
INFORMATIE VOOR HET PUBLIEK

-NEDERLANDS-

LABORATORIOS HIPRA, S.A.

Informatie voor het publiek

Analyse van de veiligheid en werkzaamheid van een levend vaccin bij de bestrijding van pleuropneumonie bij varkens veroorzaakt door *Actinobacillus pleuropneumoniae*

Europees Nummer van de Kennisgeving

B/BE/11/V3

De introductie van genetisch gemodificeerde organismen (GGO's) in het milieu is op Europees niveau strikt geregeld door Richtlijn 2001/18/EC, en op Belgisch niveau door een Koninklijk Besluit tot van 21 februari 2005 "reglementering van de doelbewuste introductie in het leefmilieu evenals van het in de handel brengen van GGO's of producten die GGO's bevatten".

Teneinde het veilige gebruik van GGO's te garanderen bepalen de voorzieningen van bovengenoemd Koninklijk Besluit dat de introductie van GGO's voor experimentele doeleinden verboden is zonder voorafgaande toestemming van de bevoegde Minister. De beslissing is gebaseerd op een grondige analyse van de bioveiligheid van de geplande introductie, welke wordt uitgevoerd door de Adviesraad voor Bioveiligheid, die bestaat uit verschillende Wetenschappelijke Comités, waarin onafhankelijke experts van Belgische Universiteiten en overheidsinstellingen zijn samengebracht.

Om de benodigde toestemming van de bevoegde minister te verkrijgen heeft het bedrijf LABORATORIOS HIPRA, S.A. een aanvraag ingediend bij de bevoegde autoriteit. Op basis van het advies van de Adviesraad voor de Bioveiligheid zou de bevoegde minister het bedrijf LABORATORIOS HIPRA, S.A. toestemming kunnen geven om experimenten uit te voeren met *Actinobacillus pleuropneumoniae*, een genetisch gemodificeerd levend vaccin, zoals is aangegeven in de aanvraag welke in behandeling is.

De introductie zal plaatsvinden op verschillende locaties in Vlaanderen.

Verwacht wordt dat kan worden gestart binnen 3 maanden vanaf het verkrijgen van de vergunning voor introductie.

INHOUDSOPGAVE

INHOUDSOPGAVE	3
ALGEMENE INFORMATIE	4
<i>Beschrijving van het genetisch gemodificeerd micro-organisme (GGO)</i>	4
<i>Type en doel van de beoogde proef</i>	4
RESEARCH-/ONTWIKKELINGSACTIVITEITEN	5
<i>Voorafgaande ontwikkelingsactiviteiten:</i>	5
<i>Veiligheid van het doeldier</i>	5
a) <u>Toediening van een overdosis, één enkele dosis, een herhaalde dosis en verspreiding van <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> levend vaccin PB-116 stam</u>	5
b) <u>Verspreiding van het <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> HP-3276 stam in gevaccineerd dieren na intramusculaire toediening</u>	5
c) <u>Verspreiding van het <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> HP-3276 stam in gevaccineerd dieren na intranasale toediening</u>	6
d) <u>Studie van terugkeer tot virulentie van de HP-3276 <i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i> vaccinstam</u>	7
<i>Evaluatie van de werkzaamheid onder laboratoriumcondities</i>	8
<i>Kennis en ervaring opgedaan in voorafgaande ontwikkelingsactiviteiten</i>	9
<i>Toekomstige activiteiten</i>	9
VOORDELEN	10
RISICO'S	11
MAATREGELEN TEN AANZIEN VAN BEHEERSING, CONTROLE EN BEWAKING 13	
<i>Controle van de verspreiding van GGO en gen</i>	13
<i>Genetische stabiliteit van het GGO</i>	13
<i>Vernietiging van GGO controlemateriaal</i>	14
<i>Trainingsvereisten</i>	14
<i>Noodsituaties</i>	15
<i>Overige maatregelen ter beheersing, control en bewaking</i>	15
<i>Verantwoordelijkheden van de kennisgever</i>	15
<i>Inspectie door de overheid</i>	16
<i>Activiteitenrapport</i>	16
REFERENTIE	17
CONTACT	24

ALGEMENE INFORMATIE

Beschrijving van het genetisch gemodificeerd micro-organisme (GGO)

De stam HP-3276 die onderdeel uitmaakt van het vaccin PB-116, is een gemodificeerde levende *Actinobacillus pleuropneumoniae* stam. *Actinobacillus pleuropneumoniae* (hierna “App”) is een gramnegatieve bacterie die pleuropneumonie bij varkens veroorzaakt, een wereldwijd verspreide besmettelijke ziekte die verantwoordelijk is voor aanzienlijke financiële verliezen in de varkensindustrie.

De stam HP-3276 wordt gekenmerkt door modificatie van specifieke genetische sequenties die overeenkomen met virulentiefactoren van App. Deze resulteren in een App-stam met verminderde giftigheid, terwijl het vermogen tot immunoprotectie onveranderd blijft. De stam HP-3276 heeft geen pathogene activiteit en vormt een geattenueerde stam in vergelijking met de pathogene eigenschappen van de ouderstam. Daarom is het geschikt voor de ontwikkeling van een levend geattenuerd vaccin tegen pleuropneumonie bij varkens.

