

## Slutrapport: H0750371

### Porcint circovirus type 2 (PCV2) och postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS) i Sverige – hur bryts cirkeln?

#### Bakgrund

Vid tidpunkten för ansökan var PMWS ett allvarligt problem i svenska grisbesättningar liksom i de flesta övriga grisproducerande länderna. Det var då klarlagt att porcint circovirus typ 2 (PCV2) kan orsaka PMWS men långt ifrån alla grisar som infekteras med PCV2 utvecklar PMWS. En rad undersökningar syftade till att identifiera faktorer i omgivningen (skötsel, foder, ”stress”, smittryck), hos djuren (genetik, ålder, immunstatus) och hos viruset (genotyp, virulensfaktorer, immunmodulering) som påverkade uppkomsten av PMWS. Experimentella vaccin mot PCV2 utvecklades och deras förmåga att skydda mot PMWS behövde testas under fältmässiga förhållanden. Våra studier fokuserades till tre frågeställningar:

1. Inverkar besättningsrutinerna på uppkomsten av PMWS?
2. Finns det ett samband mellan genogruppen av PCV2 och uppkomsten av PMWS?
3. Påverkar PCV2 den normala cellfunktionen?

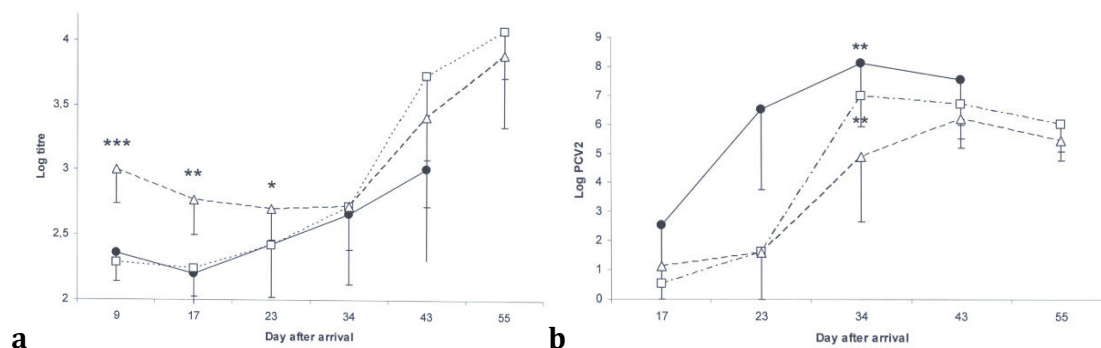
#### Material och metoder

För detaljerad beskrivning av material och metoder hänvisas till publikation 1-10.

#### Resultat

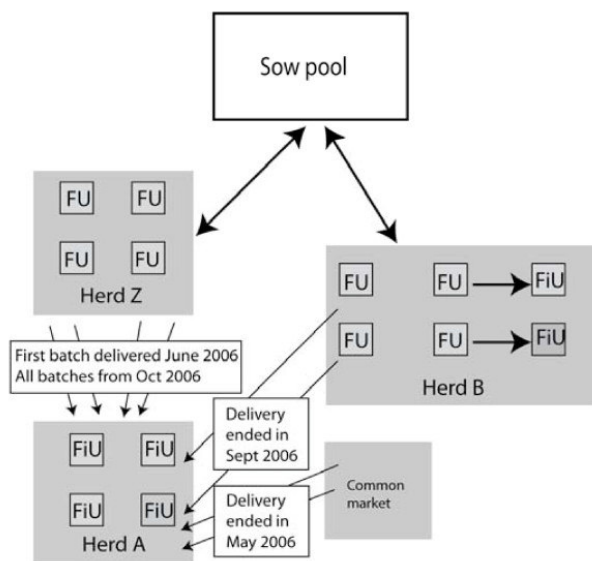
##### *Inverkar besättningsrutinerna på uppkomsten av PMWS?*

