

Belgium Biosafety Dossier
LABORATORIOS HIPRA, S.A.

INFORMATION POUR LE PUBLIC

-FRANÇAIS-

LABORATORIOS HIPRA, S.A.

Information pour le public

Évaluation de la sécurité et de l'efficacité d'un vaccin vivant dans le contrôle de la pleuropneumonie porcine causée par l'*Actinobacillus pleuropneumoniae*

Numéro de notification européen

B/BE/11/V3

La dissémination d'organismes génétiquement modifiés (OGM) dans l'environnement est strictement réglementée au niveau européen par la Directive 2001/18/CE et au niveau de la Belgique par un Décret Royal du 21 Février 2005 "réglementant la dissémination volontaire et / ou la commercialisation des OGM ou des produits qui contiennent des OGM dans l'environnement".

Pour garantir l'utilisation sûre des OGM, les dispositions du Décret Royal mentionnées ci-dessus stipulent que la dissémination des OGM à des fins expérimentales est interdite sans le consentement préalable du ministre compétent. La décision est fondée sur une évaluation approfondie de la Biosécurité de la dissémination planifiée, qui est dirigée par le Conseil Consultatif de Biosécurité, composé de différents Comités Scientifiques regroupant des experts indépendants des Universités belges et instituts gouvernementaux.

Afin d'acquiescer l'autorisation nécessaire du Ministre compétent, la Société LABORATORIOS HIPRA, S.A. a soumis un dossier de demande à l'autorité compétente. Sur la base de l'avis du Conseil de la biosécurité, le ministre compétent pourrait accorder une autorisation à la société de LABORATORIOS HIPRA, S.A. de mener des expériences avec des vaccins vivants génétiquement modifiés *Actinobacillus pleuropneumoniae* tel qu'il est stipulé dans la demande d'attente.

La dissémination aura lieu à de différents endroits en Flandre. Il est prévu de commencer dans 3 mois à compter du moment de l'autorisation pour la dissémination.

TABLE DE MATIÈRES

| | |
|---|----|
| TABLE DES MATIÈRES | 3 |
| INFORMATION GÉNÉRALE | 4 |
| <i>Description du micro-organisme génétiquement modifiés(MGM)</i> | 4 |
| <i>Type et but de l'essai envisagée</i> | 4 |
| RECHERCHE / DÉVELOPPEMENT DES ACTIVITÉS | 5 |
| <i>Activités de développement précédentes:</i> | 5 |
| <i>Sécurité des animaux cibles</i> | 5 |
| a) <u>Administration d'une surdose, d'une dose unique, d'une dose répétée, et la propagation de la souche du vaccin vivant PB-116 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i></u> .. | 5 |
| b) <u>Dissémination de la souche d'<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> HP-3276 chez les animaux vaccinés après l'administration par voie intramusculaire</u> | 5 |
| c) <u>Dissémination des souches HP-3276 d'<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> chez les animaux vaccinés après l'administration intranasale</u> | 6 |
| d) <u>Etude de la réversion à la virulence de la souche vaccinale <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> HP-3276</u> | 7 |
| <i>Évaluation de l'efficacité en conditions de laboratoire</i> | 8 |
| <i>Connaissances et expérience obtenus comme résultat des activités de développement précédents</i> | 9 |
| <i>Activités futures</i> | 9 |
| AVANTAGES | 10 |
| RISQUES | 11 |
| CONFINEMENT, CONTRÔLE ET MESURES DE CONTRÔLE | 13 |
| <i>Contrôle des MGM et propagation des gènes</i> | 13 |
| <i>Stabilité génétique des MGM</i> | 13 |
| <i>Destruction des matériaux contenant des MGM</i> | 14 |
| <i>Exigences de formation</i> | 14 |
| <i>Situations d'urgence</i> | 15 |
| <i>Autre confinement, contrôle et mesures de contrôle</i> | 15 |
| <i>Responsabilités de la notice</i> | 15 |
| <i>Inspection par les autorités publiques</i> | 16 |
| <i>Rapport des activités</i> | 16 |
| RÉFÉRENCES | 17 |
| CONTACTE | 24 |

INFORMATION GÉNÉRALE

Description du micro-organisme génétiquement modifié (MGM)

La souche HP-3276 inclus dans le vaccin PB-116 est une souche de l'*Actinobacillus pleuropneumoniae* vivant modifié. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (ci-après "App") est une bactérie Gram-négative qui provoque la pleuropneumonie porcine, une maladie infectieuse répandue dans le monde, responsable d'importantes pertes économiques dans l'industrie porcine.

La souche HP-3276 est caractérisée par une modification de séquences génomiques spécifiques correspondant à des facteurs de virulence de l'App. Cela a des conséquences dans une souche App avec une toxicité réduite alors que sa capacité immunoprotective reste sans changements. La souche HP-3276 n'a pas d'activités pathogènes et constitue une souche atténuée par rapport aux propriétés pathogènes de la souche mère. Il convient donc de développer un vaccin vivant atténué contre la péripneumonie porcine.

Le vaccin PB-116 est destiné à être utilisé chez les porcs de huit semaines d'âge et le programme de vaccination comprend une deuxième dose qui doit être administrée 3 semaines plus tard.

Type et but de l'essai envisagé

Une fois l'innocuité et l'efficacité du vaccin confirmée chez les porcs dans des conditions de laboratoire, le but de l'étude est d'évaluer l'innocuité et l'efficacité du vaccin sur le terrain, comme il est requis par la législation de l'UE. Ce sera une étude multicentrique où les porcs provenant de plusieurs fermes de Flandre seront vaccinés par voie intramusculaire avec le vaccin d'essai selon le programme de vaccination qui doit être proposé pour le produit. Outre la vaccination des porcs avec PB-116, chaque ferme aura un groupe de contrôle des porcs non vaccinés.

Les fermes où des foyers pneumoniques causés par *Actinobacillus pleuropneumoniae* ont eu lieu ont été sélectionnées avant l'étude.

Les paramètres de sécurité comme des réactions générales ou des événements indésirables seront surveillés après chaque vaccination et pendant toute l'étude. Les réactions locales seront également évaluées à de différents moments pendant l'étude. L'efficacité sera principalement mise au point sur les signes cliniques et la mortalité. L'essai clinique sera surveillé par les vétérinaires.

RECHERCHE / DEVELOPPEMENT DES ACTIVITÉS

Activités de développement précédent:

La sécurité des animaux cibles

La sécurité du vaccin a été confirmée par plusieurs études de laboratoire, où une surdose, l'administration de doses répétées, la propagation de la souche vaccinale de porcs vaccinés à non vaccinés et le retour à la virulence ont été évalués.

a) Administration d'une surdose, d'une dose unique, d'une dose répétée, et la propagation de la souche du vaccin vivant PB-116 *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Les objectifs de cette étude consistaient en l'évaluation de l'innocuité de l'administration d'une surdose, une dose unique et une dose répétée de vaccin PB-116, ainsi qu'en l'évaluation de sa transmission des animaux vaccinés à non vaccinés.

Un groupe de porcs a été d'abord vacciné d'une surdose de vaccin suivie par d'autres 2 vaccinations à dose unique. Un autre groupe a été vacciné avec le programme de vaccination de base (2 doses séparées par trois semaines).

Les résultats obtenus ont montré une augmentation transitoire de la température rectale qui peut survenir après la vaccination. Dans la plupart des cas, cette augmentation de la température est inférieure à 1.5 ° C et il est toujours spontanément résolues en 24 heures. Par ailleurs, il n'y avait pas de signes cliniques liés à la vaccination des porcs utilisés. Ces résultats confirment la sécurité du PB-116, même si une surdose et une dose répétée sont administrées.

Les résultats ont également confirmé que la souche vaccinale ne se propage pas des animaux vaccinés à non vaccinés.

b) Dissémination de la souche HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* chez les animaux vaccinés après l'administration par voie intramusculaire.

Dans cette étude, la distribution de la souche vaccinale HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* chez des animaux vaccinés par voie intramusculaire a été évaluée.