Het vaccin PB-116 is bedoeld voor gebruik bij varkens van acht weken oud en het vaccinatieprogramma bevat een tweede dosis welke 3 weken daarna zal worden toegediend.

Type en doel van de beoogde proef

Nadat de veiligheid en werkzaamheid van het vaccin bij varkens onder laboratoriumcondities is bevestigd, heeft de veldstudie ten doel de veiligheid en werkzaamheid van het vaccin in het veld te analyseren, zoals de EU-wetgeving vereist.

Dit wordt een multicentrische studie waarbij varkens van meerdere boerderijen in Vlaanderen intramusculair met het proefvaccin worden gevaccineerd, volgens het vaccinatieprogramma dat voor het product wordt voorgesteld. Behalve de varkens die met PB-116 worden gevaccineerd, beschikt elke boerderij over een niet-gevaccineerde controlegroep varkens.

Op de geselecteerde boerderijen is voor de studie pneumonie uitgebroken, welke was veroorzaakt door *Actinobacillus pleuropneumoniae*.

Veiligheidsparameters zoals algemene reacties of bezwarende voorvallen worden na elke vaccinatie en gedurende de gehele studie bewaakt. Tijdens de studie worden op verschillende momenten ook lokale reacties geëvalueerd.

De werkzaamheid wordt voornamelijk geconcentreerd op klinisch signalen en sterfte. De klinische proef zal door dierenartsen worden bewaakt.

RESEARCH-/ONTWIKKELINGSACTIVITEITEN

Voorafgaande ontwikkelingsactiviteiten:

Veiligheid van het doeldier

De veiligheid van het vaccin is bevestigd door middel van meerdere laboratoriumstudies, waarin een overdosis, de toediening van een herhaalde dosis, de verspreiding van de vaccinstam van gevaccineerde naar niet-gevaccineerde varkens en terugkeer tot virulentie werden geanalyseerd.

a) Toediening van een overdosis, één enkele dosis, een herhaalde dosis en verspreiding van *Actinobacillus pleuropneumoniae* levend vaccin PB-116 stam.

De doelstellingen van deze studie waren de evaluatie van de veiligheid van de toediening van een overdosis, één enkele dosis en een herhaalde dosis van het PB-116 vaccin en eveneens de evaluatie van de transmissie van gevaccineerde op niet-gevaccineerde dieren.

Eerst is een groep varkens gevaccineerd met een overdosis van het vaccin gevolgd door de toediening van nog eens 2 enkele dosissen. Een andere groep is gevaccineerd volgens het basisvaccinatieprogramma (2 dosissen met drie weken tussen elke toediening).

De verkregen resultaten lieten zien dat zich na vaccinatie een tijdelijke verhoging van de rectale temperatuur kan voordoen. In de meeste gevallen is deze temperatuurverhoging minder dan 1.5°C en verdwijnt deze altijd spontaan na 24 uur. Bovendien waren er geen klinische signalen met betrekking tot de vaccinatie van de gebruikte varkens. Deze resultaten bevestigen de veiligheid van PB-116, zelfs wanneer een overdosis en een herhaalde dosis worden toegediend.

De resultaten bevestigden eveneens dat de vaccinstam zich niet verspreidt van gevaccineerde naar niet-gevaccineerde dieren.

b) Verspreiding van het *Actinobacillus pleuropneumoniae* HP-3276 stam in gevaccineerd dieren na intramusculaire toediening.

In deze studie werd de verspreiding van het *Actinobacillus pleuropneumoniae* HP-3276 vaccinstam in dieren die intramusculaire waren gevaccineerd, geanalyseerd.

Voor de studie werden twintig acht weken oude varkens van de minimumleeftijd aanbevolen in de 'Samenvatting van productkenmerken' (8 weken oud) gebruikt. Alle dieren kregen één dosis van het vaccin intramusculair toegediend.

Na vaccinatie werd de verspreiding van het App HP-3276 vaccinstam in de dierenlichamen geanalyseerd met vooraf bepaalde intervallen. Verschillende weefselmonsters werden onderzocht om te constateren of de vaccinstam aanwezig was. Monsters van de lichaamssecreties werden eveneens met hetzelfde doel geanalyseerd.

Uit de resultaten die in deze studie worden gepresenteerd kan worden geconcludeerd dat de verspreiding van HP-3276 vaccinstam erg zwak is en zich exact bevindt in tonsil- en inoculatieknooppunten tijdens de vierde week na vaccinatie. Daarom is de vaccinstam slechts in enkele monsters waargenomen en met zo'n lage frequentie dat verspreiding van het *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccinstam HP-3276, na intramusculaire toediening ervan, als nagenoeg te verwaarlozen kan worden beschouwd.

c) Verspreiding van het *Actinobacillus pleuropneumoniae* HP-3276 stam in gevaccineerd dieren na intranasale toediening.