I den besättning som kom att räknas som indexbesättning för PMWS i Sverige förekom en speciell form av grisuppfödning som innebar blandning av individer från ett stort antal besättningar samt upprepade omgrupperingar av djuren. Innan besättningen stängdes samlades ett begränsat antal sekventiella serumprover in som senare analyserades för förekomst av antikroppar mot PCV2 samt kvantifiering av mängden PCV2 DNA. Dessa parametrar ställdes i relation till djurens tillväxt och sjukdoms-registreringar. Denna retrospektiva analys av materialet visade att de djur som hade lägst halt av antikroppar mot PCV2 (Fig 1a) och stort antal PCV2 DNA-kopior i blodet (Fig 1b) var de djur som insjuknade i PMWS. Sjukdomsförloppet karaktäriserades av en mycket snabb avmagring.



Figur 1. Halten antikroppar mot PCV2 (a) och antalet PCV2 DNA kopior (b) i blodet från grisar under slaktsvinsperioden.

Iakttagelserna i denna studie (1), låg till grund för planeringen och provtagningar i påföljande studie (2) som utfördes i en slaktsvinsbesättning som drabbats av PMWS (Fig. 2: Herd A). Besättningen hörde till en suggpool och tillämpade ”all in / all out” principen. Som kontroll togs samma prover (serum för analys av antikroppar mot PCV2 och bestämning av antal PCV2 DNA kopior samt mätning av bröstomfånget som ett mått på tillväxt) vid samma tidpunkter i en liknande svensk slaktsvinsbesättning som tillhörde samma suggpool (Fig. 2: Herd B) samt i en norsk slaktsvinsbesättning. Vid denna tid ansågs Norge fortfarande vara fritt från PMWS.

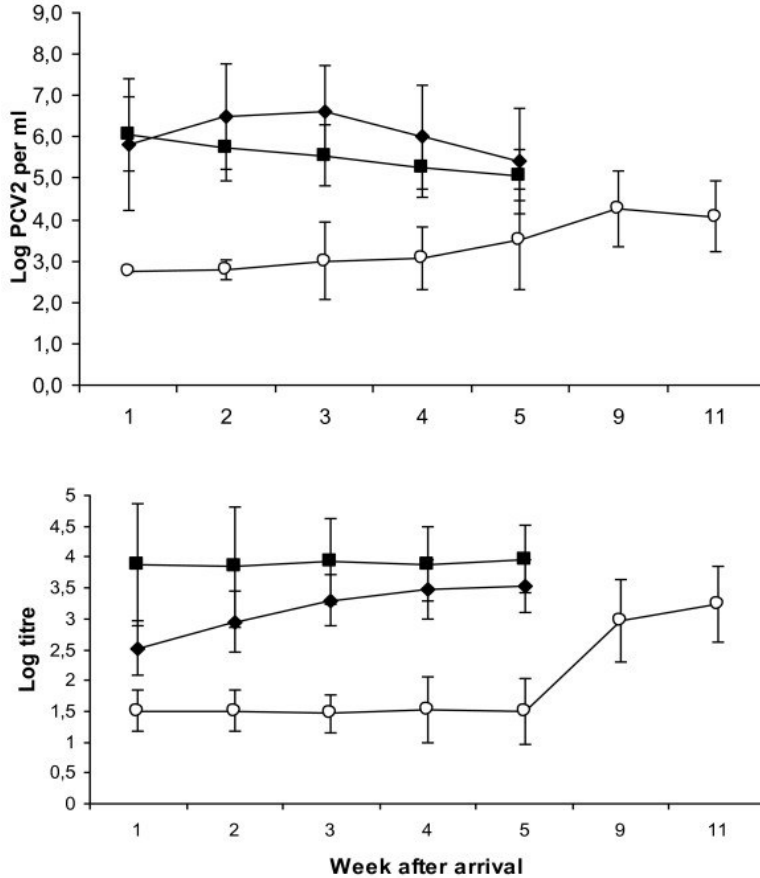


Figur 2. Flödet av djur till de två slaktsvinsbesättningarna A och B som deltog i studien.

Ett antal djur i besättning A utvecklade som förväntat PMWS. En drastisk hämning av tillväxten noterades hos dessa djur liksom en närmast total avsaknad av antikroppar mot PCV2 samtidigt som viruset förekom i riklig mängd i blodet.

