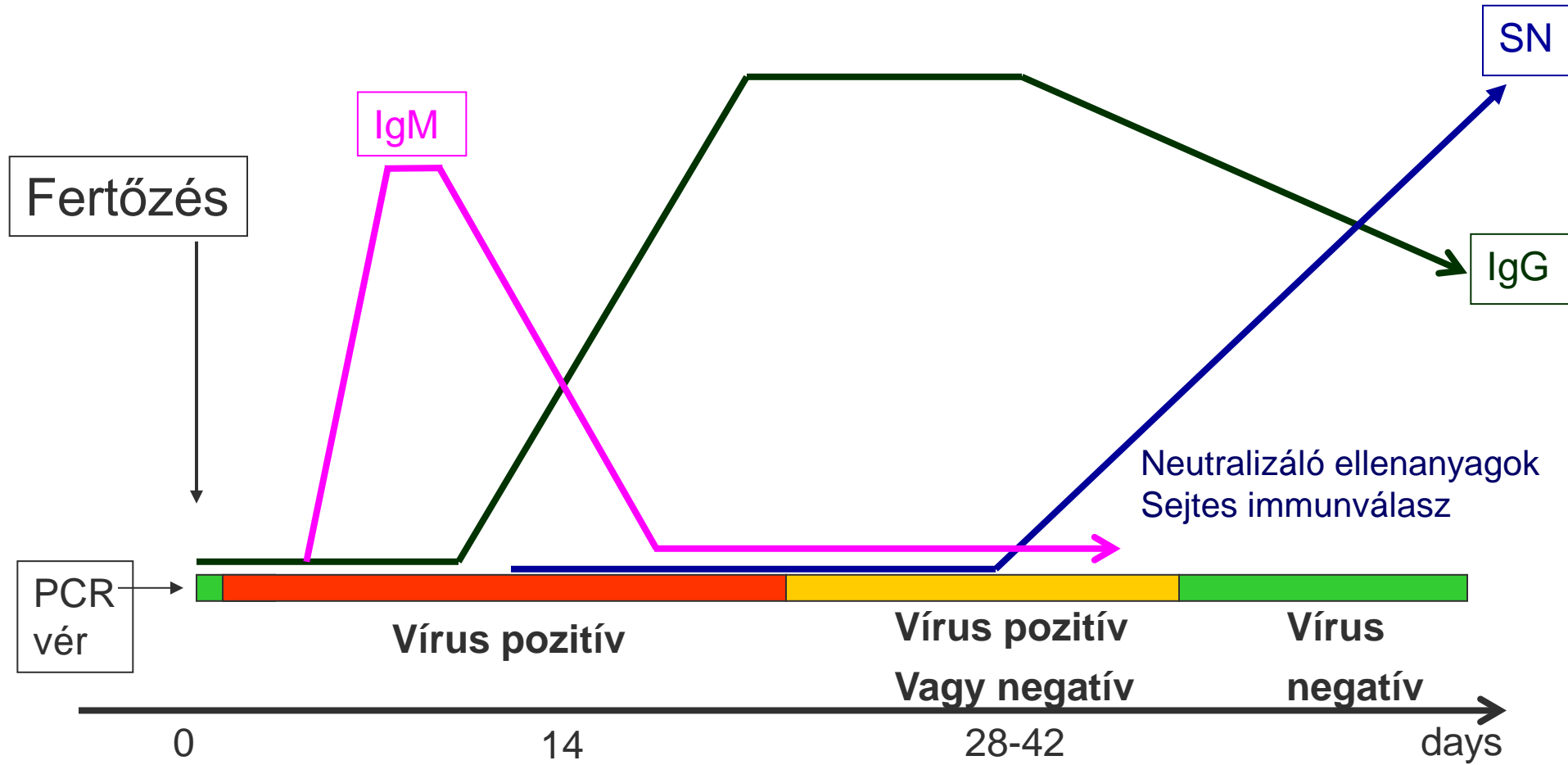


# PRRSV immunitás

- Az immunválasz a PRRSV-vel szemben elég gyenge és hatástalan
- Perzisztáló fertőzések
- „Immune escape” –védekező mechanizmus
  - Neutralizáló ellenanyagok késői termelődése
  - Késői és gyenge sejtes immunválasz
  - Különböző sejtek cytokin termelése megváltozik
- A PRRSV izolátumok között különbségek vannak
- A gazda-faktor befolyásolja az immunválaszt



# A fertőzés dinamikája



# PRRSV elleni immunválasz

- Védelemmel való összefüggés nem ismert
  - Mit kell mérnünk az immunitás értékeléséhez?
  - Neutralizáló ellenanyagok
  - Sejt közvetített immunitás
- Ellentmondásos eredmények a szakirodalomban
  - PRRSV - genetikailag nagyon szerteágazó
  - In vivo – in vitro tanulmányok
  - Genetikai különbségek
- Hatékony vakcina előállítását nehézé teszi



# Nyitott kérdések

- A PRRSV-által kiváltott szaporodásbiológiai problémák mechanizmusa kevésbé ismert
- A magzat megtapadási helyén bekövetkező sejtelhalás a magzat elhalásának oka?
- A PRRSV-által kiváltott magzatkárosodás és elhalás mechanizmusa továbbra sem tisztázott
- Hiányok vannak a PRRSV elleni immunitásnak és az immun-körfejlődésnek a megértésében
- A szaporodásbiológiai PRRSV iránti genetikai fogékonyság is változó ?



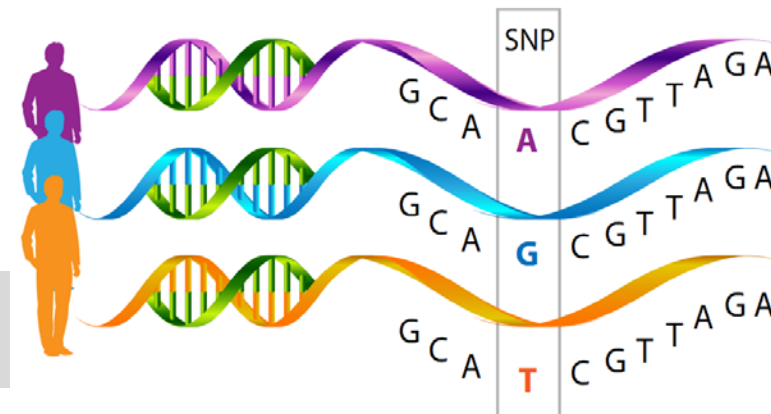
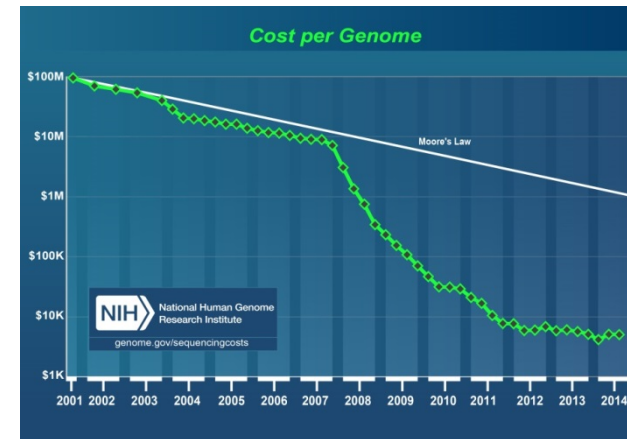
# Saját kutatási eredmények