Deze studie werd uitgevoerd om de verspreiding van de *Actinobacillus pleuropneumoniae* HP-3276 vaccinstam in gevaccineerde varkens na intranasale toediening te evalueren en van deze gevaccineerde dieren weefselmonsters te verkrijgen als eerste passagemonsters om deze later te gebruiken in de test van de terugkeer tot virulentie.

De intranasale weg werd geanalyseerd, omdat dit de natuurlijke weg is waarlangs micro-organismen het lichaam kunnen binnengaan en het zou dus de meest waarschijnlijke weg zijn die zou leiden tot terugkeer tot virulentie.

Voor de studie werden 5 groepen van twee acht weken oude varkens elk gevaccineerd met de uitgangsstam van de App vaccinstam HP-3276. Alle dieren kregen een tienvoudige overdosis.

De doelstelling van het eerste deel van deze studie was een analyse van de meest waarschijnlijke periode en organen van waaruit de vaccinstam na intranasale toediening zou kunnen worden teruggewonnen. Met dit doel werd op vooraf bepaalde intervallen sectie op de dieren en de verzameling monsters verricht.

Bovendien werden algemene klinische signalen vastgelegd, evenals lichaamstemperatuur voor vaccinatie, 4 uur daarna en dagelijks gedurende de bestudeerde tijd om de veiligheid van de vaccinstam te kunnen analyseren.

Geen relevante klinische signalen werden waargenomen gedurende de gehele bestudeerde periode, hoewel één dier van groep 1 koorts en lichte dyspnoe vertoonde 4 uur na vaccinatie. Hoewel de symptomatologie in dit dier 1 dag na vaccinatie niet langer werd waargenomen, hebben we het laten inslapen en bij sectie werd bevestigd dat geen App laesies werden waargenomen.

Met betrekking tot de verspreiding van de vaccinstam kwamen de resultaten van deze studie overeen met die welke uit de vorige waren verkregen, aangezien in beide gevallen, zowel via intranasale als intramusculaire weg, verspreiding van de vaccinstam erg zwak was.

Met betrekking tot het andere doel van deze studie werden drie positieve monsters tot HP-3276 stam verkregen en een aantal van deze monsters is later gebruikt om de bestudering van terugkeer tot virulentie voort te zetten.

Bovendien stellen de verkregen resultaten ons in staat om de conclusie te trekken dat de vaccinstam, indien deze intranasaal wordt toegediend, kan worden teruggewonnen uit de tonsillen en neus- en speekselklieren tijdens een periode van minder dan 3 dagen na vaccinatie. Deze informatie werd betrokken bij de voorbereiding van de studie van terugkeer tot virulentie.

d) Studie van terugkeer tot virulentie van de HP-3276 *Actinobacillus pleuropneumoniae* vaccinstam.

Het doel van deze studie was het onderzoek naar mogelijke terugkeer tot of toename in virulentie van de App vaccinstam HP-3276 na meerder passages in doeldieren.

In deze studie werden drie dieren per groep gebruikt. Slechts vier groepen waren nodig, omdat de vaccinstam verder niet was teruggewonnen. De gebruikte dieren hadden de minimumleeftijd welke is aanbevolen in de 'Samenvatting van productkenmerken' (8 weken).

Gebruikt werd gemaakt van de vaccinstam die uit de vorige studie was herwonnen. Desondanks werd de eerste passage verkregen uit monsters van dieren die waren gevaccineerd via intranasale weg met een tienvoudige overdosis van de uitgangsstam. Bij de volgende passages moeten vaccinaties via intranasale route worden uitgevoerd en moeten uitstrijkmonsters van tonsillen en neus- en speekselklieren van deze organen worden genomen 1 tot 3 dagen na vaccinatie. Sectie moet 3 dagen na vaccinatie worden uitgevoerd en ook dienen weefselmonsters te worden genomen.

De aanwezigheid van de vaccinstam in neus- en speekselklieren (spuug) en tonsilmonsters werd geanalyseerd door middel van een kweek van uitstrijkmonsters op verschillende middeldikke platen, gevolgd door PCR om de vaccinstam te identificeren.

In geval van herwinning zou het herwonnen materiaal na iedere passage worden gebruikt als inoculum voor de volgende passage en dit werd ook via intranasale weg toegediend.

Passages dienden te worden ondernomen zolang de vaccinstam geïsoleerd was. Indien er geen herwinning was, diende een herbevestiging te worden uitgevoerd door de laatste herwonnen passage aan 11 dieren toe te dienen.

Bovendien moesten algemene klinische signalen en lichaamstemperatuur worden vastgelegd voor elke vaccinatie, 4 uur daarna en dagelijks gedurende de bestudeerde periode teneinde de veiligheid van de vaccinstam te analyseren. Bij sectie werden bij alle dieren longlaesies geanalyseerd.