Jämförelse mellan besättningarna visade på intressanta skillnader (Fig. 3). Mängden PCV2 DNA kopior låg på samma nivå i blodet hos de svenska grisarna en vecka efter insättning. I den svenska besättningen som drabbades av PMWS skedde en ökning av PCV2 medan halten sjönk kontinuerligt i blodet från de svenska grisarna som föddes upp i den PMWS-fria besättningen. Halten antikroppar i blodet skiljde sig väsentligt åt mellan djuren i de två besättningarna. Vid insättningen var den betydligt lägre i besättning A än i besättning B där antikroppshalten bibehölls på en jämn ganska hög nivå. En långsam ökning av antikroppshalten skedde i genomsnitt hos djuren i besättningen med PMWS men inte hos de djur som utvecklade sjukdomen.

I den norska besättningen sågs ett helt annat mönster, mängden PCV2 i serum var mycket lågt vid insättning och steg långsamt och djuren var seronegativa mot PCV2 under de sju första veckorna i slaktsvinsstallet. Provtagningen förlängdes därför i denna besättning och efter nio veckor i slaktsvinsstallet serokonverterade djuren mot PCV2.



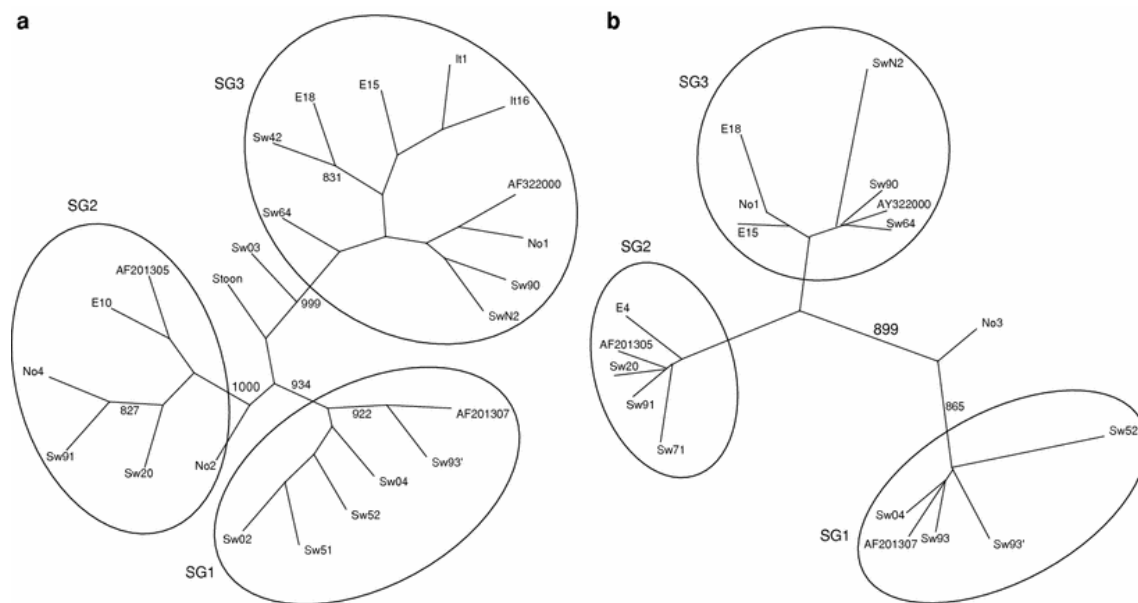
Figur 3. Halterna av PCV2 (log antal DNA kopior per ml blod) och antikroppar mot PCV2 (titer) i blod från grisar i de svenska besättningarna med PMWS (fylld romb) och utan PMWS (fylld fyrkant) och i den Norska beättningen utan PMWS (ofylld fyrkant).