Pour l'étude, vingt-huit porcs âgés de 8 semaines du minimum recommandé dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (8 semaines) ont été utilisés. Tous les animaux ont reçu une dose de vaccin par voie intramusculaire. Après la vaccination, la dissémination de la souche vaccinale App HP-3276 a été analysée dans le corps des animaux à des intervalles prédéterminés. De différents échantillons de tissus ont été testés afin de déterminer si la souche vaccinale était présente. Les échantillons de sécrétions du corps ont également été analysés dans le même but.

A partir des résultats présentés dans cette étude, on peut conclure que la dissémination de la souche vaccinale HP-3276 est très pauvre et est située juste dans les amygdales et les ganglions point d'inoculation pendant la quatrième semaine après la vaccination. Par conséquent, la souche vaccinale a été détectée seulement dans quelques échantillons, avec une incidence si faible, que la diffusion de la souche vaccinale HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, après son administration par voie intramusculaire, est considérée comme presque négligeable.

c) Dissémination des souches HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* chez les animaux vaccinés après l'administration intranasale.

Cette étude a été réalisée afin d'évaluer la distribution de la souche vaccinale HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* chez les porcs vaccinés après l'administration par voie intranasale, ainsi que d'obtenir des échantillons de tissu des animaux vaccinés comme des échantillons de premier passage pour être utilisés dans le test de réversion à la virulence.

La voie intranasale a été évaluée puisque c'est le moyen naturel par lequel ce micro-organisme peut entrer dans le corps, et il serait donc la voie la plus susceptible de conduire à la réversion à la virulence.

Pour l'étude, les porcs de 5 groupes âgés de 16 semaines ont été vaccinés avec la souche mère de la souche vaccinale App HP-3276. Tous les animaux ont reçu une surdose de 10.

L'objectif de la première partie de cette étude était d'évaluer la période la plus probable et les organes à partir desquels la souche vaccinale pourrait être récupérée après l'administration par voie intranasale.

Dans ce but, l'autopsie des animaux et la collecte de l'échantillon ont été effectués à des intervalles prédéterminés.

De plus, des signes cliniques généraux et la température du corps ont été enregistrés avant la vaccination, 4 heures plus tard et tous les jours pendant la période du temps étudiée afin d'évaluer l'innocuité de la souche vaccinale.

Aucun signe clinique pertinent n'a été observé pendant la période d'étude, bien que l'un des animaux du groupe 1 ait eu de la fièvre et une légère dyspnée quatre heures après la vaccination. Bien que la symptomatologie n'ait plus été observée chez cet animal un jour après de la vaccination il a été euthanasié, et il a été confirmé qu'aucune des lésions App n'ont été observées à l'autopsie.

Concernant la dissémination de la souche vaccinale, les résultats obtenus dans cette étude sont en accord avec ceux obtenus dans une étude précédente puisque, dans les deux cas, soit par voie intranasale ou intramusculaire, la diffusion de la souche vaccinale était très pauvre.

En ce qui concerne l'autre objectif de cette étude, trois échantillons positifs à la souche HP-3276 ont été obtenus, et qui ont été en outre utilisés pour continuer avec l'étude de la réversion à la virulence.

Par ailleurs, les résultats obtenus nous permettent de conclure que la souche du vaccin, lorsqu'elle est administrée par voie intranasale, peut être récupérée à partir d'amygdales, glandes salivaires et nasales pour une période qui ne dépasse pas trois jours de la vaccination. Cette information a été prise en compte lors de la conception de l'étude sur la réversion à la virulence.

d) Etude de la réversion à la virulence de la souche vaccinale HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*.

L'objectif de cette étude a été d'examiner le potentiel de la réversion ou de l'augmentation de la virulence de la souche vaccinale App HP-3276, après plusieurs passages chez les animaux cibles.

Trois animaux par groupe ont été utilisés dans cette étude. Seulement quatre groupes ont été nécessaires depuis que la souche vaccinale n'ait pas été encore retrouvée. Les animaux utilisés étaient de l'âge minimum recommandé dans le Résumé des Caractéristiques du Produit (8 semaines). La souche vaccinale récupérée de l'étude précédente a été utilisée. Néanmoins, le premier passage avait été obtenu à partir des échantillons d'animaux vaccinés d'une surdose de 10 de la graine de maître par voie intranasale.

Dans les passages suivants les vaccinations devraient être effectuées par voie intranasale et les échantillons de frottis des amygdales, glandes salivaires et nasales devraient être tirés de ces organes 1 à 3 jours après la vaccination. La nécropsie devrait être effectuée 3 jours après la vaccination et des échantillons de tissus également être prises.

La présence de la souche vaccinale dans le nez, les glandes salivaires (salive) et des échantillons d'amygdale a été analysée par l'ensemencement des échantillons écouvillon dans des plaques de milieu différents, suivie par la conception PCR afin d'identifier la souche vaccinale.

En cas de reprise, les matériaux récupérés après chaque passage devaient être utilisés comme inoculum pour le passage suivant et ont également été administré par voie intranasale.

Les passages devraient être entrepris à mesure que la souche vaccinale ait été isolée. Quand il n'y avait pas de reprise, une confirmation devrait être effectuée par l'administration du dernier passage récupéré à 11 animaux.

De plus, en général des signes cliniques et la température du corps devrait être enregistré avant chaque vaccination, 4 heures plus tard et tous les jours pendant la période de temps étudiée afin d'évaluer l'innocuité de la souche vaccinale. Les lésions pulmonaires ont été évaluées chez tous les animaux à l'autopsie.

La souche vaccinale n'a pas pu être récupérée après l'inoculation du premier passage pour les animaux du groupe B3, de sorte que le test ait été répété avec 11 animaux (groupe B11). L'expérience a été considérée comme achevée à ce stade puisque le même résultat a été obtenu après l'inoculation du premier passage dans le groupe B11. Les résultats obtenus montrent que, dans aucun des animaux des deux groupes (B3 et B11) ni fièvre ni des symptômes cliniques n'ont pas été observés après l'administration du passage 1 récupéré. Par ailleurs, aucune lésion App atypiques n'ait été observée dans les poumons de tous les animaux d'un groupe quelconque.

En outre, l'impossibilité de récupérer la souche vaccinale des organes testés ou des liquides du corps des animaux inoculés avec le premier passage indique que la transmission de la souche vaccinale des animaux vaccinés aux non vaccinés est limitée et la probabilité d'une réversion à la virulence est considérée comme nulle. L'ensemble des résultats concernant la température rectale, les signes cliniques, examens pulmonaires et la récupération de la souche vaccinale obtenue chez les animaux inoculés avec le premier passage nous permettent de confirmer que la souche vaccinale HP-3276 ne montre pas d'augmentation ou de réversion à la virulence.

Évaluation de l'efficacité en conditions de laboratoire

A ce jour, le test de laboratoire suivant a été effectué sur l'efficacité du PB-116.

Étude sur l'efficacité du vaccin de bactéries vivants PB-116 contre l'infection par *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 2.

L'objectif de cette étude a été de démontrer l'efficacité du schéma vaccinal du vaccin PB-116 contre la péripneumonie causée par *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 2. Un total de 30 porcs âgés de 8 semaines a été utilisé.

La moitié des animaux ont été vaccinés par voie intramusculaire selon le calendrier de vaccination. A l'autre groupe de 15 animaux, lui a été administré PBS stérile, et conservés comme control. Après chaque vaccination, les porcs ont été observés pendant 21 jours.

Trois semaines après la dernière vaccination, tous les porcs ont été contestées par voie intranasale d'une quantité appropriée d'une souche d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 2, virulence suffisante pour produire des signes typiques de la maladie.

Après l'épreuve, les animaux ont été observés pendant 7 jours et, en général des signes cliniques ont été enregistrés quotidiennement. Les animaux gravement malades ont été sacrifiés pour éviter des souffrances inutiles. A la fin de la période d'observation, tous les animaux survivants ont été euthanasiés et un examen des poumons post-mortem a été effectué.

Les paramètres pour évaluer l'efficacité du vaccin consistaient en réduction des lésions pulmonaires, des signes cliniques et de mortalité dans le groupe vacciné par rapport au groupe non vacciné.