- Lefolytattunk egy nagyszabású projektet, amely a vemhes kocasüldőkben kialakuló szaporodásbiológiai PRRS súlyosságát előre meghatározó fenotípus és genotípus sajátosságokat vizsgálta
- Célkitűzések
  - Meghatározni azokat a fenotípusos és genotípusos sajátosságokat, melyek előrevetítik a PRRSV súlyosságát szaporodásbiológiai modellben
    - Meghatározni a fertőzésre adott fenotípusos választ
    - Meghatározni az „érzékenyebb” és „ellenállóbb” kocasüldőt
  - A „genome wide association studies” (GWAS) felhasználásával összekapcsolni a genetikai jellemzőket a fenotípusos megjelenéssel
  - Megvizsgálni, hogy melyik kocasüldő és magzat fenotípus hozható összefüggésbe a kísérletes PRRSV fertőzés alomra gyakorolt hatásával



# Háttér

- Egyedi különbségek a fertőző betegségek lefolyása során
- Genetikai eltérések
  - Immunválasz
- Új genetikai technika lehetővé teszi a kutatást
  - Nagy kapacitású módszerek
  - Chip alapú módszerek, SNP chipek
- QTL - Quantitative trait locus  
(mennyiségi tulajdonságok genetikai régiója)
  - A kromoszóma azon szakasza, amely a mennyiségi tulajdonságokat befolyásolja
- Single Nucleotide Polymorphism (SNP)
  - Egyedi nukleotid eltérések a DNS-ben
  - Kapcsolat fenotípusos tulajdonságokkal
  - GWAS

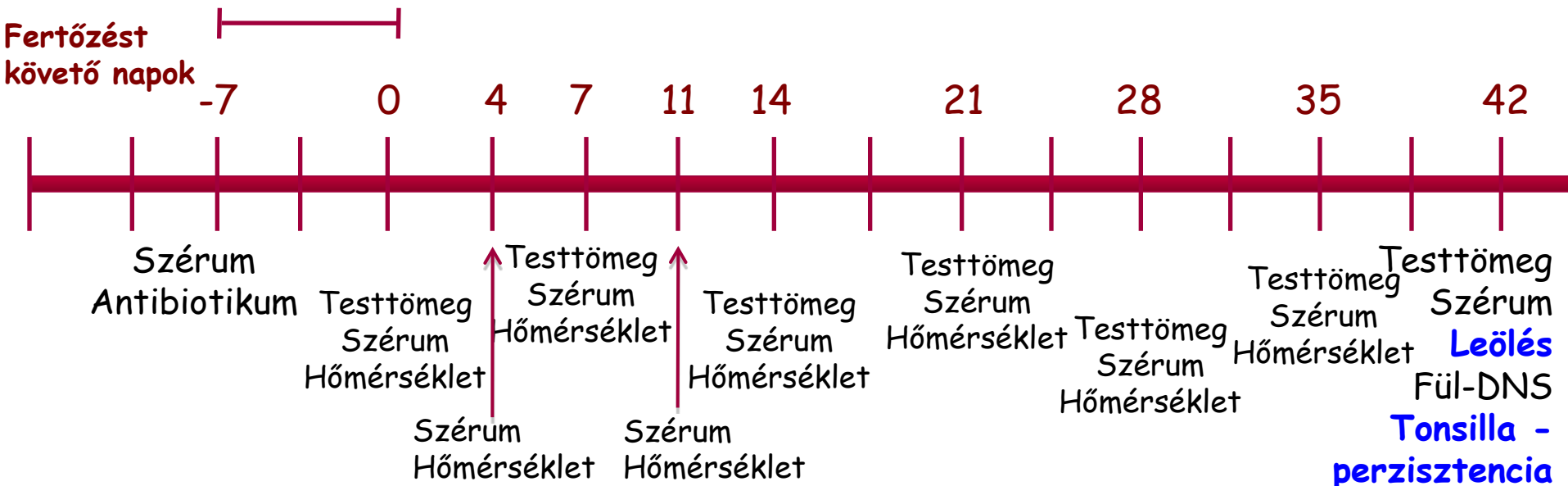


# Légzőszervi PRRS model



- R.R.R. Rowland *et al.*, Kansas State University
- 15 kísérletes fertőzés ~200 sertés minden alkalommal , ~3 hetes korban
- PRRSV-izolátumok: NVSL-7985 v. KS-06 ( $10^5$  TCID<sub>50</sub>, 89% azonosság)