Sammantaget visade alltså resultaten på att antikroppshalten mot PCV2 i relation till mängden PCV2 är viktig för skyddet mot PMWS. Resultaten från den norska besättningen visar också att åldern då djuren exponeras för PCV2 är av betydelse. För att få en uppfattning om "stress"-nivåerna i de olika besättningarna mättes kortisolhalten i saliv från ett antal djur men inga signifikanta skillnader i den parametern fanns mellan besättningarna. Vid noggrann genomgång av besättningsrutinerna observerades det att Besättning A ändrat sina inköpsrutiner under en period och i tillägg handlat från den öppna marknaden. Under denna period reducerades tom-tiden mellan olika omgångar kraftigt vilket sannolikt var en bidragande orsak till att besättningen drabbades av PMWS. Det noterades även att genogruppen av PCV2 var densamma i de två svenska besättningar medan det PCV2 som cirkulerade i den norska besättningen var av en annan genogrupp.

*Finns det ett samband mellan genogruppen av PCV2 och uppkomsten av PMWS?*

PCV2 är ett av de minsta virus som påvisats och genomet innehåller en mycket begränsad mängd genetisk information. Sekvensen hos den öppna läsramen (ORF2) i

virusgenomet som kodar för det strukturella kapsidproteinet bestämdes i material från grisar i svenska besättningar med eller utan PMWS (3). Genom att jämföra likheter och skillnader i nukleotidsekvenserna kunde vi urskilja tre genogrupper av PCV2 (SG1, SG2 och SG3). En liknande indelning i genogrupper framkom också när vi använde sekvensen hos en annan läsram (ORF3) i virusgenomet för jämförelse (Fig. 4).

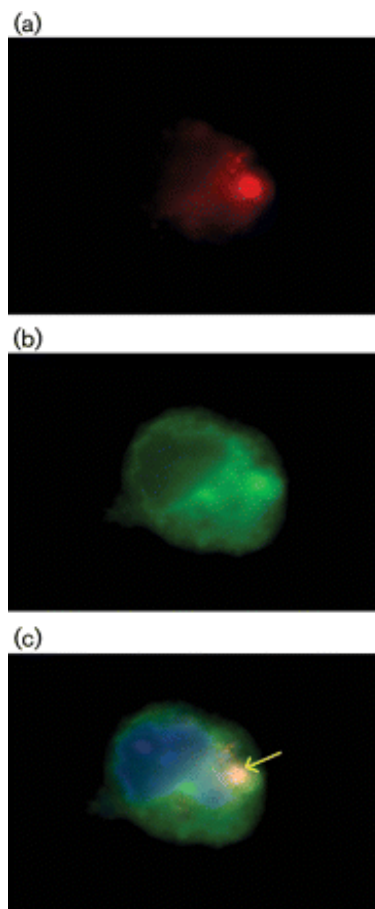


Figur 4. Fylogenetiska träd baserade på sekvensen för PCV2 ORF2 (a) och PCV2 ORF 3 (b) hos de tre svenska genogrupperna av PCV2; SG1, SG2 och SG3.

Indelningen av PCV2 i genogrupper var kontroversiell men liknande studier i andra länder påvisade även de distinkta skillnader och en gemensam internationell nomenklatur introducerades där SG1 och SG2 kom att hänföras till gruppen PCV2a och SG3 till gruppen PCV2b (4). Det är fortfarande kontroversiellt huruvida de olika genogrupperna skiljer sig åt i patogenisitet eller ej. Våra fältstudier i Sverige visar att SG3 (PCV2b) dominerar i de besättningar som drabbas av PMWS.

Det var också intressant att den norska besättningen som användes för jämförelse i studie 2 visade sig vara infekterad med PCV2a men att PCV2b är den genogrupp som dominerat i Norge efter att även norska grisbeättningar drabbats av PMWS. Studier på t. ex. Irland visar att det kan vara av betydelse om grisarna saminfekteras med PCV2a och PCV2b men att ordningen som grisarna exponeras för viruset kan vara avgörande (5). Denna frågeställning har fått extra tyngd eftersom de flesta kommersiella vaccin idag baseras på PCV2a medan PCV2b är klart dominerande i dagens besättningar (6). Eftersom PCV2's kapsidprotein anses vara det viktigaste antigenet i vaccin mot PMWS har de flesta sekvensanalyser utförts på ORF 2 regionen hos PCV2. Senare har dock mer intresse riktats mot ORF3. Studier i möss liksom ett fåtal studier i gris antyder att ORF3 kodar för ett protein som kan inducera apoptos "apoptin" och att detta bidrar till virusets patogenisitet.