De vaccinstam kon na inoculatie van de eerste passage naar dieren van groep B3 niet worden herwonnen, dus werd de test met 11 dieren (groep B11) herhaald. Het experiment werd op dit punt als afgerond beschouwd, aangezien na inoculatie van de eerste passage in groep B11 hetzelfde resultaat werd verkregen.

De verkregen resultaten laten zien dat in geen van de dieren van beide groepen (B3 en B11) koorts of klinische symptomatologie na toediening van de herwonnen passage 1 werd waargenomen. Bovendien waren in de longen van geen van de dieren van alle groepen de typische App laesies aanwezig.

Daarbij komt dat de onmogelijkheid om de vaccinstam te herwinnen uit geen van de geteste organen of lichaamsvloeistoffen van de dieren waarbij inoculatie met de eerste passage had plaatsgevonden, aangeeft dat de transmissie van de vaccinstam van gevaccineerde op niet-gevaccineerde dieren beperkt is en de waarschijnlijkheid van terugkeer tot virulentie als nihil wordt beschouwd. De algehele resultaten betreffende rectale temperaturen, klinisch signalen, longonderzoeken en herwinning van vaccinstam recovery verkregen in dieren met inoculatie met de eerste passage, stellen ons in staat te bevestigen dat de vaccinstam HP-3276 geen toename of terugkeer tot virulentie vertoont.

Evaluatie van de werkzaamheid onder laboratoriumcondities

Tot op heden is de volgende laboratoriumtest op de werkzaamheid of PB-116 uitgevoerd.

Bestudering van de werkzaamheid van het PB-116 bacterieel levend vaccin tegen infectie met *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2.

Het doel van deze studie was de werkzaamheid aan te tonen van het vaccinatieplan van het PB-116 vaccin tegen pleuropneumonie veroorzaakt door *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2. Er werden in totaal 30 acht weken oude varkens gebruikt.

De helft van de dieren werd via intramusculaire weg gevaccineerd volgens het vaccinatieplan. De andere groep van 15 dieren kreeg steriele PBS toegediend en functioneerde als controlegroep. Na elke vaccinatie werden de varkens gedurende 21 dagen geobserveerd.

Drie weken na de laatste vaccinatie werd aan alle varkens bij wijze van proefbesmetting via intranasale weg een passende hoeveelheid *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2 stam toegediend, virulent genoeg om de typische signalen van de ziekte te doen ontstaan.

Na de proefbesmetting werden de dieren gedurende 7 dagen geobserveerd en elke dag werden algemene klinische signalen vastgelegd. Ernstig zieke controledieren werden afgemaakt om onnodig lijden te voorkomen. Aan het eind van de observatieperiode lieten we alle overlevende dieren inslapen en werd een postmortaal onderzoek van de longen verricht.

De parameters om de werkzaamheid van het vaccin te analyseren waren de reductie in longlaesies, klinische signalen en sterfte in de gevaccineerde groep in vergelijking met de niet-gevaccineerde groep.

Met betrekking tot de veiligheidsgegevens die uit deze studie zijn verkregen kan, zoals eerder opgemerkt bij de veiligheidstests, na vaccinatie een lichte verhoging van de rectale temperatuur worden waargenomen, maar deze tijdelijke stijgingen verdwenen altijd spontaan en zonder behandeling binnen 24 uur. Verder veroorzaakte de toediening van twee dosissen van PB-116 vaccin slechts een lichte ontsteking op de inoculatieplek bij zeer weinig dieren, welke binnen 24 uur verdween. Wat betreft systemische reacties vertoonden enkele dieren enige prostratie tussen 4 en 6 uur na vaccinatie, welke 24 uur na de toediening van PB-116 niet meer werd waargenomen.

Klinische signalen na proefbesmetting waren duidelijk milder in de gevaccineerde groep in vergelijking met de controlegroep, waarin alle dieren duidelijk waren aangetast. Hetzelfde patroon werd waargenomen met betrekking tot longlaesies bij het postmortale onderzoek. Bovendien vond sterfte alleen plaats in de niet-gevaccineerde groep.

Daarom verschilde de gevaccineerde groep significant van de niet-gevaccineerde groep als het gaat om sterfgevallen en aantallen longlaesies. Deze resultaten laten het beschermende effect zien van het PB-116 vaccin tegen pleuropneumonie bij varkens veroorzaakt door *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2.

Kennis en ervaring opgedaan in voorgaande ontwikkelingsactiviteiten

De *Actinobacillus pleuropneumoniae* HP-3276 stam is gebruikt voor studies in besloten omstandigheden om de werkzaamheid en veiligheid ervan als vaccin voor varkens te analyseren. De resultaten van deze experimenten zijn samengevat in de vorige paragrafen. In het kort komt het erop neer dat geconstateerd werd dat de gemodificeerde stam in staat is bescherming te bieden tegen virulente *Actinobacillus pleuropneumoniae* infecties, terwijl bevestiging werd gevonden voor de veiligheid van een overdosis en van herhaalde toediening van één enkele dosis van het vaccin, een zeer beperkt vermogen voor transmissie van de levend vaccinstam van gevaccineerde op niet-gevaccineerde dieren, een zeer lage verspreiding van de stam in de gevaccineerde dieren en de constatering dat de vaccinstam niet terugkeert tot virulentie.