## Akklimatizáció

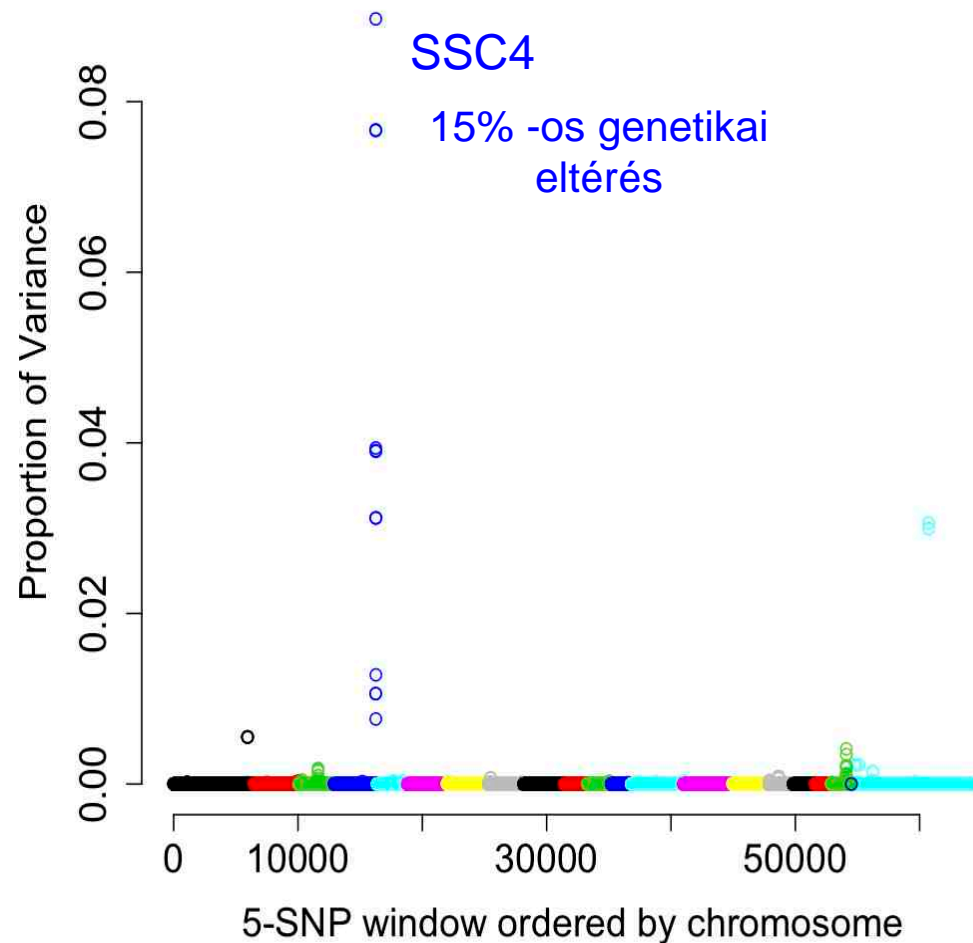




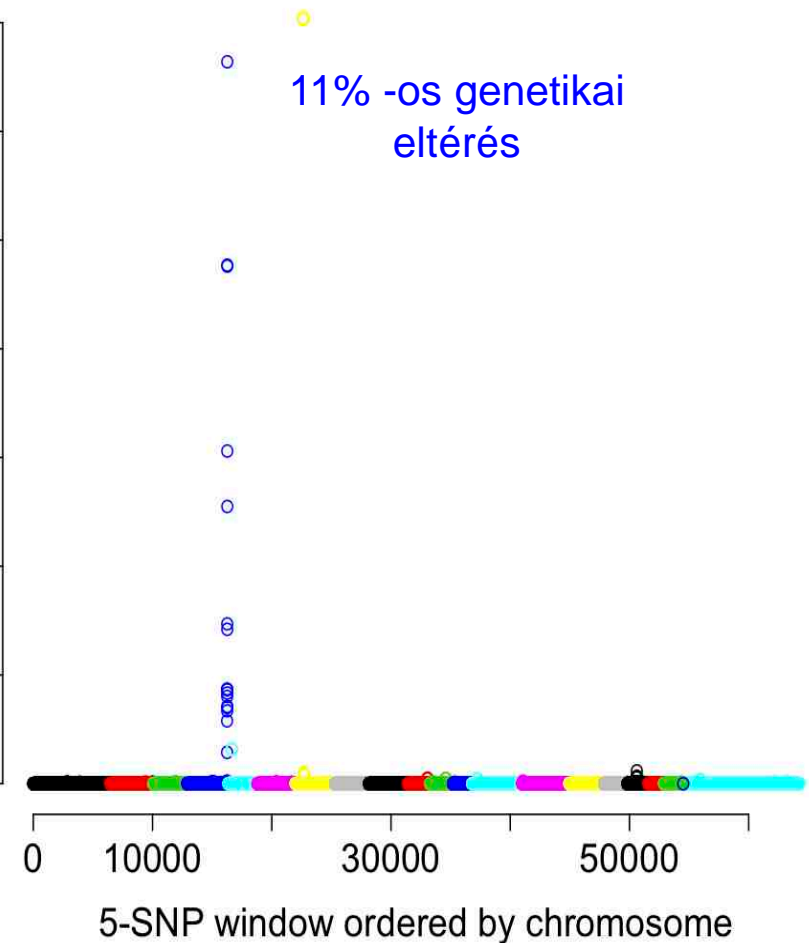
# GWAS-genomhoz kötődő vizsgálat



## Vírus mennyiség a szérumban

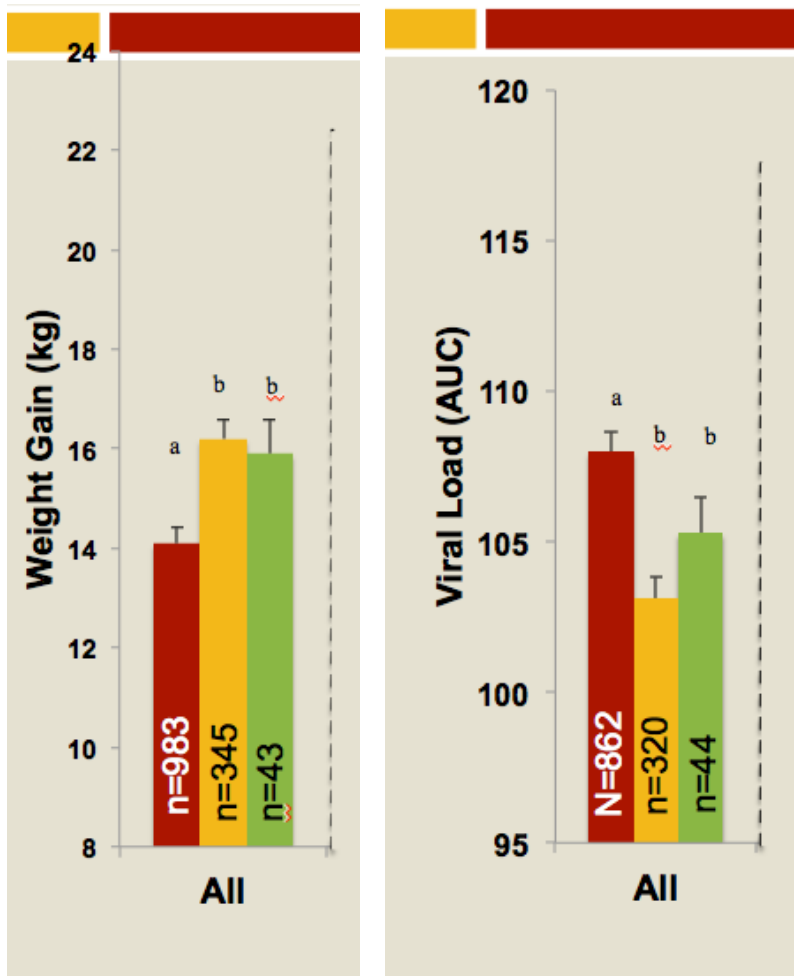


## Testtömeggyarapodás



# Légzőszervi PRRS model

## ■ SNP hatása az SSC4-re (WUR1000125)



- SSC4 génje befolyásolja a PRRSV-re adott immunválaszt
- A gén különféle genetikai vonalakon jelen van
- A kedvező génszakasz ritkábban fordul elő
- Kiválasztott gén: GBP5 (Interferon-induced guanylate-binding protein)

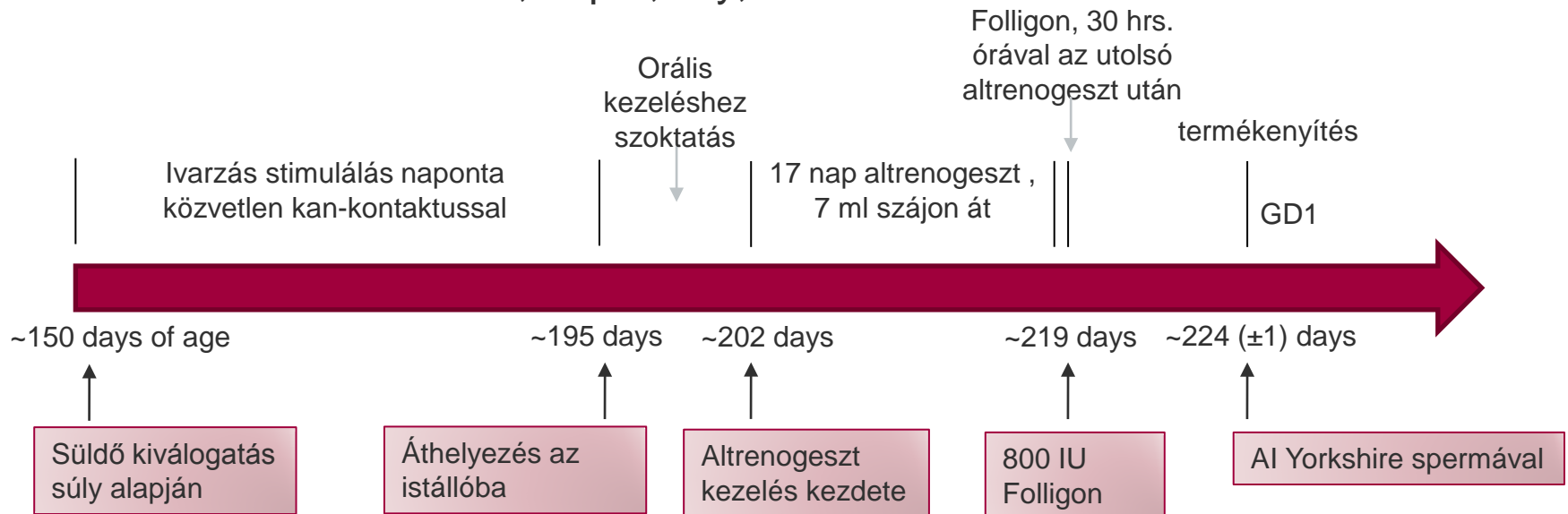
# Saját kutatási eredmények

- Lefolytattunk egy nagyszabású projektet, amely a vemhes kocasüldőkben kialakuló szaporodásbiológiai PRRS súlyosságát előre meghatározó fenotípus és genotípus sajátosságokat vizsgálta
- Célkitűzések
  - Meghatározni azokat a fenotípusos és genotípusos sajátosságokat, melyek előrevetítik a PRRSV súlyosságát szaporodásbiológiai modellben
    - Meghatározni a fertőzésre adott fenotípusos választ
    - Meghatározni az „érzékenyebb” és „ellenállóbb” kocasüldőt
  - A „genome wide association studies” (GWAS) felhasználásával összekapcsolni a genetikai jellemzőket a fenotípusos megjelenéssel
  - Megvizsgálni, hogy melyik kocasüldő és magzat fenotípus volt összefüggésbe hozható a kísérletes PRRSV fertőzés alomra gyakorolt hatásával