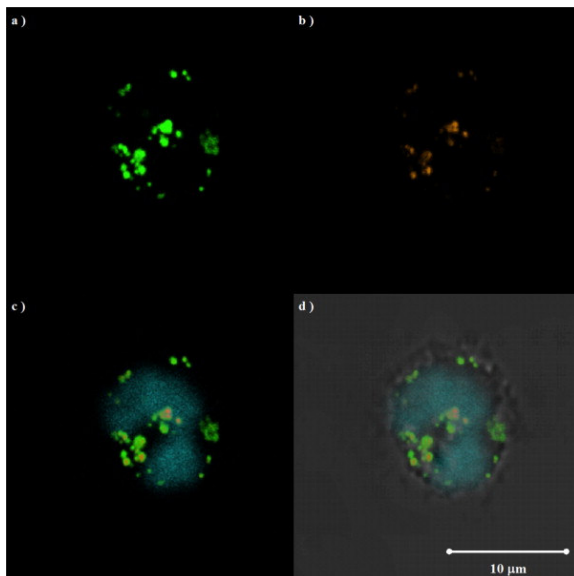
Betydelsen av skillnader i ORF3 är fortfarande oklar men med hjälp av dubbelfärgningsmetoder och konfokalmikroskopi (7) kunde vi påvisa att ORF3 interagerar med ett viktigt signaleringsprotein i cellerna, RGS16 (Fig. 5).



Figur 5. Lokalisering av RGS16 (a) och PCV2-ORF3 (b) i grislymfocyter som stimulerats med lipopolysackarid. Överlappande röd (RGS16) och grön (PCV2-ORF3) fluorescens ger en gul signal som indikerar samlokalisering, markerat med en pil (c).

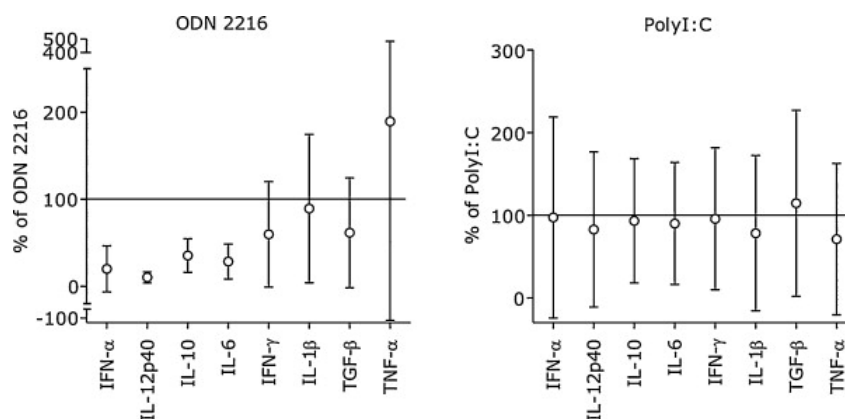
#### *Påverkar PCV2 den normala cellfunktionen?*

Det kan inte uteslutas att interaktioner mellan virusprotein och cellulära protein påverkar cellens normala funktion. Vi har i tidigare studier visat sekvenser i genomet hos PCV2 påverkar cellernas förmåga till produktion av interferon-alfa (IFN- $\alpha$ ). Studier av hur genomet från PCV2 påverkar den normala cytokinproduktionen hos grisens immunceller har till stor del utförts med hjälp av oligodesoxinukleotider (ODN) som representerar sekvenser från genomet hos PCV2 (ODNPCV2/1) samt en generell immunstimulatorisk sekvens, ODN2216. Genom att använda fluorokrommärkta ODN kunde vi med konfokalmikroskopi studera deras lokalisering i mononukleära celler som renats fram ur grisblod och inkuberats med ODNPCV2/1 och ODN2216, var för sig eller tillsammans. Med konfokalmikroskopi kunde konstaterats att ODNs togs upp i ett begränsat antal celler och efter fyra timmar var lokaliserades i cellernas cytoplasma, troligen i endosomer. ODN2216 påvisades i en större andel av cellerna än ODNPCV2/1, men med en tendens till samlokalisering av de två olika ODNs vilket antyder att ODNPCV2/1 tävlar med ODN2216 om att binda in till samma receptor för signalering in i cellen (Fig. 6).