Concernant les données de sécurité obtenues à partir de cette étude, comme précédemment observés dans les essais de sécurité, une légère augmentation de la température rectale peut être observée après la vaccination, mais ces hausses transitoires sont toujours spontanément résolues en 24 heures sans traitement. Par ailleurs, l'administration de deux doses de vaccin PB-116 a seulement causé une légère inflammation à l'endroit d'inoculation chez très peu d'animaux, qui ont disparu en 24 heures. En ce qui concerne les réactions systémiques, certains animaux ont montré une légère prostration entre 4 et 6 heures après la vaccination, qui n'était plus observée 24 heures après l'administration du PB-116.

Les signes cliniques après épreuve étaient clairement plus doux chez les animaux vaccinés, en comparaison avec le groupe de contrôle, dans laquelle tous les animaux ont été clairement affectés. La même tendance a été observée en ce qui concerne des lésions du poumon à l'examen post-mortem. Par ailleurs, la mortalité ne s'est produite que dans le groupe non vacciné.

Par conséquent, le groupe vacciné était significativement différent du groupe non vacciné en termes de mortalité, de l'incidence des lésions pulmonaires et le score. Ces résultats démontrent l'effet protecteur du vaccin PB-116 contre la pleuropneumonie porcine causée par *Actinobacillus pleuropneumoniae* sérotype 2.

Connaissance et expérience acquises dans des activités de développement précédente

La souche HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* a été utilisée dans des conditions confinées à des études pour évaluer son efficacité et l'innocuité comme un vaccin pour les porcs. Les résultats de ces expériences sont résumés dans les sections précédentes. En bref, on a constaté que la souche modifiée est capable de protéger contre les infections virulentes *Actinobacillus pleuropneumoniae*, alors qu'a été confirmée la sécurité d'une surdose et de l'administration réitérée d'une dose unique du vaccin, une capacité très limitée pour la transmission de la souche du vaccin vivant des animaux vaccinés à non vaccinés, une distribution très faible de la souche chez les animaux vaccinés et que la souche vaccinale ne revient pas à la virulence.

Les activités futures

L'épreuve planifiée implique la dissémination volontaire de la souche vaccinale par inoculation intramusculaire des porcs d'engraissement de plusieurs fermes, plus précisément dans les bâtiments avec des moyens appropriés de l'isolement. La voie intramusculaire est la forme habituelle de la vaccination des porcs. C'est également la méthode utilisée dans les essais contrôlés en laboratoire (essais d'efficacité et de sécurité décrits ci-dessus.)

Le but de la dissémination volontaire est de confirmer l'innocuité (absence d'effets secondaires indésirables) et de l'efficacité (protection des animaux vaccinés contre la péripneumonie porcine) de la souche HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* (voir le protocole détaillé dans le Protocole d'Essai Clinique, référence CD-2008-CB-003).

Cette étude est une étape supplémentaire dans le développement de ce vaccin. Enfin, lorsque toutes les données sont compilées, l'autorisation de commercialisation du vaccin sera appliquée aux autorités européennes.

AVANTAGES

De différentes approches ont été rejetées lors du développement du produit PB-116 jusqu'à obtenir un vaccin vivant qui lui confère, avec succès, la réponse requise immunoprotective contre l'infection, avec un minimum d'effets indésirables. Comme a été démontré par les données disponibles sur l'efficacité, l'administration du vaccin selon les instructions d'utilisation recommandées permet une réduction significative des signes cliniques, les lésions pulmonaires et la mortalité chez les porcs vaccinés.

RISQUES

Trois aspects doivent être analysés lors de l'évaluation du risque de l'utilisation d'une vaccine.

Impact de l'utilisation de PB-116 dans l'environnement.

Dans le cas de l'utilisation irrégulière du vaccin PB-116, le seul ingrédient qui pourrait poser des problèmes de l'environnement serait le composant actif du vaccin, la souche HP-3276 d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*. Cependant, la possibilité d'une exposition environnementale de l'ingrédient actif est négligeable en prenant en compte les facteurs suivants:

A – La voie d'administration intramusculaire recommandée empêche la propagation de ce vaccin immédiatement après l'administration, qui ne se produit pas avec d'autres voies d'administration telle la voie intranasale ou par pulvérisation, ce qui peut mettre au risque d'autres espèces animales en raison de sa propagation inévitable.

B - En raison de la faible persistance de la souche HP-3276 chez les animaux vaccinés, elle peut être isolée que très rarement des animaux vaccinés. Ainsi, la propagation par la voie intramusculaire peut être considéré comme pratiquement nul.

C - Bien que la souche du vaccin puisse persister pendant quelques jours dans les porcs vaccinés, il n'y a aucune possibilité de transmission à d'autres porcs en contact avec l'antérieur, car il ne s'est pas propagé aux porcs non vaccinés (sentinelles) en contact avec les porcs vaccinés. Cela indique que, si l'inoculation est faite correctement, il ne peut qu'il ait aucune diffusion de l'antigène à l'environnement. Enfin, le risque de la transmission à d'autres espèces animales est également très faible à mesure que le vaccin soit utilisé conformément aux recommandations contenues dans le Résumé des Caractéristiques du Produit.

Possibilité que la souche vaccinale HP-3276 intervienne dans la pathogenèse d'autres maladies chez les animaux et chez l'homme.

Le vaccin PB-116 ne devrait poser aucun problème chez des espèces autres que l'espèce cible aussi longtemps que les instructions de la notice accompagnant les récipients soit suivies et, comme il a été mentionné ci-dessus, la seule possibilité de la transmission se réalise par l'inoculation accidentelle.

En cas de rejet accidentel de la souche vaccinale HP-3276 dans l'environnement, il serait nécessaire de discuter de la possibilité de savoir si cette souche provoque la maladie chez d'autres espèces animales et chez l'homme.

Il n'existe pas de possibilités que la souche soit impliquée dans la pathogénèse de maladie chez l'homme. Il est considéré que l'homme n'est pas sensible à l'infection par *Actinobacillus pleuropneumoniae*. L'infection n'a pas été démontrée, ni par l'isolement du virus ni par la sérologie dans les cas suspects. En bref, à ce jour, il n'a pas été démontré que les êtres humains puissent être un hôte pour *Actinobacillus pleuropneumoniae*, et donc, la souche HP-3276 utilisée dans la préparation du PB-116 ne serait pas pathogène pour l'homme.

Quant à la possibilité que le virus vaccinal soit impliqué dans la pathogénèse des maladies animales, bien que l'organisme soit distribué sur les cinq continents, le nombre d'hôtes est limité : aucune séroconversion n'ait été démontrée chez toutes les espèces sauvages et les signes cliniques de la maladie n'ont été observés que chez les porcs. Par conséquent, il n'est pas prévu que la souche HP-3276 soit la cause de symptômes cliniques chez les animaux autres que le porc.

D'autre part, l'exposition des autres espèces par des moyens autres que l'utilisation de seringues contaminées est très peu probable, puisque la souche vaccinale ne se propage pas.

CONFINEMENT, CONTRÔLE ET MESURES DE CONTRÔLE

Contrôle des MGM et la propagation de gènes

A partir des données des études réalisées, on peut affirmer que la possibilité de dissémination de la souche vaccinale HP-3276 dans l'environnement est négligeable, à condition que la personne qui administre le vaccin suive les instructions et les précautions mentionnées dans la notice accompagnant les récipients, et même dans les cas d'exposition accidentelle, la propagation à l'environnement serait très peu probable car la souche ne se propage pas.

Stabilité génétique des MGM

La stabilité génétique de la souche HP-3276 a été testée suite à 5 repiquages effectués en série dans un milieu spécifique et l'extraction de la génomique à chaque passage. La technique de PCR différentielle a été utilisée ensuite pour détecter s'il y avait un retour vers le génotype original dans l'un des passages.

L'identification du génome recombinant est faite par une réaction PCR qui amplifie un fragment de la version mutante de l'un des gènes présents dans la souche modifiée. Tous les passages montrent l'amplification d'un fragment qui correspond au fragment de la version mutante du gène présent dans la souche modifiée, démontrant ainsi la stabilité génétique de la même.

Par ailleurs, l'identification de la souche vaccinale après le premier passage effectué dans l'étude de la réversion à la virulence, a aussi confirmé la stabilité génétique de la souche vaccinale.