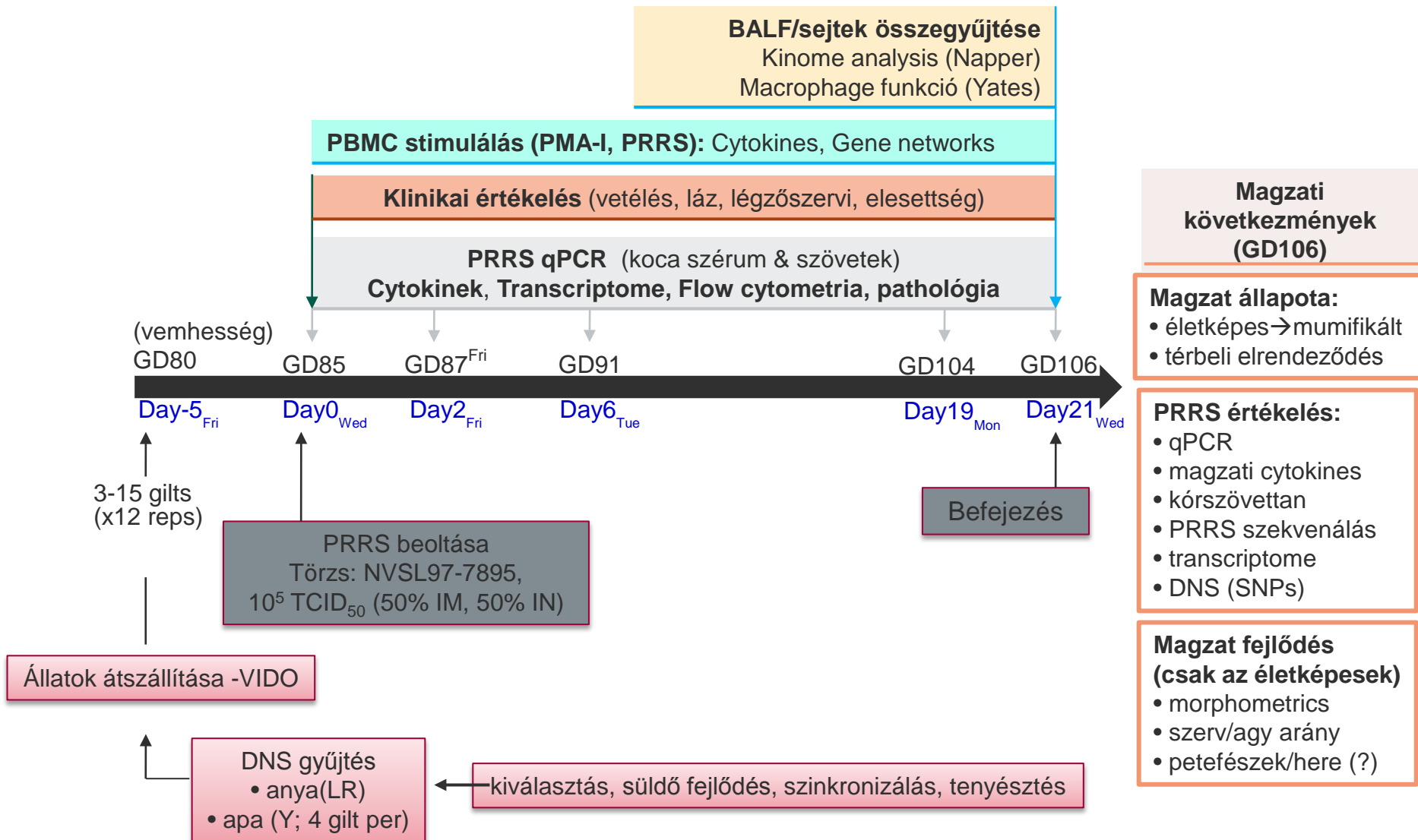


# Anyag és Módszer

- Kocasüldők kísérletes fertőzése a vemhességük 3. trimeszterében (85 ±1. vemhességi nap)
  - 114 tisztavérű lapály süldő, születési testtömeg alapján kiválogatva
  - Magas eü-i státuszú állomány: PRRSV, M.hyo, APP-mentes
  - Vakcinázás :Parvo, Lepto, Ery, PCV2