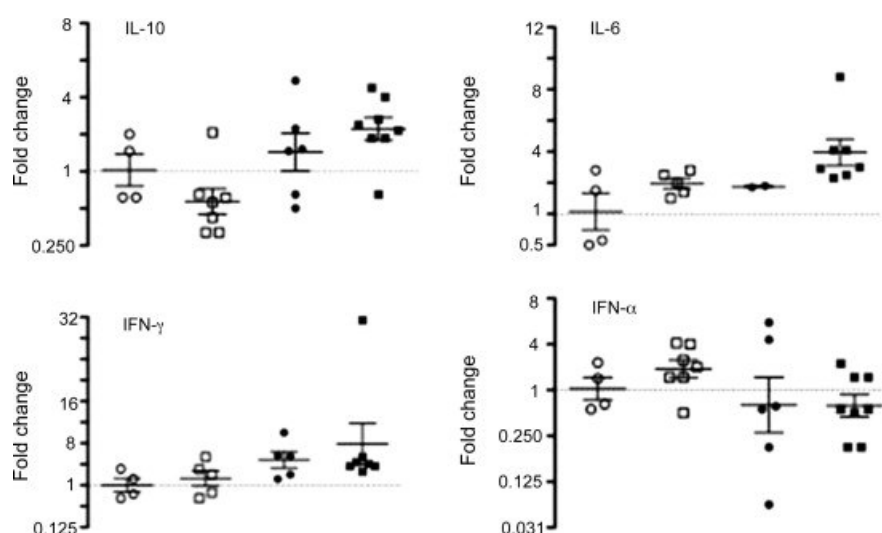
Figur 6. Konfokalmikroskopi som visar lokalisering av ODN2216 (grön) och ODNPCV2/1 (röd) i mononukleära celler från gris efter 4 timmar. Båda ODN återfinns i cellens cytoplasma (blå kärnfärgning) och samlokaliseras (gul) i vissa fall.

För att ytterligare studera inverkan av ODNPCV2/1 på induktionen av cytokinproduktion i porcina celler jämfördes hur cytokinproduktionen inducerad av syntetiskt DNA (ODN2216) respektive RNA (polyI:C) påverkades (Fig. 7). Närvaro av ODNPCV2/1 hade ingen effekt på cytokinproduktionen inducerad av polyI:C men hämmade inte bara uttrycket av genen för IFN- $\alpha$  utan även uttrycket av generna för IL12p40, IL-6 och IL-10 när cellerna inducerats med ODN2216. Sammantaget tyder fynden i studie (8) på att genomiskt DNA från PCV2 kan påverka grisens förmåga till cytokinproduktion och att det framförallt är en cytokinprofil som induceras av immunstimulatorisk DNA via interaktion med TLR9 som hämmas.



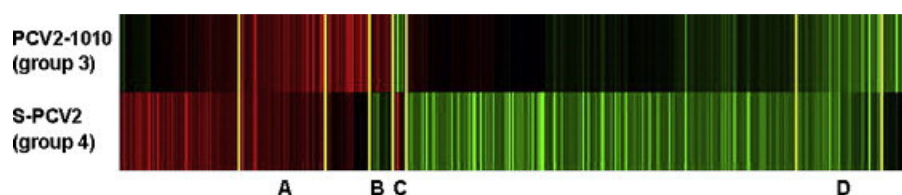
Figur 7. Inverkan av ODNPCV2/1 på uttrycket av cytokingener inducerat av ODN2216 respektive polyI:C.