Toekomstige activiteiten

De geplande test houdt in een doelbewuste introductie van de vaccinstam door intramusculaire inoculatie bij mestvarkens van verscheiden boerderijen, in het bijzonder in gebouwen met geschikte isolatiemiddelen. Intramusculaire toediening is de gebruikelijke vaccinatievorm bij varkens. Het is ook de methode die gebruikt wordt bij gecontroleerde laboratoriumproeven (veiligheid- en werkzaamheidsproeven zijn hierboven beschreven.)

Het doel van doelbewuste introductie is een bevestiging van de veiligheid (ontbreken van schadelijke bijeffecten) en werkzaamheid (bescherming van dieren die zijn gevaccineerd tegen pleuropneumonie bij varkens) van de *Actinobacillus pleuropneumoniae* stam HP-3276 (zie gedetailleerd protocol bij het Klinische proef protocol , referentie CD-2008-CB-003).

Deze studie betekent een stap vooruit in de ontwikkeling van dit vaccin. Uiteindelijk, wanneer alle gegevens verzameld zijn, zal bij de Europese autoriteiten een vergunning tot het op de markt brengen van het vaccin worden aangevraagd.

VOORDELEN

Vershillende benaderingen werden verworpen tijdens de ontwikkeling van het product PB-116 tot het verkrijgen van een levend vaccin dat met succes de vereiste reactie oproept tegen de infectie met een minimum aan schadelijke effecten. Zoals is aangetoond door de beschikbare werkzaamheidsgegevens, betekent de toediening van het vaccin volgens de aanbevolen gebruiksaanwijzingen een belangrijke vermindering van de klinisch signalen, longlaesies en sterfte bij gevaccineerde varkens.

RISICO'S

Drie aspecten dienen te worden onderzocht bij een analyse van het gebruiksrisico van een vaccin: veiligheid voor het milieu en het dier en de openbare veiligheid.

Impact van het gebruik van PB-116 op het milieu

In geval van onregelmatig gebruik van het PB-116 vaccin zou het enige ingrediënt dat milieuproblemen kan veroorzaken de actieve component van het vaccin zijn, de HP-3276 stam van *Actinobacillus pleuropneumoniae*. De mogelijkheid dat sprake is van blootstelling in het milieu, is te verwaarlozen indien men de volgende factoren in aanmerking neemt:

A - De aanbevolen intramusculaire wijze van toediening voorkomt verspreiding van het vaccin onmiddellijk na toediening, welke niet plaatsvindt bij andere wijzen van toediening zoals de intranasale toediening of verneveling, welke een risico voor andere diersoorten kunnen vormen door de onvermijdelijke verspreiding.

B – Door de lage persistentie van stam HP-3276 bij gevaccineerde dieren kan het slechts zelden worden geïsoleerd uit gevaccineerde dieren. Dus verspreiding via de intramusculaire weg kan feitelijk als nihil worden beschouwd.

C - Hoewel de vaccinstam een paar dagen kan standhouden bij gevaccineerde varkens, bestaat er geen mogelijkheid voor transmissie op andere varkens die in contact komen met voornoemde varkens, aangezien het zich niet verspreidt tot niet-gevaccineerde varkens (controledieren) die in contact komen met gevaccineerde varkens. Dit geeft verder aan dat, indien de inoculatie correct is verricht, er geen sprake kan zijn van verspreiding van het antigeen in het milieu. Tenslotte is het risico van transmissie op andere diersoorten eveneens erg laag zolang het vaccin wordt gehanteerd overeenkomstig de aanbevelingen vervat in de 'Samenvatting van productkenmerken'.

Mogelijkheid dat de HP-3276 vaccinstam de pathogenese van andere ziektes bij dier en mens beïnvloedt.

Het PB-116 vaccin zou geen enkel probleem moeten vormen bij soorten andere dan de doelsoorten, zolang de instructies die bij de verpakking zijn gevoegd, worden opgevolgd, terwijl, zoals hierboven vermeld, de enige transmissiemogelijkheid is die door onvoorziene inoculatie.

In geval van onvoorziene introductie van de vaccinstam HP-3276 in het milieu zou het noodzakelijk zijn te discussiëren over de mogelijkheid of deze stam ziekte veroorzaakt bij andere diersoorten en mensen.

De kans dat de stam betrokken raakt bij de pathogenese van een menselijke ziekte is non-existent. Men gaat er van uit dat de mens niet vatbaar is voor infectie met *Actinobacillus pleuropneumoniae*. Infectie is niet aangetoond noch door virusisolatie noch door serologie in verdachte gevallen. Kortom, tot op heden is niet aangetoond dat menselijke wezens gastheer zijn voor *Actinobacillus pleuropneumoniae*, en dus zou de HP-3276 stam welke gebruikt wordt in de bereiding van PB-116, niet pathogeen voor mensen zijn.