La recombinaison génomique est un phénomène qui peut se produire spontanément dans la nature et peut se produire à la fois entre les souches virulentes de terrain, et entre les souches de terrain et les souches vaccinales. Bien qu'il ait été présenté que dans des conditions naturelles de l'élevage de porcs, la recombinaison entre les souches virales peut se produire, en aucun cas la recombinaison génétique spontanée entre bactéries ou entre bactéries et virus a été démontrée.

Quant à la souche qui nous concerne, la recombinaison avec d'autres souches n'est pas prévu en raison de la courte persistance de la souche chez les porcs vaccinés et l'impossibilité d'être isolé à partir du premier passage effectué.

Toutefois, en cas où la recombinaison génétique spontanée entre deux souches bactériennes s'était produite, il serait essentiel que le tissu cible même ait été infecté simultanément par deux souches différentes, indépendamment du fait que ces souches soient atténuées ou virulentes.

Pendant la vaccination avec une souche vaccinale, il est impossible de dire si un animal a été préalablement infecté de façon latente avec une souche virulente. Pour ce faire, il serait nécessaire que tous les porcs d'une même ferme reçussent des traitements immunosuppresseurs pendant un certain temps, même si, dans la plupart des cas, il ne serait pas possible de les détecter. Par conséquent, il y a toujours le risque de vacciner un porc qui a une infection latente, peu importe le vaccin utilisé.

Néanmoins, certains auteurs, comme Henderson et al., 1991, ont fait remarquer que «Les recombinants obtenus par recombinaison de souches vaccinales avec des souches virulentes ne semblent pas être plus virulentes que les souches de terrain ou plus virulente que la souche parentale qui a donné lieu à la recombinaison, parce qu'ils maintiennent les copies de travail de tous les gènes de virulence connus". «Par conséquent», concluent les auteurs, "la recombinaison ne crée pas de souches super virulents".

En ce qui concerne la possibilité de recombinaison génomique entre les souches vaccinales et les souches de terrain virulentes chez les animaux immunodéprimés, actuellement il n'existe pas de données dans la littérature universelle. Toutefois, nous comprenons que la recombinaison génomique peut survenir en tout cas, tant chez les animaux sains comme chez des animaux immunodéprimés et que, bien que l'immunosuppression des animaux puisse agir comme un facteur qui facilite la réplication des bactéries dans les tissus cibles de l'animal, il n'a pas - en tout cas - à bénéficier ou de réduire la possibilité de recombinaison, car les deux phénomènes sont interdépendants.

Par conséquent, la possibilité de recombinaison génomique de la souche vaccinale HP-3276 avec d'autres souches peut être considérée comme négligeable.

Enfin, en dépit de tous les facteurs d'une recombinaison spontanée produite, la probabilité que la souche HP-3276 manifeste l'expression de caractéristiques inattendues est peu probable, étant donné qu'elle ne tient pas compte des séquences génomiques donnés par un autre micro-organisme qui pourrait donner lieu à des phénomènes de la recombinaison génétique et l'expression de caractéristiques inattendues.

Destruction des matériaux de confinement des MGM

Flacons, seringues, aiguilles, tubes et autres matériaux en contact avec les OGM seront stérilisés par incinération dans la même ferme.

Exigence de formation

Le vétérinaire qui administrera le vaccin doit avoir une large expérience dans la vaccination des porcs par voie intramusculaire. Cette personne sera formé à manipuler le vaccin recombinant et de décontaminer l'environnement de la vaccination pendant tout le déversement du vaccin.

Situations d'urgence

1. Méthodes et procédures de contrôle des OGM en cas de propagation inattendue.

Dans le cas improbable d'une dissémination incontrôlée des OGM, tous les animaux de la ferme seraient abattus et tous les locaux seraient fumigés avec une solution de 10% de formaldéhyde. Il n'y aura pas d'entrée de nouveaux animaux au moins jusqu'à 15 jours après la pulvérisation.

2. Méthodes de décontamination des zones affectées, par exemple, l'éradication des OGM.

Les animaux abattus seraient/seront détruits par incinération. Une solution de 10% de formaldéhyde (un agent chimique approprié pour l'inactivation des OGM) serait appliquée par voie topique sur la ferme. La lumière ultraviolette du soleil contribuera à l'inactivation de la souche vaccinale, en raison de ses propriétés bactéricides sur cet organisme.

3. Méthodes d'élimination ou d'assainissement des plantes, des animaux, des sols, etc., exposés pendant ou après la propagation.

Les procédures à être effectuées sur des animaux à la ferme et les effets de la lumière ultraviolette (soleil), garantiraient l'élimination appropriée des OGM si cela était nécessaire.

4. Méthodes d'isolement de la zone touchée par la propagation.

Les caractéristiques offertes par les fermes et les propriétés d'une pauvre dissémination de cette bactérie administrée par voie intramusculaire, l'isolement de la zone est garanti dès le début de l'essai. Pour ces raisons, la méthode d'isolement est considérée convenable dans le cas d'une propagation inattendue.

5. Plans de protection de la santé humaine et de l'environnement en cas d'effets indésirables.

Pour toutes les raisons expliquées, principalement l'absence d'infection par *Actinobacillus pleuropneumoniae* chez les espèces humaines ou d'autres espèces autres que porcs, et le temps limité de la persistance des OGM, aucun danger potentiel pour les humains ou pour l'environnement en général n'est prévu. Les seuls effets indésirables qui pourraient se produire théoriquement, seraient dans l'animal cible. En cas d'urgence, entre eux seraient éliminés.

Autre confinement, contrôle et mesures de contrôle

Non applicable.

Responsabilités de la notice

Le consentement qui pourrait être donnée à la notification par le ministre compétent stipule que le notifiant prend toute la responsabilité civile concernant le dommage qui pourrait être causé par la dissémination volontaire à la santé de l'homme, des animaux et de l'environnement.

Inspection par des autorités publiques

Les inspecteurs sont en charge d'inspecter les essais conformément aux conditions spécifiées dans l'autorisation et à enquêter sur des brèches potentielles de l'accord. Dans le cas où une mauvaise gestion ou une fraude sont identifiés, des sanctions spécifiques seront imposées.

Rapport des activités

A la fin de l'essai, un rapport d'activités préparé par le notifiant doit être remis à l'autorité compétente. Ce rapport d'activités comprend au moins les données suivantes:

- Le site et la période de dissémination.
- La nature précise des MGM disséminés.
- Les objectifs de l'essai.
- Les mesures qui ont été prises pour empêcher la libération indésirable de matériel transgénique.
- Le cas échéant, les mesures qui ont été prises pour protéger le sujet (patient / animal) pendant l'administration du médicament contenant des MGM.
- Le cas échéant, les mesures qui ont été prises pour protéger les familles des patients traités.
- Les mesures qui ont été prises pour protéger les travailleurs qui devaient manipuler le matériel contenant des MGM.
- La méthode utilisée pour la destruction du matériel inutilisé ou contaminé.
- Les résultats obtenus au cours de l'expérience.
- Un aperçu de la surveillance du patient / animal pour excréation des MGM.
- Un aperçu de la surveillance des MGM ou la recombinaison de l'ADN dans l'environnement.

RÉFÉRENCE

Henderson, L. M., Levings, R. L., Davis, A. J., Sturtz, D. R. 1991. "Recombination of Pseudorabies virus vaccine strains in swine". *Am. J. Vet. Res.*, vol 52, no. 6, pp. 820-825.

Recombination of pseudorabies virus vaccine strains in swine

Louise M. Henderson, MS; Randall L. Levings, DVM, MS; Arthur J. Davis, DVM, MS; Dawn R. Sturtz

SUMMARY

We report here genetic recombination between 2 USDA-licensed vaccine strains of pseudorabies virus co-inoculated into swine. The vaccine strains, one of which was a conventionally attenuated strain and the other, a genetically engineered deleted strain containing a negative immunologic marker, had complementary genomes. Co-inoculation resulted in the creation of novel strains of pseudorabies virus containing negative immunologic markers with restored virulence genes. Plaque-purified recombinant progeny viruses were found in 2 litters of pigs in which both strains were co-inoculated IM, a litter in which both strains were co-inoculated oronasally, and a litter in which the conventionally attenuated strain was inoculated oronasally and the genetically engineered strain was inoculated IM. Recombinant phenotypes and recombinant restriction fragment patterns were observed. The creation, spread, and potential misdiagnosis of these types of recombinant strains could disrupt control and eradication programs that are based on the serologic identification of swine infected with potentially virulent strains of pseudorabies virus.