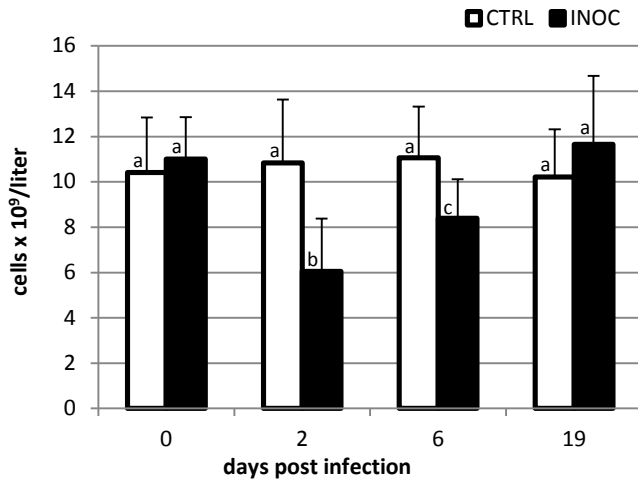


# Kísérlet elrendezése

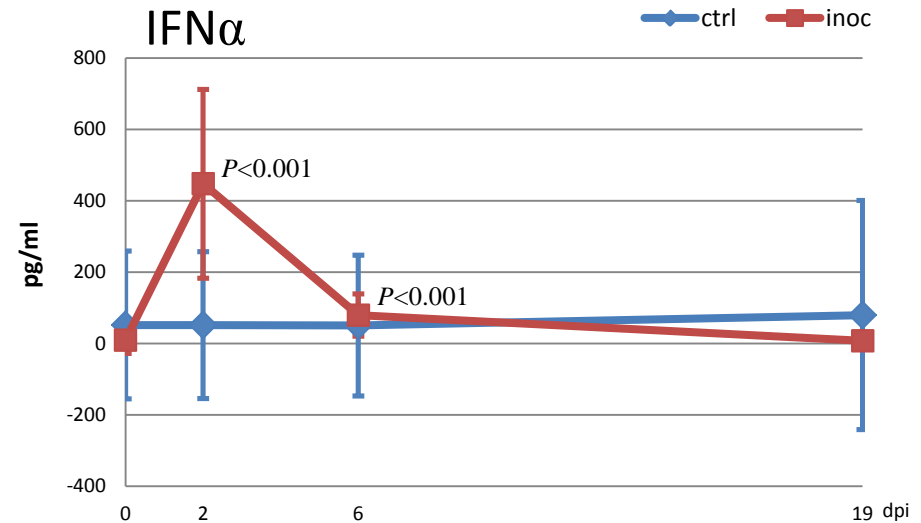


# Változások a FVS és a szérumban lévő cytokinok terén

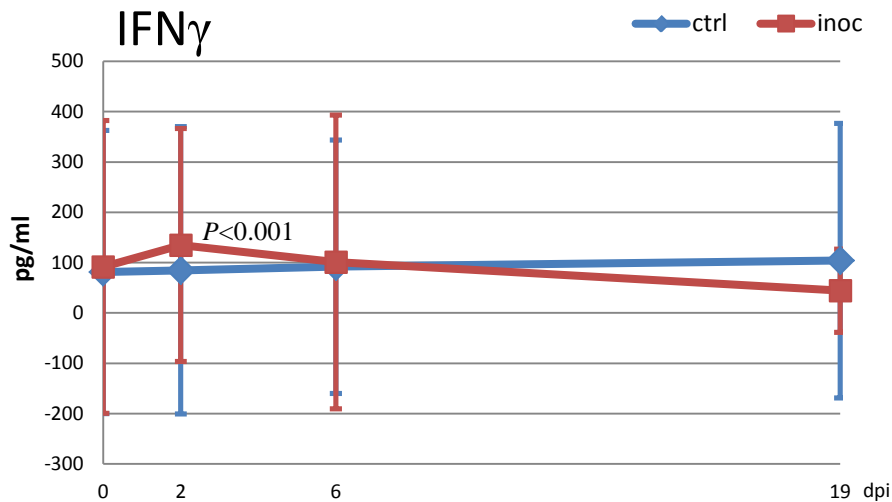
## Össz FVS



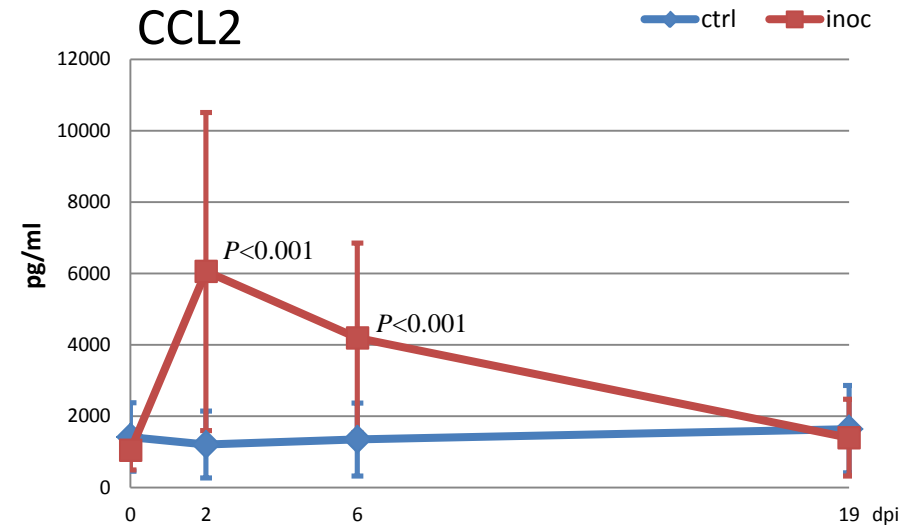
## IFN $\alpha$



## IFN $\gamma$

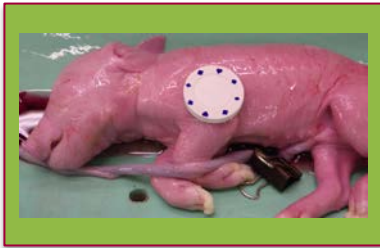


## CCL2



# Fetal preservation

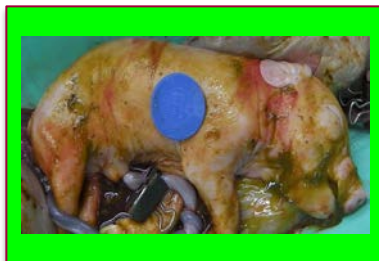
Magzat állapota	Külső megjelenés	Belső szervek megjelenése
Életképes ( <b>VIA</b> )	Normális, fehér, szőrös	Normál
Meconiummal szennyezett ( <b>MEC</b> )	Életben volt a kiírtáskor, de sűrű, barnás amnion folyadékkal fedett	Normál
Bomló stádium ( <b>DEC</b> )	hulla, nagyrészt fehér, testfelület < 50% -a elszíneződött	elfolyósodott, törékeny, összetapadt
Autolyzált ( <b>AUT</b> )	Hulla, testfelület > 50% -a elszíneződött	elfolyósodott, törékeny, összetapadt
Mumifikált ( <b>MUM</b> )	kicsi, beszáradt, kenőcsös maradt : fejcsúcs-fartő távolság < 20 cm	



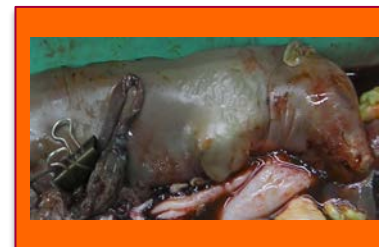
Életképes (**VIA**)



Bomló stádium (**DEC**)



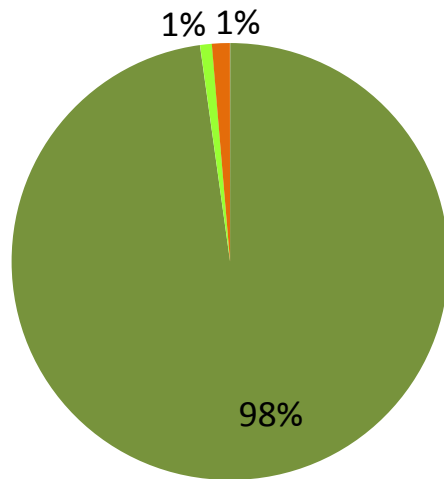
Meconiummal szennyezett (**MEC**)



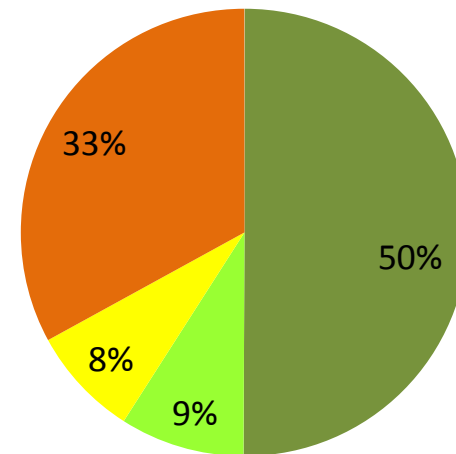
Autollyzált (**AUT**)

# Magzat állapota

CTRL (n=227)



FERT (n=1392)