Wat betreft de mogelijkheid dat het vaccinvirus van invloed is op de pathogenese van dierziekten, hoewel het organisme is verspreid over vijf werelddelen, is het aantal gastheren beperkt: seroconversie is niet aangetoond bij geen enkel in het wild levende soort en klinisch signalen zijn alleen bij varkens opgemerkt; daarom ligt het niet in de verwachting dat de HP-3276 stam enige klinische symptomen bij andere dieren behalve varkens zou veroorzaken.

Aan de andere kant is blootstelling van andere soorten door een andere oorzaak dan het gebruik van besmette naalden hoogst onwaarschijnlijk, aangezien de vaccinstam niet zich niet verspreidt.

MAATREGELEN TEN AANZIEN VAN BEHEERSING, CONTROLE EN BEWAKING

Controle van de verspreiding van GGO en gen

Op basis van de gegevens van de uitgevoerde studies kan worden gesteld dat de mogelijkheid van verspreiding in het milieu van de vaccinstam HP-3276 te verwaarlozen is, mits de persoon die het vaccin toedient de instructies en voorzorgsmaatregelen die zijn gespecificeerd in de folder bij de verpakking in acht neemt, en zelfs in geval van onbedoelde blootstelling, zou het zeer onwaarschijnlijk zijn dat het in het milieu terecht komt, aangezien de stam zich niet verspreidt.

Genetische stabiliteit van het GGO

De genetische stabiliteit van de HP-3276 stam is getest door het uitvoeren van 5 seriële subculturen in een specifiek medium en extractie van genetisch materiaal bij elke passage. Vervolgens werd differentiële PCR-techniek gebruikt om te ontdekken of sprake was van een terugkeer naar het originele genotype bij een van de passages.

Identificatie van het recombinante gen vindt plaats door middel van een PCR-reactie die een fragment van de mutante versie van een van de genen die aanwezig is in de gemodificeerde stam vergroot. Alle passages vertonen de vergroting van een fragment dat overeenkomt met het fragment van de mutante versie van het gen dat aanwezig is in de gemodificeerde stam, waardoor de genetische stabiliteit ervan is aangetoond.

Bovendien bevestigde de identificatie van de vaccinstam na de eerste passage die werd uitgevoerd in de studie van terugkeer tot virulentie ook de genetische stabiliteit van de vaccinstam.

Genetische recombinatie is een fenomeen dat in de natuur spontaan kan ontstaan tussen virulente veldstammen en tussen veldstammen en vaccinstammen. Terwijl melding is gemaakt van recombinatie tussen virale stammen op varkensboerderijen onder natuurlijke omstandigheden, is in geen van de gevallen spontane genetische recombinatie tussen bacteriën of tussen bacteriën en virussen aangetoond.

Met betrekking tot de stam waarmee wij ons bezighouden, ligt recombinatie met andere stammen niet in de lijn der verwachting gezien de korte persistentie van de stam in gevaccineerde varkens en de onmogelijkheid te worden geïsoleerd van de eerste uitgevoerde passage.

Voor het geval dat spontane genetische recombinatie tussen twee bacteriële stammen zou plaatsvinden, is het echter essentieel dat hetzelfde doelweefsel gelijktijdig geïnfecteerd werd door twee verschillende stammen, onafhankelijk van de vraag of het geattenuerde of virulente stammen betreft.

In geval van vaccinatie met een vaccinstam is het onmogelijk te constateren of een dier daarvoor latent was geïnfecteerd met een virulente stam. Om dit te kunnen constateren zou het noodzakelijk zijn om alle varkens van één boerderij voor enige tijd een immunosuppressieve behandeling te laten ondergaan en zelfs dan zou het in de meeste gevallen niet mogelijk zijn dit te ontdekken. Vandaar dat er altijd het risico bestaat dat een varken dat latent is geïnfecteerd wordt gevaccineerd, ongeacht het gebruikte vaccin.

Desondanks hebben enkele auteurs, zoals Henderson et al., 1991, opgemerkt dat, “De recombinanten die worden verkregen door recombinitie van vaccinstammen met virulente stammen niet virulenter lijken te zijn dan veldstammen of dan de ouderstam waaruit de recombinant is voortgekomen, want zij behouden de werkzame kopieën van alle bekende virulentiegenen”. “Daarom”, vervolgen de auteurs, “Brengt recombinitie geen supervirulente stammen voort”.

Met betrekking tot de mogelijkheid van een genetisch recombinities tussen vaccinstammen en virulente veldstammen in dieren met immunosuppressie zijn momenteel in de wereldliteratuur geen gegevens beschikbaar. We begrijpen echter dat genetische recombinitie in elk van de gevallen kan voorkomen, zowel in gezonde dieren als in dieren met immunodeficiëntie en dat, hoewel immunosuppressie van dieren kan fungeren als een factor die de replicatie van bacteriën in de doelweefsels van het dier vergemakkelijkt, het - in ieder geval - de mogelijkheid van recombinitie bevordert of vermindert, aangezien de twee fenomenen onderling afhankelijk zijn.