Pseudorabies virus (PRV, Aujeszky disease virus, suid herpesvirus-1) causes disease in a number of mammalian species and is responsible for considerable economic loss in the swine industry. Infection may result in signs ranging from clinically inapparent latent carrier states to fatal respiratory tract or neurologic disease syndromes. Infection of pregnant sows may lead to abortion or neonatal death. Recovery from PRV infection often results in the establishment of a latent carrier state in the trigeminal ganglia, as well as the development of humoral and cell-mediated immunity. Viral transmission is possible from clinically normal carrier animals following reactivation throughout the lifetime of the host animal. Vaccination with killed or modified-live vaccines may lessen economic losses, but may not prevent subsequent infection, viral replication, or the establishment of a latent infective state.¹⁻³

Currently, there are a number of modified-live PRV vaccines licensed by the USDA. These include the conven-

tionally attenuated Bartha and Bucharest vaccine strains and the newer genetically engineered vaccine strains.⁴ The genetically engineered vaccine strains, as well as some of the conventionally attenuated strains have mutations or deletions in nonessential glycoprotein genes that are useful as negative immunologic markers, including gX, gI, gIII, and gp63.⁵ Many of these vaccines have companion diagnostic kits also licensed by the USDA, that allow serologic differentiation between animals exposed to the matching vaccine strains with negative immunologic markers and animals exposed to virulent field strains of PRV.^{6,7} The companion vaccine-diagnostic kit pairs provide a useful tool for eradication or control programs.⁸

The PRV genome encodes a number of virulence factors, including gI and gIII, which act synergistically with gp63, and thymidine kinase (Tk).⁹⁻¹¹ Other virulence factors may also be encoded. Strain virulence also is influenced by host species.¹² Substantial genomic variation of virulence-associated factors, as well as antigenic factors, exists between vaccine strains of PRV, all of which have reduced virulence for swine.

The Tk gene encodes an enzyme that is active in the pyrimidine synthesis salvage pathway and is essential for DNA replication in cells in which the primary pyrimidine synthesis pathway is inactive or nonfunctional. The natural endogenous activity of Tk in differentiated neural tissue is low. Viral-encoded Tk facilitates acute infections of neurons, permitting viral replication and contributing to the virulence of Tk-positive PRV strains.¹³ The modified-live genetically engineered vaccine strains licensed prior to 1990 have deletions in the Tk gene. This results in reduced virulence, as well as reduced frequency of reactivation of virus from latent infections although latency may still be established.^{3,14} All conventionally attenuated modified-live vaccine strains have intact functional Tk genes and contain deletions or mutations in genes encoding other virulence-associated factors. The restoration of an intact Tk gene to a strain containing a negative immunologic marker may, therefore, result in creation of a strain with restored virulence and unexplored antigenic characteristics. The possibility of such an event exists as a result of recombination between genetically engineered vaccine strains and either conventionally attenuated vaccine strains or field strains of PRV.¹⁵

Recombination is an early event in PRV replication, unlike recombination in herpes simplex viruses, which occurs throughout the infective process. Homologous recombination is known to occur between multiple molecules of PRV DNA within a host cell before DNA replication.¹⁶ Little intermolecular or intramolecular recombination can be detected between parental DNA and

Received for publication Dec 10, 1989.

From the National Veterinary Services Laboratories, Science and Technology, Animal and Plant Health Inspection Services, USDA, PO Box 844, Ames, IA 50010.

The authors thank Dr. John Mayfield, Dr. Jon Katz, Dr. Al Jenny, Dr. Larry Ludemann, Dr. Pat Foley, Dr. Ron Morgan, Dr. Gene Erickson, Dr. Howard Hill, Steve Hanson, Peg Patterson, and John Landgraf for technical assistance.

progeny DNA accumulating in the cells.¹⁶ The inverted repeats promote recombinational events that lead to the isomerization of the unique sequences that they bracket.¹⁷ However, intermolecular recombination is not an essential step in the process of viral DNA synthesis or the maturation of concatameric DNA. Co-infection of host cells with 2 strains of PRV during the early phases of DNA replication may lead to creation of recombinant genomes. Restriction fragment pattern (RFP) analyses are useful for differentiation of PRV strains¹⁸ and may provide evidence of homologous recombination.

The focus of the study reported here is the potential recombination between strains of PRV resulting in the restoration of virulence genes to vaccine strains containing negative immunologic markers in swine. We have recently reported recombination between vaccine strains of PRV resulting in the restoration of virulence to strains containing the same negative immunologic markers as the vaccine strains in the *in vitro* studies and in sheep, a sensitive host animal.¹⁵ Exposure of sheep to PRV leads to fulminating infections and high viral titers, a condition that would increase the occurrence of the co-infective events required for homologous recombination. It was unknown whether swine, a more restrictive host and the target of eradication and control programs, would restrict replication sufficiently to reduce recombinant events detected, using serologic differentiation of animals exposed to avirulent strains from animals exposed to virulent strains of PRV. The purpose of the study reported here was to determine whether recombination of PRV in swine could occur and disrupt the control and eradication programs.

Materials and Methods

Cell culture source—Four cell lines were obtained: Madin-Darby bovine kidney (MDBK) cells (ATCC CCL 22), embryonic primary swine kidney (SKp) cells, porcine kidney (PK-15) cells (ATCC CCL 33), and L-mouse cells lacking a functional Tk (LMTK-) gene (ATCC CCL 1.3).

Media—Maintenance media for MDBK, SKp, LMTK-, and PK-15 cells was Eagle minimal essential media (MEM). One percent sodium pyruvate was added for PK-15 cells, and 5% fetal bovine serum was added for growth media.

Characterization procedures—The Tk assay, β -galactosidase assay, restriction endonuclease digestion, and agarose gel electrophoresis were performed as described previously.¹⁵

Virus titration and plaque purification—Virus was titered on confluent MDBK cells, using a standard plaque assay in 6-well tissue culture dishes. Reference virus (NVSL 87-2 Aujeszky strain) of known titer was assayed with each titration. Plaque purifications were performed by selection of individual plaques from the β -galactosidase assay followed by expansion on confluent MDBK cells in 25-cm² flasks.

Virus isolation—Suspensions of the tissues were inoculated onto SKp cell cultures. Two serial passages on SKp cells were made, with regular observation for evidence of viral-induced cytopathic effects. At the end of the second

passage, the cultures were stained with a polyvalent anti-serum and anti-porcine immunoglobulin fluorescent antibody conjugate.

Virus strains—Vaccines were rehydrated following manufacturer's instructions, using half the suggested diluent. Inocula were half the suggested volume, resulting in 1 normal vaccine dose/1 ml of rehydrated vaccine. For proprietary reasons, identification of the vaccine strains cannot be included. Additionally, the 2 strains chosen for this study were useful because of the differences in selectable phenotypic characteristics. We know of no reason not to believe that all strains will recombine. Virus strain A is a USDA-licensed Bartha-derived conventionally attenuated modified-live vaccine strain. It has an intact functional Tk gene and known deletions or mutations in the *gI* and *gp63* genes. Strain A has a Tk-positive, *gX*-positive, β -galactosidase-negative phenotype. Virus strain E is a USDA-licensed genetically engineered vaccine strain with deletions in the Tk and *gX* genes and an *Escherichia coli lacZ* marker insertion, resulting in a Tk-negative, *gX*-negative, β -galactosidase-positive phenotype. The *gX* deletion serves as a negative immunologic marker (Fig 1 and 2).