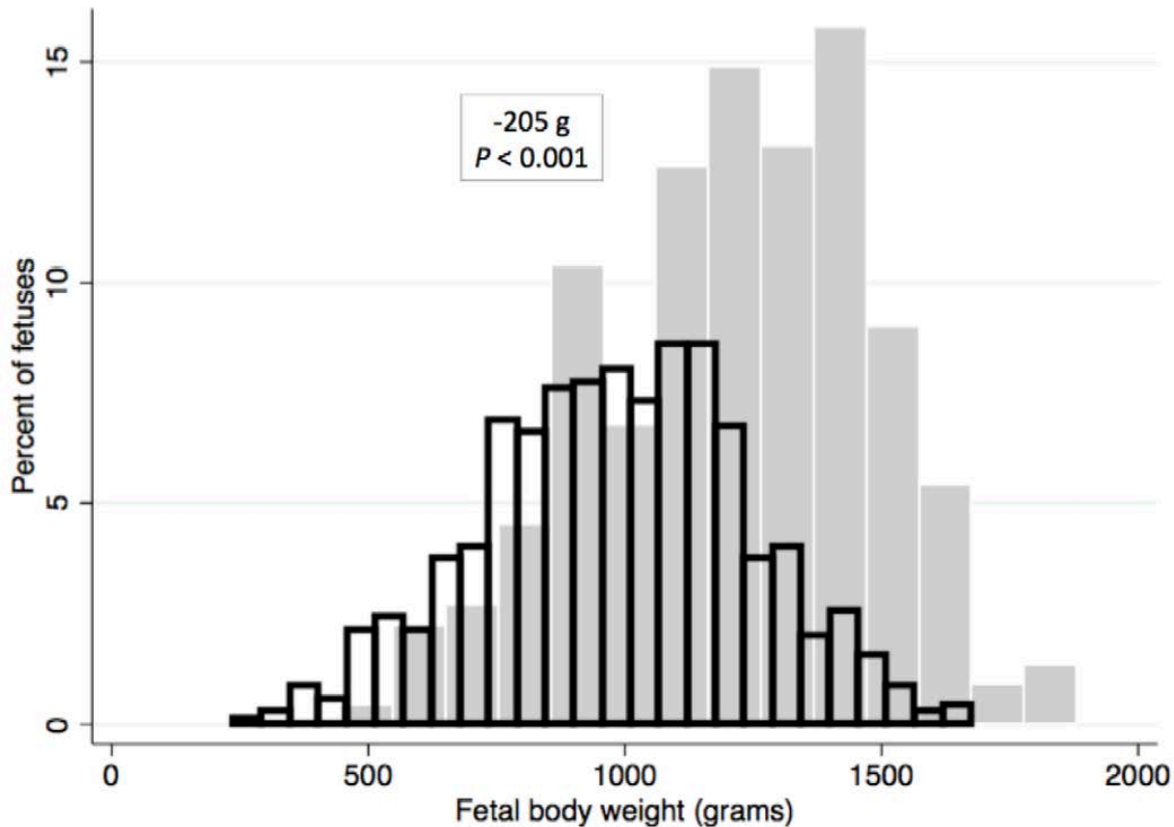


- Életképes és meconiumos → élő
- bomló és autolizált → elhullott
- FERT: 0 – 94,4 % elhullott magzat/alom





# Élő magzatok testtömege



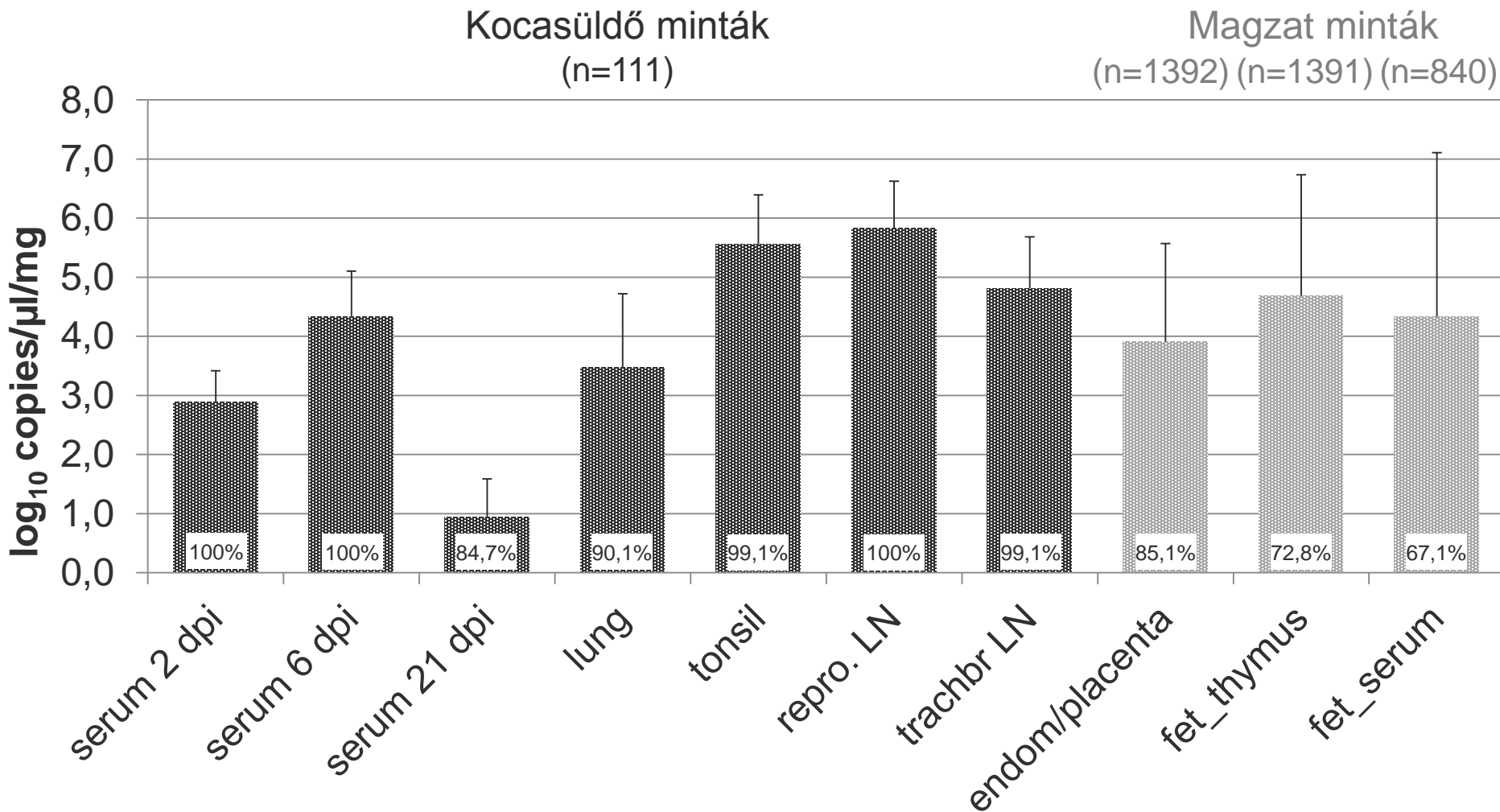
Ctrl: 1204 ( $\pm 36$ ) g  
 Fert: 999 ( $\pm 21$ ) g  
 $P < 0.001$

A testtömeg nem volt kapcsolatban az RNS koncentrációjával:

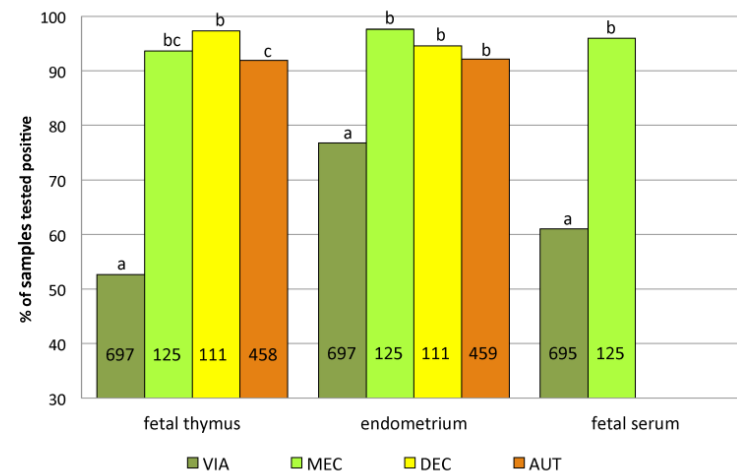
- Magzati thymus és/vagy szérum
- Méh/magzatburok