Daarom kan de mogelijkheid van genetische recombinitie van de vaccinstam HP-3276 met andere stammen als te verwaarlozen worden beschouwd.

Tenslotte, indien zich ondanks alle factoren een spontane recombinitie voordoet, is het onwaarschijnlijk dat de stam HP-3276 onverwachte eigenschappen laat zien, gezien het feit dat het geen genetische sequenties in zich heeft die door andere micro-organismen zijn gedoneerd welke zouden kunnen leiden tot fenomenen van genetische recombinitie en uiting van onverwachte eigenschappen.

Vernietiging van GGO controlemateriaal

Glazen flacons, injectiespuiten, naalden, buisjes en ander materiaal dat in contact komt met het GGO wordt gesteriliseerd door verbranding op de boerderij zelf.

Trainingsvereisten

De dierenarts die het vaccin zal toedienen, heeft een rijke ervaring in het intramusculair vaccineren van varkens. Deze persoon zal worden getraind in het omgaan met het recombinant-vaccin en in het ontsmetten van de omgeving van de vaccinatie in geval van morsen van het vaccin.

Noodsituaties

1. Methodes en procedures voor het controleren van GGO's in geval van onverwachte verspreiding.

In het onwaarschijnlijke geval van ongecontroleerde verspreiding van GGO's moeten alle dieren op de boerderij worden geslacht en alle gebouwen moeten worden gefumigeerd met een oplossing van 10% formaldehyde. Nieuwe dieren mogen pas tenminste 15 dagen na het spuiten worden toegelaten.

2. Methodes voor ontsmetting van besmette gebieden, bij voorbeeld de verdelging van GGO's.

De geslachte dieren moeten door verbranding worden vernietigd. Een oplossing van 10% formaldehyde (een chemisch middel dat geschikt is voor het inactiveren van het GGO) moet op de boerderij plaatselijk worden aangebracht. Ultraviolet licht van zonlicht zou bijdragen aan het onschadelijk maken van de vaccinstam vanwege de bacteriedodende eigenschappen van dit organisme.

3. Methodes voor verwijdering of verwerking van planten, dieren, grond, etc., die zijn blootgesteld gedurende of na de verspreiding.

De procedures die moeten worden gevolgd met betrekking tot dieren op de boerderij en de effecten van ultraviolet licht (zonlicht) garanderen dat het GGO op gepaste wijze wordt verwijderd, indien dit noodzakelijk zou zijn.

4. Methodes van isolatie van het gebied dat getroffen is door de verspreiding.

Door de kenmerken van de boerderijen en de eigenschap van slechte verspreiding van deze bacterie die intramusculair wordt toegediend, is isolering van het gebied vanaf het begin van de proef gegarandeerd. Om deze redenen wordt de isolatiemethode geschikt bevonden in geval van een onverwachte verspreiding.

5. Plannen voor bescherming van de volksgezondheid en het milieu in geval van een ongewenst effect.

Om de redenen die hierboven uiteen zijn gezet, in het bijzonder de afwezigheid van infectie door *Actinobacillus pleuropneumoniae* in de menselijke of andere soorten behalve varkens, en de beperkte persistentietijd van het GGO, wordt geen potentieel gevaar voor de mens of het milieu in het algemeen verwacht. Ondanks dat dit buitengewoon onwaarschijnlijk zou zijn, zouden de enige ongewenste effecten zich theoretisch kunnen voordoen in de doeldieren. In geval van een noodsituatie worden deze verwijderd.

Overige maatregelen ter beheersing, control en bewaking

Niet van toepassing.

Verantwoordelijkheden van de kennisgever

De toestemming die aan de kennisgever kan worden gegeven door de bevoegde Minister bepaalt dat de kennisgever volledig civiel aansprakelijk is met betrekking tot de schade die kan worden veroorzaakt bij doelbewuste introductie aan gezondheid van mens, dier en milieu.

Inspectie door de overheid

Inspecteurs zijn belast met de inspectie van de proeven met betrekking tot naleving van de voorwaarden die in de vergunning zijn beschreven en met onderzoek naar eventuele inbreuken op de vergunning. Indien wanbeheer of fraude wordt geconstateerd, zullen specifieke sancties worden opgelegd.