Virus inoculation—Three-day-old pigs from PRV-seronegative sows were used to assess the ability to detect specific recombinant virus phenotypes following co-inoculation of 2 vaccine strains of PRV. Three days after farrowing, pigs were inoculated with 2 standard vaccine doses of PRV/pig. Exposure was either oronasal (ON) or IM in the large muscle of the rear limb, on the basis of random assignment. All principals in a litter received the same viruses. Each litter included a contact control that was not inoculated. Beginning on postinoculation day (PID) three, 2 pigs were euthanatized daily, using IV injection of T61 and postmortem examinations were conducted. Tissues were collected and virus isolation was attempted. Following isolation of PRV, Tk-positive recombinants were selected by 4 passages through LMTK- cells in HAT media. Each isolate was serially plaque-purified 3 times, using the β -galactosidase assay. Phenotypes of pure cultures were confirmed, and DNA was purified, digested with restriction endonuclease, and subjected to electrophoresis

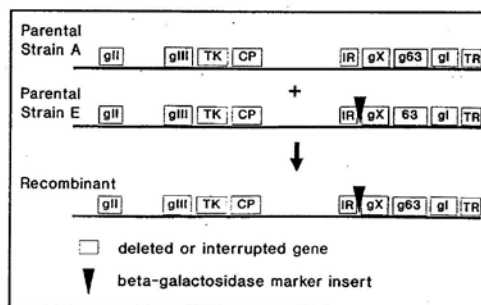


Figure 1—Diagrammatic map of parental pseudorabies virus (PRV) vaccine strains and potential recombinant with restored virulence and the same negative immunologic markers as vaccine strains.

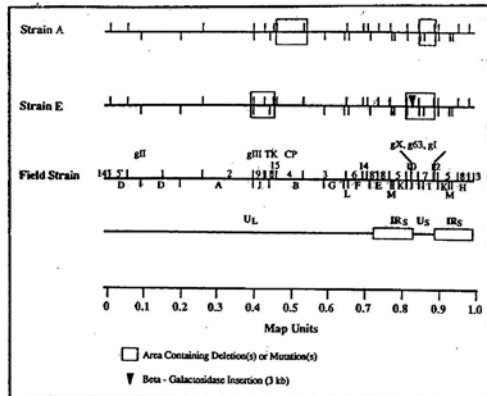


Figure 2—Restriction maps of parental vaccine strains A and E and a field strain of PRV. Areas between upward marks represent *Bam*HI fragments and areas between downward marks represent *Kpn*I fragments. Distances are given in map units.

in 1% agarose gel. The RFP from isolates were compared with RFP of both parental strains to confirm that recombinant phenotypes were attributable to homologous recombination.

Control litter AA pigs each received 2 standard vaccine doses of vaccine strain A. Four pigs were inoculated ON, 4 were inoculated IM, and 1 was an uninoculated contact control. Control litter EE pigs each received 2 standard vaccine doses of vaccine strain E. Five pigs were inoculated ON, 5 were inoculated IM, and 1 pig was an uninoculated contact control. Litter NN (n = 8) was co-inoculated ON with a standard vaccine dose of each strain A and strain E mixed in 1 vial. Litter NM (n = 8) was co-inoculated ON with a standard vaccine dose of strain A and IM with a standard vaccine dose of strain E. Litter MM (n = 9) was co-inoculated IM with a standard vaccine dose of each strain A and strain E, with both vaccines being mixed in a single vial. Litter MM' principals (n = 6) were 12-day-old pigs co-inoculated IM with 1 standard vaccine dose each of strain A and strain E, similar to litter MM. Two pigs were uninoculated contact controls. Although this litter was 12 days old, all other conditions were similar to the 3-day-old litter. Litter MM' was inoculated to better assess the clinical signs observed in litter MM. New vials of vaccine were rehydrated. Two of the recombinant isolates were inoculated into 3-day-old pigs to assess virulence restoration of a single isolated recombinant. Two pigs of 1 litter were inoculated ON with 10⁶ plaque-forming units of a recombinant isolated from the MM litter; 2 of the litter were uninoculated contact controls.

Results

Clinical signs were not observed in any of the pigs in litter AA and no lesions were observed. Virus was isolated from the brain tissue of 1 of the ON inoculants, and from other tissues (lung, liver, spleen, or tonsil) of all of the ON inoculants, as well as 1 of the IM inoculants. Virus

was not isolated from the tissues of the other 3 IM inoculants. The isolated viruses were identical to the parental vaccine strain in both Tk and β -galactosidase phenotype, as well as RFP. Notable lesions were not observed in any of the pigs in litter AA.

One IM inoculant from litter EE displayed slight limping, which was attributed to an injury. Clinical signs were not observed in any of the pigs in this litter. Notable lesions were not observed in 3 of the ON inoculants. One ON inoculant had moderate diffuse splenic lymphoid hyperplasia and 1 ON inoculant had mild splenic lymphoid hyperplasia. Notable lesions were not observed in the IM inoculants. Virus was isolated from the tonsil, spleen, or brain tissue of 3 of the ON inoculants and from lung tissue of 1 of the IM inoculants. In all cases, viruses isolated from this litter were identical to the parental vaccine strain in Tk and β -galactosidase phenotype, as well as in RFP.

Clinical signs were not observed in litter NN, except mildly high temperatures (Fig 3). Lesions compatible with PRV infection were observed in all of the pigs. Virus was isolated from lung, liver, spleen, or tonsil, as well as from brain tissue of all 7 inoculated pigs (Table 1). In all cases, Tk-positive, β -galactosidase-positive recombinants were observed. Virus was also isolated from the lung tissue of the contact control. This virus had a Tk-positive, β -galactosidase-negative phenotype, similar to parental strain A, with similar *Bam*HI RFP (Fig 4).

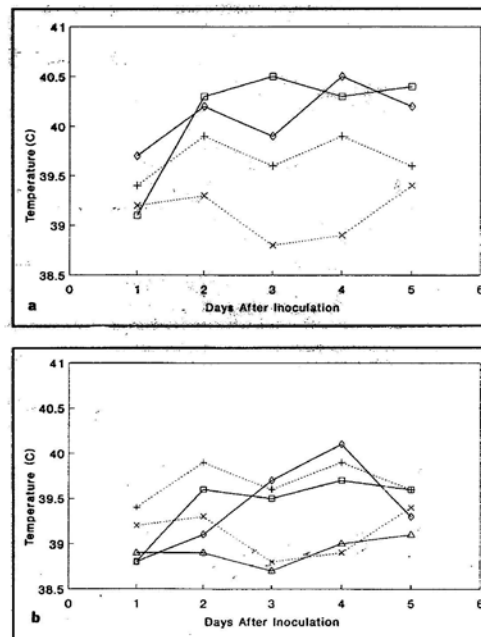


Figure 3—Mean daily temperatures of pigs following IM co-inoculation (a) and IM-ON and ON-ON co-inoculation (b). Temperatures are means of 3 or more pigs. Temperatures of control pigs are means of all clinically normal contact controls.

Table 1—Virus isolation from pigs inoculated with strains of pseudorabies virus vaccines or uninoculated controls

| Litter identification | No. of pigs in group | Inoculation Dose/route/strain | Tissue type from which virus was isolated | | | |
|-----------------------|----------------------|-------------------------------|---|-------|-----|---------|
| | | | Neural | Other | Tk | β |
| AA | 4 | 2X/on/A | 1 | 4 | + | - |
| | 1 | Uninoculated | 0 | 1 | + | - |
| EE | 5 | 2X/on/E | 2 | 3 | - | + |
| | 5 | 2X/m/E | 0 | 1 | - | + |
| | 1 | Uninoculated | 0 | 0 | ... | ... |
| NN | 7 | 1X/on/A; 1X/on/E | 7 | 7 | + | + |
| | 1 | Uninoculated | 0 | 1 | + | + |
| NM | 7 | 1X/on/A; 1X/m/E | 2 | 7 | + | + |
| | 1 | Uninoculated | 0 | 0 | ... | ... |
| MM | 8 | 1X/m/A; 1X/m/E | 5 | 8 | + | + |
| | 1 | Uninoculated | 0 | 1 | + | + |
| | 4 | 1X/m/A; 1X/m/E | 1 | 2 | + | + |
| MM' | 4 | 1X/m/A; 1X/m/E | 1 | 2 | ... | ... |
| | 2 | Uninoculated | 0 | 0 | + | ... |

* Restriction fragment pattern of recombinant virus strain differs from that of parental virus vaccine strain.
Tk = thymidine kinase phenotype; β = β -galactosidase phenotype; on = oronasal.