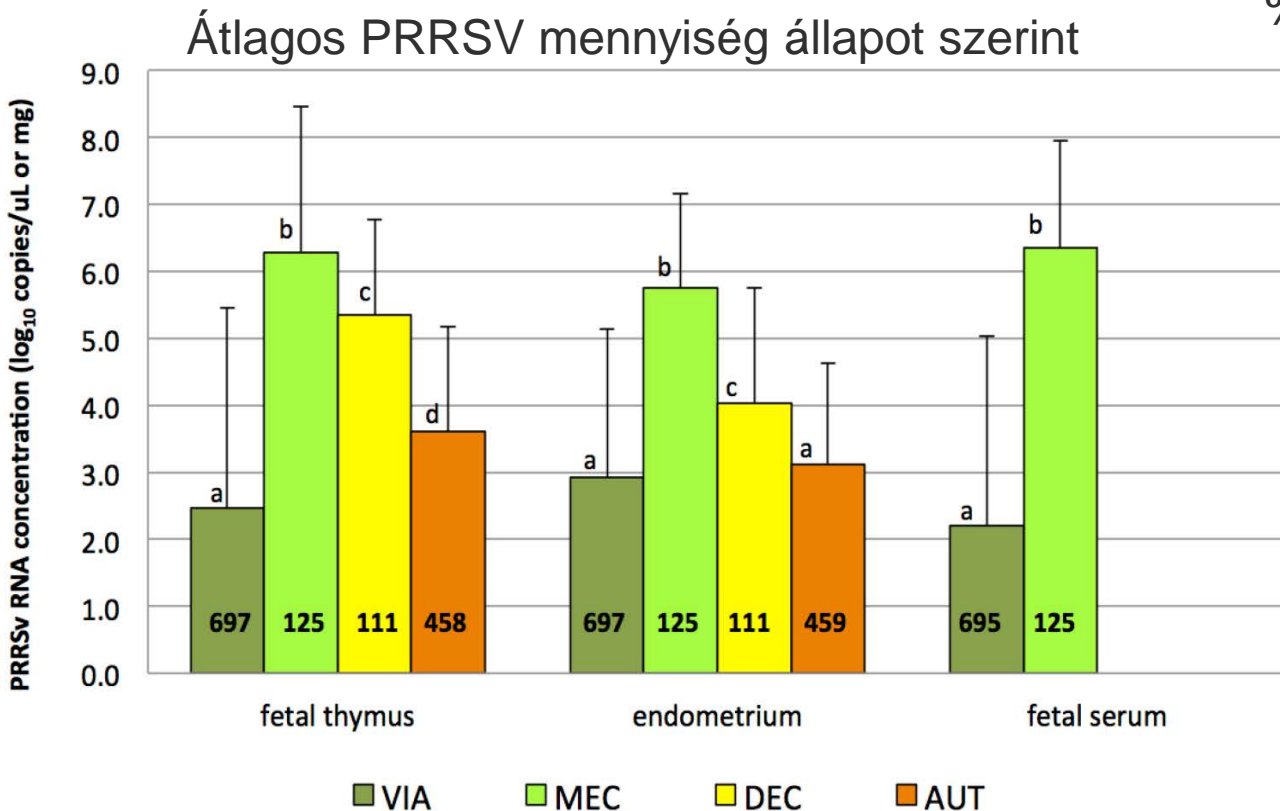
# qPCR eredmények a szérumban és szövetekben



# Vírus mennyisége a magzatban és a magzat állapota



% PRRSV pozitívítás állapot szerint



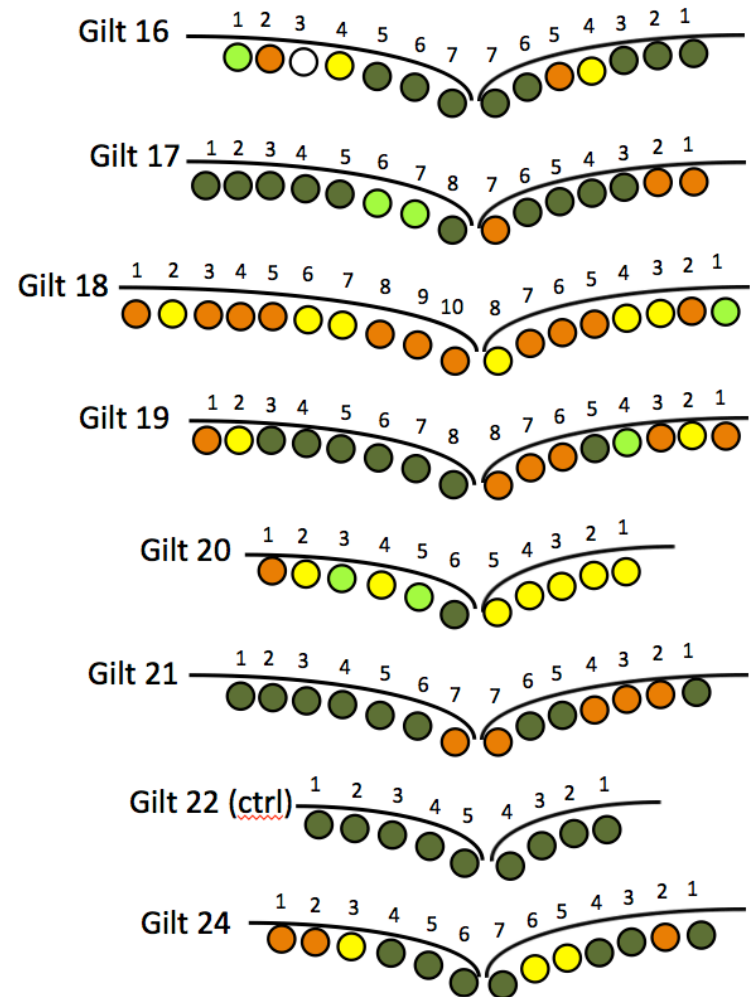
Átlagos PRRSV mennyiség állapot szerint

# A méhen belül egy csoportban vannak az elhalt magzatok?

- IGEN!
- Erős összefüggés ( $P < 0.001$ )

## Magzat elhullásának esélye

- $OR_{(1 \text{ szomszédos hulla})} = 3.8 (2.9, 4.9)$
- $OR_{(2 \text{ szomszédos hulla})} = 7.5 (5.4, 10.7)$
- **Lokális** kórélettani mechanizmus alakul ki



# A fenotípussal összefüggő eredmények összefoglalása

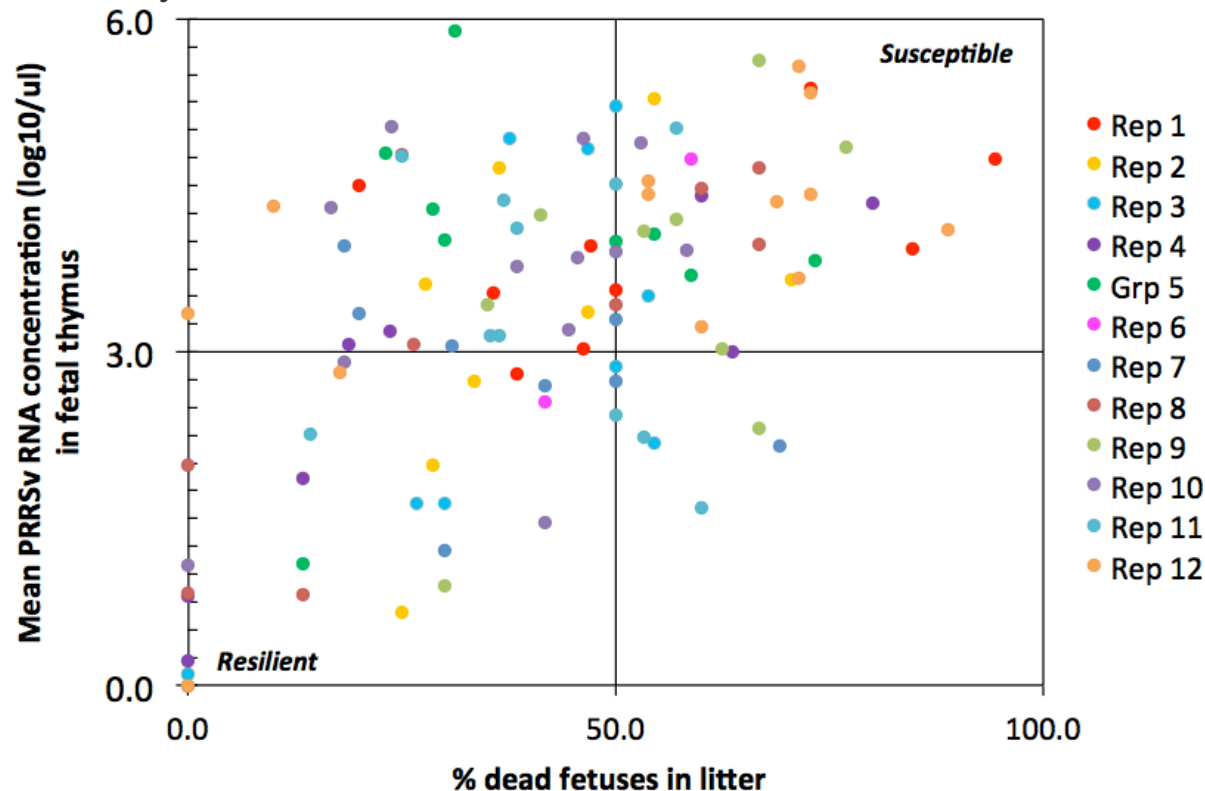
- Nincs összefüggésben a PRRSV fertőzés kimenetelével vemhes kocasüldőkben
  - WUR10000125 SNP az SSC4-en
  - Anya születési súlya
  - PRRSV RNS-koncentráció az anya vérében és szöveteiben
- Az anya-magzat kapcsolódási felületen (méh nyh.) mérhető PRRSV RNS koncentrációval függ össze legerősebben a magzatban lévő vírus mennyisége
- A magzati thymus vírus tartalmának növekedésével nőtt a magzat elhullásának valószínűsége
- A magzatok fertőződése és elhullása csoportosulva alakult ki a méhben
  - A szomszédos magzatok státusza és a magzatok közötti PRRSV átvitel fontos
- A kocasüldők szisztémás immunreakciója hozzájárult a magzati kórkép kialakulásához
  - A szérum IFN $\alpha$  hozzájárul a magzat elhullásának valószínűségéhez
  - A felerősödő IL12 termelés és a megnövekvő myeloid és T helper sejt-szám védőhatással bírhat