Activiteitenrapport

Aan het eind van de proef dient aan de bevoegde autoriteit een activiteitenrapport te worden overhandigd dat is opgesteld door de kennisgever. Dit activiteitenrapport omvat tenminste de volgende gegevens:

- De locatie en periode van introductie.
- De exacte aard van de daadwerkelijk geïntroduceerde GGO's.
- De doelstelling van de proef.
- De maatregelen die zijn genomen om ongewenste introductie van transgenetisch materiaal te voorkomen.
- Indien van toepassing, de maatregelen die zijn genomen om het subject (patiënt/dier) te beschermen gedurende de toediening van het bestudeerde geneesmiddel dat GGO bevat.
- Indien van toepassing, de maatregelen die zijn genomen om de familieleden van de behandelde patiënten te beschermen.
- De maatregelen die zijn genomen om de werknemers te beschermen die het materiaal dat GGO bevatte moesten hanteren.
- De methode die is gebruikt voor vernietiging van het gebruikte of besmette materiaal.
- De resultaten die tijdens de proef zijn behaald.
- Een overzicht van het bewaken van patiënt/dier met betrekking tot GGO verspreiding.
- Een overzicht van het bewaken van GGO of recombinant DNA in het milieu.

REFERENTIE

Henderson, L. M., Levings, R. L., Davis, A. J., Sturtz, D. R. 1991. "Recombinatie of Pseudorabies virus vaccinstams is swine". Am. J. Vet. Res., vol 52, nr. 6, pags. 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 late 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

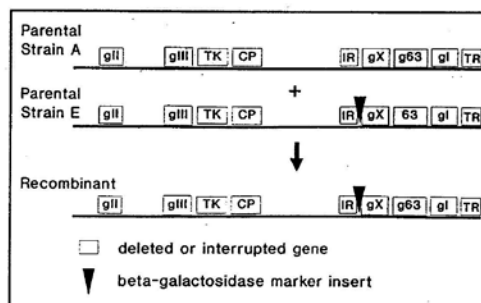


Figure 1—Diagrammatic map of parental pseudorabies virus (PRV) vaccine strains and potential recombinant with restored virulence and the same negative immunologic markers as vaccine strains.

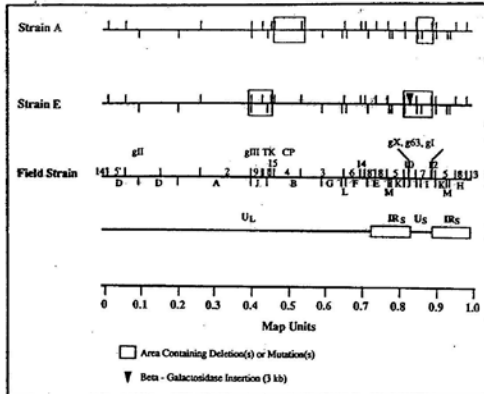


Figure 2—Restriction maps of parental vaccine strains A and E and a field strain of PRV. Areas between upward marks represent *Bam*HI fragments and areas between downward marks represent *Kpn*I fragments. Distances are given in map units.

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 10^6 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).

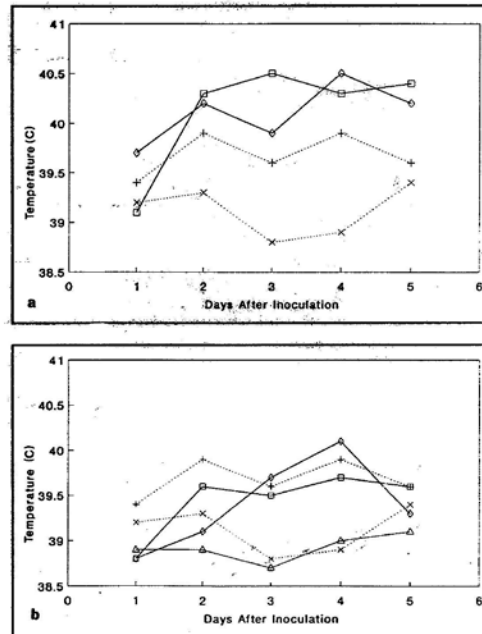


Figure 3—Mean daily temperatures of pigs following IM co-inoculation (a) and IM-ON and ON-ON co-inoculation (b). Temperatures are means of 3 or more pigs. Temperatures of control pigs are means of all clinically normal contact controls.

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	-	+
	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	+	-
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.

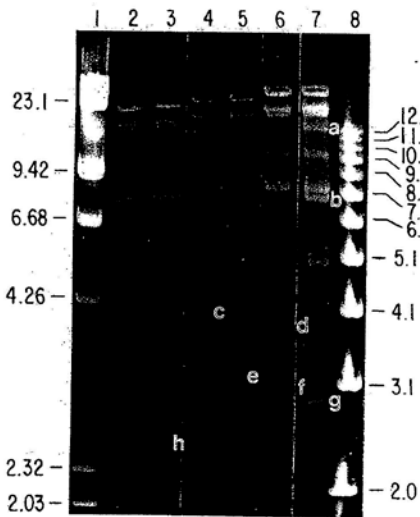


Figure 4—*Bam*HI restriction endonuclease patterns of parental and recombinant viruses. Lane 1: lambda *Hind*III standards. Lane 2: parental strain A. Lane 3: brain isolate from litter AA on inoculant. Lane 4: brain isolate from litter MM inoculant. Isolate differs from parental strain A at bands c and 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