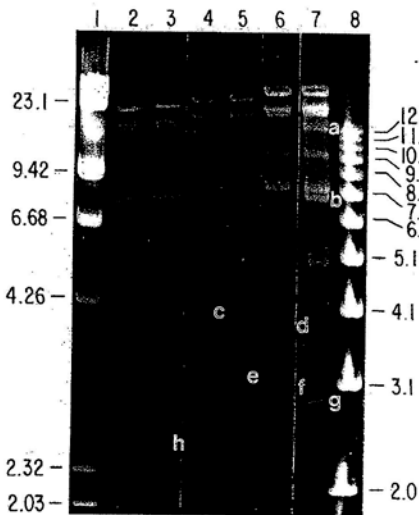


Figure 4—*Bam*HI restriction endonuclease patterns of parental and recombinant viruses. Lane 1: lambda *Hind*III standards. Lane 2: parental strain A. Lane 3: brain isolate from litter AA on inoculant. Lane 4: brain isolate from litter MM inoculant. Isolate differs from parental strain A at bands c and d, and differs from parental strain E at bands a, b, c, e, g, and h. Lane 5: brain isolate from litter MM inoculant. Isolate differs from parental strain A at bands b and c, and differs from parental strain E at bands a, c, d, e, and g. Lane 6: brain isolate from litter NN. Isolate differs from parental strain A at bands b, f, and h, and differs from parental strain E at bands a, d, e, f, and g. Lane 7: parental strain E. Lane 8: 1 kb DNA ladder standard.

Clinical signs were not observed in litter NM. Notable lesions were not observed, but virus was isolated from the lung, spleen, liver, or tonsil of each of the inoculants, as well as from brain tissues of 2 of the 7 inoculants. Four of the non-neural tissue isolates and 1 of the brain isolates were Tk-positive, β -galactosidase-positive recombi-

nant strains. Isolates from the remaining 2 pigs were phenotypically similar to the Tk-positive, β -galactosidase-negative parental strain A; RFP similar to parental strain A were observed for these 2 isolates (Fig 3).

Clinical signs in litter MM included limping, depression, and markedly high temperatures observed on PID 2 in all 8 inoculated pigs. Acute clinical signs were observed in all inoculated pigs on PID 3, including markedly high temperatures, dyskinesia, depression, shivering, and caudal paralysis. Mild clinical signs were observed in the contact control pig on PID 3, and virus was isolated from a pool of spleen and lung tissue of this isolate. Perineural edema of the cauda equina was observed in all inoculants. Notable lesions were not observed in the contact control. Virus was isolated from the spleen, lung, liver, or tonsil of all inoculants and the contact control, as well as from neural tissue of 5 of the inoculants. Neural tissue virus isolates from all inoculants included Tk-positive, β -galactosidase-positive recombinants (Fig 3). The RFP analyses of some of the recombinants isolated from these pigs confirmed that selected strains RFP differed from parental strains RFP (Fig 4). On the basis of seroconversion of the sow in litter MM, it was determined that shedding from the pigs to the sow occurred, although it is not known which strain (vaccine or recombinant) was shed.

Mild clinical signs (marked temperature increase, depression, and respiratory tract signs) were observed in all 4 inoculants of litter MM'. Clinical signs were not observed in the 2 contact controls. Gross lesions suggestive of PRV infection were not observed. Tk-positive, β -galactosidase-positive recombinant viruses were isolated from a tonsil, spleen, and lung pool of 1 of the inoculants, as well as from a lung and liver pool and neural tissue of another of the inoculants (Fig 3).

A marked temperature increase was observed in all pigs inoculated with recombinants isolated from the MM litter. Other clinical signs were not observed. There were no signs of spread to the contact controls. Virus isolation was attempted from 3 of the inoculants and 1 contact control, and PRV was isolated from neural tissue, as well as from spleen, liver, and lung of these 3 inoculants. Five of another litter were inoculated IM with 10^6 plaque-forming units of a brain isolate from litter MN; 2 uninoculated contact controls remained. A marked increase in temperature, as well as a slight cough and pruritus were observed in these pigs. Postmortem examinations were conducted on 2 of the inoculants, as well as on 1 contact control. Notable lesions were not observed in the contact control and 1 inoculant. Slight perineural edema of the cauda equina of 1 of the inoculants was observed. All other pigs were observed for 2 weeks. Both litters recovered from the mild clinical signs.

Discussion

On the basis of our findings, we conclude that genetic recombination between strains of PRV occurs in swine. The isolation of plaque-purified phenotypic recombinants from the neural tissue of swine co-inoculated with 2 vaccine strains of PRV is important. Recombinant RFP provide further evidence in those cases in which phenotypic characteristics are similar to a parental strain. Previous studies¹⁵ have demonstrated that multiple recombinant events are likely. We have not attempted to map the site(s)

of recombination because the number of isolates studied is insufficient to establish recombination "hot spots." The procedure used in this study was used to purify only a single isolate of 1 specific phenotypic recombinant. Also, all RFP that differed from both parental strain RFP were considered to be recombinant RFP with no attempt to determine crossover sites or number of apparent crossovers. We have not attempted to establish the relative virulence of recombinant strains. The restoration of a functional intact Tk gene to a vaccine strain of PRV may restore full virulence, but in many recombinants there will be diversity in a number of virulence factors. We establish the formation of recombinants here; the importance of any single recombinant is not the focus of this study.

Swine are a highly resistant host species. Host defense systems are expected to provide a selective advantage to recombinant strains with restored virulence. Immunologically immature host animals provide increased opportunities for recombinant events to occur because viral replication is less restricted than that in immunologically competent hosts. Regardless of immunologic maturity, we find recombinants are easily detected in the neural tissue of swine simultaneously exposed to standard vaccine titers of more than 1 strain of PRV under these experimental conditions. Previous studies have demonstrated that recombination between 2 strains co-infecting a host cell is a frequent event early in the infective process prior to DNA replication.¹⁶ Although it is possible that acute clinical signs were in fact attributable to complementation, rather than to recombination with restoration of virulence factors, it is unlikely that 2 complementary strains, replicating in tandem, would reach the brain tissue in swine after IM inoculation in the rear limbs, with no recombinant event occurring between the 2 strains prior to tissue culture inoculation. Because isolation techniques begin with tissue culture amplification of PRV present, we cannot be positive that the recombinant events did not occur in tissue culture, rather than in vivo; again, clinical signs and the severity of lesions observed suggests that recombinant events occurred prior to viral replication in neural tissue. Although immunologic maturity may affect the number of recombinants detected, it appears that recombinant events occurred in 3- and 12-day-old pigs. Some vaccine strains are licensed for use in 3-day-old pigs; if virulent recombinants are formed and shed from immunologically immature pigs, mature swine may be susceptible to the newly created strain.

These results are not unexpected. Recombinant strains of other viral agents are known to naturally form in vivo, including the generation of intertypic recombinants.^{19,20} Avirulent herpes simplex viruses have been shown to generate lethal recombinants in vivo.²¹ Also, evidence of possible recombinant events has been reported between PRV strains in swine.²²

Of particular importance is the finding of recombinant virions in swine exposed to conditions that might be found in field situations (litters NN and NM), particularly in those situations in which swine are concurrently exposed to 2 strains. These conditions may occur if more than 1 strain of virus is shed at a time. Vaccination during a herd epizootic of PRV is likely to create conditions in which individual animals may be exposed to high titers of both the vaccine strain and the virulent field strain. Although conditions found in litter MM are not likely to be found

in a field situation, the use of an oronasal vaccine during an epizootic could result in the creation of conditions similar to those in litter NN, whereas the use of an IM vaccine would mimic the conditions in litter NM. There is evidence of recombinant events occurring under both conditions. Animals simultaneously exposed to 2 strains of PRV should be monitored carefully. During acute infection and following recovery from clinical signs, it is possible that clinically normal carrier animals may shed virulent recombinant PRV containing negative immunologic markers. These recombinants could have an impact in field situations in which serologic responses are the determining factor in allowing movement of animals between herds or in lifting of quarantine restrictions. Those responsible for the interpretation of test results must consider the possibility of recombination if the clinical findings do not match the serologic findings.