# Kocasüldők PRRSV iránti fogékonysága

## ■ Fenotípusos válasz

- Alom átlagos vírus mennyisége vs. halott magzat %-os aránya az alomban
  - Óriási eltérések
  - A genommal összefüggő (GWAS-genom wide association study) vizsgálathoz gond az alacsony kocasüldő létszám



# Magzatok PRRSV iránti fogékonysága

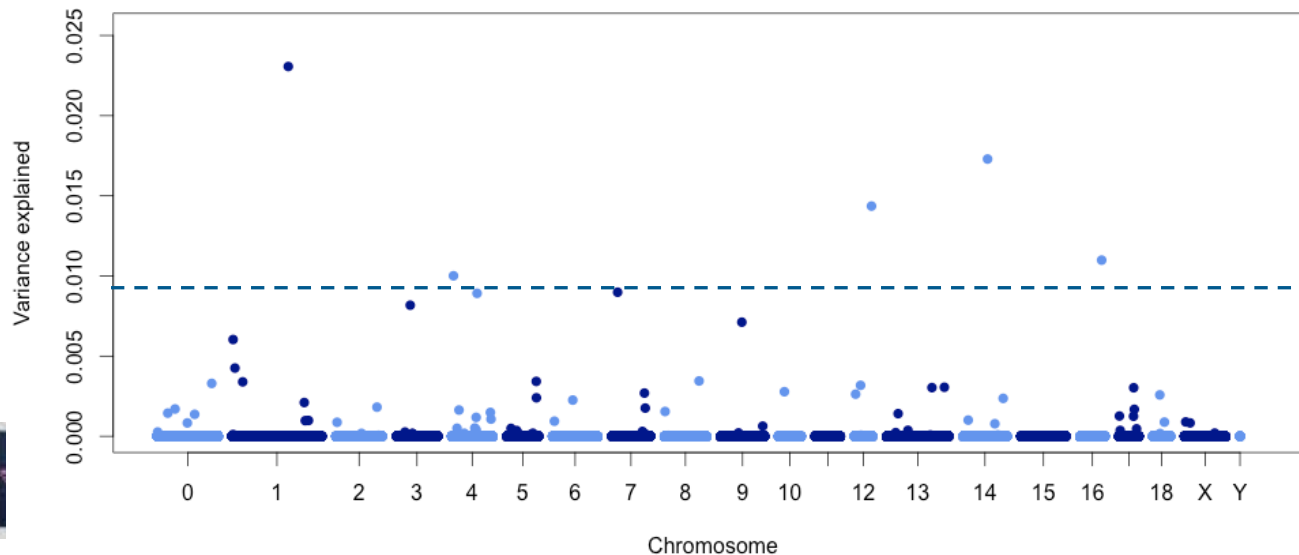
- Fenotípusos válasz
  - Magzati thymus vírus tartalma
  - Anya-magzat kapcsolódási felület vírus tartalma (endometrium + magzati placenta)
  - Magzat elhullása és a magzat állapota
- Probléma: a DNS kinyerése autolizált magzataból
  - Összesen 928 magzatot lehetne vizsgálni (kb~1400-ból)



# Magzat PRRSV iránti fogékonysága

## ■ Genom vizsgálat eredményei (GWAS)

- 24 SNP-jelöltet sikerült beazonosítani 21 genom régióban, 10 kromoszómán
- Magzati thymus vírus mennyisége
  - 3 SNP az SSC1, SSC12, SSC14 génszakaszon
  - Összesen ~13 % -át magyarázza a genetikai eltéréseknek





# PRRSV susceptibility of fetuses

- Genom vizsgálat eredményei (GWAS)
  - 24 SNP-jelöltet sikerült beazonosítani 21 genom régióban, 10 kromoszómán
  - Magzati thymus vírus mennyisége
    - 3 SNP az SSC1, SSC12, SSC14 génszakaszon
      - Összesen ~13 % -át magyarázza a genetikai eltéréseknek
  - Anya-magzat kapcsolódási felület vírus mennyisége
    - Csak 1 SNP a SSC15 szakaszon
  - Magzat elhullása
    - 20 SNP
    - 18 SNP-t sikerült azonosítani a sertés genomban
      - Egyenként 1 % – 4.4 % genetikai variabilitást igazol
      - Összesen 35.4 % genetikai variabilitást magyaráz



# Magzatok PRRSV iránti érzékenysége

- Genom vizsgálat eredményei (GWAS)
  - A gének olyan beazonosított génszakaszon vannak, amelyek az immunválasz különböző folyamataiért felelősek
    - Cytokine termelés
    - Leukocyte aktivitás
    - Nem specifikus immunválasz mechanizmusai, mint pl. a különböző immunsejtek (NK sejtek, macrophagok)
  - Az eredményeket a közelmúltban publikálták
    - Yang *et al.* 2016 „A genome-wide association study of fetal response to type 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus challenge” *Sci Rep.* 2016; 6:20305



# GWAS- vemhes kocasüldő PRRS Model

## ■ Összefoglalás

- Beazonosították a genom bizonyos szakaszait, melyek valószínűleg szerepet játszanak a magzatok PRRSV fertőzés iránti genetikai fogékonyságában
- További vizsgálatokra van szükség az eredmények megerősítéséhez
  - Csak 1 PRRSV izolátumot használtak
  - Csak 1 időpontban történt vizsgálat a fertőzést követően
  - Az utánkövetést szolgáló kísérlet már tervezési fázisban van



# Köszönetnyilvánítás

## Kutatótársak

- Joan Lunney
- Graham Plastow
- Jack Dekkers
- Bob Rowland
- Bob Kemp
- Benny Mote
- Jamie Wilkinson

## Támogatók



**GenomeCanada**



**GenomeAlberta**

## Köszönetnyilvánítás

- Univ of Alberta
- VIDO animal care + research scientists (Drs. Wilson, Gerdst, Walker)
- Animal care WCVM
- PDS staff
- Fast Genetics
- Farm staff
- Harding laboratory staff & students