I en studie (9) som bland annat syftade till att studera uttrycket av cytokingener i tarmen hos grisar med diarré fann vi att grisar med påvisbart PCV2 DNA i tarmslemhinnan hade ett förhöjt uttryck av genen för IFN- $\gamma$ . En inverkan av PCV2 på cytokinuttryck i tarmen påvisades också med qPCR analys av arkiverat material från grisar i en experimentell studie av PCV2/PMWS. I denna studie användes dels det kanadensiska PCV2 isolatet "PCV2 1010", dels det första svenska isolatet av PCV2 från Hagalund (S-PCV2) för att i saminfektion med porcint parvovirus (PPV) framkalla PMWS. Som kontroll användes tarm från grisar som enbart infekterats med PPV och tam från oinfekterade grisar. Vid försökets avslutning, cirka 4 veckor efter infektion kunde inte PPV påvisas längre i tarmen medan DNA från PCV2 påvisades med qPCR. Generellt sett påvisades mer mRNA för IL-10, IL-6 och IFN- $\gamma$  hos PCV2 infekterade grisar medan förhållandet mRNA för IFN- $\alpha$  var lägre hos dessa djur än hos de som endast infekterats med PPV eller var oinfekterade (Fig. 8). För en rad övriga analyserade cytokiner sågs ingen skillnad och ingen tydlig skillnad beroende på vilket isolat av PCV2 som använts för infektion framgick.



Figur 8. Uttryck av generna för IL-10, IL-6, IFN- $\gamma$  och IFN- $\alpha$  i tarmmaterial från grisar experimentellt infekterade med S-PCV2 och PPV (fyllda cirklar), PCV2-1010 och PPV (fyllda fyrkanter), PPV enbart (öppna fyrkanter) eller oinfekterade (öppna cirklar). Uttrycket av generna är beräknat i förhållande till det hos grisar endast infekterade med PPV (fold change).

I samma studie (10) utfördes även en metagenomisk studie av det totala genuttrycket i tarm från de experimentellt infekterade grisarna. Heat-map analysen (Fig. 9) demonstrerade en klar skillnad i vilka gener som upp- och ned reglerats i tarm hos grisar infekterade med två olika isolat av PCV2, representerande två olika genogrupper.



Figur 9. Heat-map illustration av upp (grön) och ned (röd) reglering av gener i tarm från grisar som experimentellt infekterats med PCV2-1010 eller S-PCV2.

## Diskussion

Under den tid som våra studier av PCV2 spånt över har PMWS övegått från att vara en exotisk till en endemisk sjukdom i Sverige. Spridningen av PMWS sker jämförelsevis långsamt och med en förhållandevis låg insjuknandegrad. Bland de djur som drabbas kan dock dödligheten vara hög. Våra fältstudier visar att besättningsrutinerna kan ha en stor inverka på uppkomsten av PMWS men att det är relativt oförutsägbart vilka djur som insjuknar i en drabbad besättning, vilket har bidragit till alla frågetecken kring PMWS och dess ursprung. Det är i dag utom allt tvivel att PCV2 är den infektiösa orsaken till sjukdomen och alla genogrupper av PCV2 tycks kunna ge upphov till sjukdom tillsammans med "rätt" kostimulator. Däremot tycks en viss genogrupp dominera i början av nya utbrott. Våra in vitro studier visar klart på en immunmodulerande förmåga hos viruset vilket även styrks av de transkriptionella studierna och analyserna av "cytokinprofiler" i tarm från grisar som infekterats experimentellt med olika genogrupper av PCV2. Våra fältstudier visar på liknande sätt som i andra länder att antikroppar (neutraliserande) mot PCV2 är viktiga i skyddet mot PMWS. Dessa fynd stämmer också väl med den skyddande effekten som vaccination mot PCV2 har mot PMWS. I Sverige, liksom i övriga värden får man därför anse att cirkeln PCV2/PMWS är bruten.