A recent report on the ability of 2 different strains of an α -herpesvirus (bovine herpesvirus-1) to establish latency in the same tissue²³ suggests that it may be possible for a recombination event to occur in a host animal exposed to more than 1 strain, even when a substantial length of time separates the exposures. Although this has not yet been tested with PRV in swine, it may be prudent to restrict the exposure of herds to only 1 vaccine strain. The establishment of a latent infective state and the ability of the virus to replicate and shed throughout the lifetime of the host animal may facilitate recombination between herpesvirus strains that have replicated in a host animal at different times.

The ability to efficiently reconstitute PRV from subgenomic parts within a host cell through overlap recombination²⁴ suggests that defective interfering particles, which contain genomes of less than unit length, may be capable of contributing to the variation in genomic structure of the progeny viruses. Modified-live vaccines containing pieces of PRV genome inserted into foreign vectors also may contribute to the genetic material available for recombination within a host. Additionally, before the use of herpesviruses as vectors for multivalent vaccines, the consequences with respect to recombinant events must be assessed. Recent reports²⁵ of increased virulence of vaccine vectors attributable to the insertion of DNA encoding foreign proteins suggest that foreign inserts must be evaluated within the genetic background in which they might be found. The impact with respect to virulence of a different genetic background on the foreign insert, as well as that of a foreign gene on a different genetic background, must be considered before the release of new genetically engineered microorganisms. Failure to carefully evaluate the potential interactions of new strains of viruses before environmental release could lead to undesirable consequences.

Many genotypic combinations may result from recombinant events. Diagnostic tests that are based on serologic responses to glycoprotein gene-deleted vaccine strains may not be able to differentiate vaccinates from animals infected with recombinants of this kind.²⁶ Recombinants detected did not appear to be more virulent than field strains of PRV, nor are they expected to be more virulent, because field strains retain functional copies of all known virulence genes. Therefore, recombination is not expected to create a supervirulent strain. However, the ability of vaccine strains to recombine in vivo with either different

vaccine strains or field strains to produce virulence-restored strains containing the same negative immunologic markers as vaccine strains is of concern for control programs that are based on serologic differentiation of swine exposed to vaccine strains from swine exposed to virulent strains of PRV. The ability to detect all animals that could be carrying virulent strains is crucial if eradication and control programs are to function efficiently. In addition, the restoration of an intact Tk gene to a vaccine strain containing a negative immunologic marker would be expected to increase the likelihood of reactivation from latent infections and may also have an impact on eradication programs.

Considerable improvement in herd health, as well as economic savings have resulted from the use of vaccines to control PRV. Although the use of subunit vaccines in which antigenic proteins elicit a protective serologic response without the introduction of intact genetic material and concomitant possibility of establishment of a latent infective state may alleviate concerns about the consequences of recombination, there are no such vaccines currently licensed. The use of inactivated virus vaccines containing negative immunologic markers with compatible companion diagnostic kits presents an option in which recombination should not present a problem. Modified-live virus vaccines that are based on the use of novel strains of PRV have made possible the differentiation of animals exposed to an assortment of strains of PRV, a condition that greatly decreases the costs of eradication programs. Without the use of these tools, eradication efforts may not be practical. If the usefulness of these unique strains is to be retained, care must be taken to reduce the likelihood of creation and spread of virulent recombinant strains containing the same negative immunologic markers as vaccine strains of PRV.

References

1. Leist TP, Sandri-Goldin RM, Stevens JG. Latent infections in spinal ganglia with thymidine kinase-deficient herpes simplex virus. *J Virol* 1989;63:4976-4978.
2. Van Oirschot JT, Gielkens ALJ. Intranasal vaccination of pigs against pseudorabies: absence of vaccinal virus latency and failure to prevent latency of virulent virus. *Am J Vet Res* 1984;45:2099-2103.
3. Schoenbaum MA, Beran GW, Murphy DP. Pseudorabies virus latency and reactivation in vaccinated swine. *Am J Vet Res* 1990;51:334-338.
4. Molitor T, Thawley D. Pseudorabies vaccines: past, present, and future. *Compendium Food Animal* 1987;409-416.
5. Quint W, Gielkens A, van Oirschot J, et al. Construction and characterization of deletion mutants of pseudorabies virus: a new generation of 'live' vaccines. *J Gen Virol* 1987;68:523-534.
6. Elliot M, Fargeau D, Vannier P, et al. Development of an ELISA to differentiate between animals either vaccinated with or infected by Aujeszky's disease virus. *Vet Rec* 1989;124:91-94.
7. Van Oirschot JT, Houwers DJ, Rziha HJ, et al. Development of an ELISA for detection of antibodies to glycoprotein 1 of Aujeszky's disease virus: a method for the serological differentiation between infected and vaccinated pigs. *J Virol Methods* 1988;22:191-206.
8. Engel M, Wierup M. Vaccination and eradication programme against Aujeszky's disease in Sweden, based on a gI ELISA test. *Vet Rec* 1985;125:236-237.
9. Zuckerman FA, Mettenleiter TC, Schreurs C, et al. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J Virol* 1988;62:4622-4626.
10. Mettenleiter TC, Schreurs C, Zuckermann F, et al. Role of glycoprotein gIII of pseudorabies virus in virulence. *J Virol* 1988;62:2712-2717.
11. Ben-Porat T. Complex between glycoproteins gI and gp63 of pseudorabies virus: its effect on virus replication. *J Virol* 1988;62:4622-4626.
12. Zsak L, Mettenleiter TC, Sugg N, et al. Release of pseudorabies virus from infected cells is controlled by several viral functions and is modulated by cellular components. *J Virol* 1989;63:5475-5477.
13. Tenser RB, Ressel SJ, Fralish FA, et al. The role of pseudorabies virus thymidine kinase expression in trigeminal ganglion infection. *J Gen Virol* 1983;64:1369-1373.
14. Katz JB, Henderson LM, Erickson GA, et al. Exposure of pigs to a pseudorabies virus formed by in vivo recombination of two vaccine strains in sheep. *J Vet Diagn Invest* 1990;2:135-136.
15. Henderson LM, Katz JB, Erickson GA, et al. In vivo and in vitro genetic recombination between conventional and gene-deleted vaccine strains of pseudorabies virus. *Am J Vet Res* 1990;51:1656-1662.
16. Ben-Porat T, Brown L, Veach RA. Recombination occurs mainly between parental genomes and precedes DNA replication in pseudorabies virus-infected cells. *J Virol* 1982;44:134-143.
17. Ben-Porat T, Deatly A, Veach RA, et al. Equalization of the inverted repeat sequences of the pseudorabies virus genome by intermolecular recombination. *Virology* 1984;132:303-314.
18. Paul PS, Mengeling WL, Pirtle EC. Differentiation of pseudorabies (Aujeszky's disease) virus strains by restriction endonuclease analysis. *Arch Virol* 1982;73:193-198.
19. Gershon PD, Kitching RP, Hammond JM, et al. Poxvirus genetic recombination during natural virus transmission. *J Gen Virol* 1989;70:485-489.
20. Hahn CS, Lustig S, Strauss EG, et al. Western equine encephalitis virus is a recombinant virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;85:5997-6001.
21. Javier RT, Sedarati F, Stevens JB. Two avirulent herpes simplex viruses generate lethal recombinants in vivo. *Science* 1986;234:746-748.
22. Cowen P, Li S, Guy JS, et al. Reactivation of latent pseudorabies virus infection in vaccinated commercial sows. *Am J Vet Res* 1990;51:354-358.
23. Whetstone CA, Miller JM. Two different strains of an alphaherpesvirus can establish latency in the same tissue of the host animal: evidence from bovine herpesvirus 1. *Arch Virol* 1989;107:27-34.
24. Van Zijl M, Quint W, Briaire J, et al. Regeneration of herpesviruses from molecularly cloned subgenomic fragments. *J Virol* 1988;62:2191-2195.
25. Khatchikian D, Orlich M, Rott R. Increased viral pathogenicity after insertion of a 28s ribosomal RNA sequence into the hemagglutinin gene of an influenza virus. *Nature* 1989;340:156.
26. Katz JB, Henderson LM, Erickson GA. Recombination in vivo of pseudorabies vaccine strains to produce new virus strains. *Vaccine* 1990;8:286-288.

CONTACT

If you have any comment on the public dossier or our activities or wish to obtain additional information on the deliberate release, please contact us at the following address.

LABORATORIOS HIPRA, S.A. Telephone No. +34 972430660