## Publikationer

- (1). **Wallgren P**, Brunborg IM, Blomqvist G, Bergström G, Wikström F, Allan G, **Fossum C**, Jonassen CM. 2009. The index herd with PMWS in Sweden: presence of serum amyloid A, circovirus 2 viral load and antibody levels in healthy and PMWS-affected pigs. *Acta Vet Scand.* 51:13.
- (2). Brunborg IM, **Fossum C**, Lium B, Blomqvist G, Merlot E, Jørgensen A, Eliasson-Selling L, Rimstad E, Jonassen CM, **Wallgren P**. 2010. Dynamics of serum antibodies to and load of porcine circovirus type 2 (PCV2) in pigs in three finishing herds, affected or not by postweaning multisystemic wasting syndrome. *Acta Vet Scand.* 52: 22.
- (3). Timmusk S, **Wallgren P**, Brunborg IM, Wikström FH, Allan G, Meehan B, McMenamy M, McNeilly F, Fuxler L, Belák K, Pödersoo D, Saar T, Berg M, **Fossum C**. 2008. Phylogenetic analysis of porcine circovirus type 2 (PCV2) pre- and post-epizootic postweaning multisystemic wasting syndrome (PMWS). *Virus Genes.* 36: 509-20.
- (4). Segalés J, Olvera A, Grau-Roma L, Charreyre C, Nauwynck H, Larsen L, Dupont K, McCullough K, Ellis J, Krakowka S, Mankertz A, Fredholm M, **Fossum C**, Timmusk S, Stockhofe-Zurwieden N, Beattie V, Armstrong D, Grassland B, Baekbo P, Allan G. 2008. PCV-2 genotype definition and nomenclature. *Vet Rec.* 162: 867-8.
- (5). Allan GM, McNeilly F, McMenamy M, McNair I, Krakowka SG, Timmusk S, Walls D, Donnelly M, Minahin D, Ellis J, **Wallgren P**, **Fossum C**. 2007. Temporal distribution of porcine circovirus 2 genogroups recovered from postweaning multisystemic wasting syndrome affected and nonaffected farms in Ireland and Northern Ireland. *J Vet Diagn Invest.* 19: 668-73.
- (6). Kekarainen T, McCullough K, Fort M, **Fossum C**, Segalés J, Allan GM. 2010. Immune responses and vaccine-induced immunity against Porcine circovirus type 2. *Vet Immunol Immunopathol.* 136:185-93.
- (7). Timmusk S, Merlot E, Lövgren T, Järvekülg L, Berg M, **Fossum C**. 2009. Regulator of G protein signalling 16 is a target for a porcine circovirus type 2 protein. *J Gen Virol.* 90: 2425-36.



- (8). Wikström FH, **Fossum C**, Fuxler L, Kruse R, Lövgren T. 2011. Cytokine induction by immunostimulatory DNA in porcine PBMC is impaired by a hairpin forming sequence motif from the genome of Porcine Circovirus type 2 (PCV2). *Vet Immunol Immunopathol.* 139: 156-66.
- (9). Jacobson M, Andersson M, Lindberg R, **Fossum C**, Jensen-Waern M. 2011. Microarray and cytokine analyses of field cases of pigs with diarrhoea. *Vet Microbiol* 153: 307-14.
- (10). Andersson M, Ahlberg V, Jensen-Waern M, **Fossum C**. 2011. Intestinal gene expression in pigs experimentally co-infected with PCV2 and PPV. *Vet Immunol Immunopathol.* 142: 72-80.
- (11). **Fossum, C**. Porcine circovirus type 2 – success and failure. Plenarföreläsning 21st International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Vancouver, Canada. July 18-21, 2010.

### **Övrig resultatförmedling till näringen**

De utförda studierna har till en övervägande del styrts av hur problematiken PCV2/PMWS utvecklats i Sverige och har därför byggt på en kontinuerlig kommunikation med djurägare, besättningsveterinärer och veterinärer inom Svenska Djurhälsovården. De vetenskapliga publikationer har också varit av sådan kvalitet och nyhetsvärde att våra resultat presenterades som plenarföreläsning vid 21st International Pig Veterinary Society Congress (IPVS), Vancouver, Canada. July 18-21, 2010 (11).