

IMPIEGO DI *METAPNEUMOVIRUS AVIARE* (AMPV) COME POSSIBILE VACCINO VIVO RICOMBINANTE PER L'ESPRESSIONE DI PROTEINE IMMUNOGENE DEL CORONAVIRUS DELLA BRONCHITE INFETTIVA

Falchieri M.¹, Lupini C.², Cecchinato M.³, Listorti V.², Catelli E.², Kontolaimou M.², Naylor C.J.¹

¹*Department of Infection Biology Institute of Infection and Global Health - Faculty of Health and Life Sciences, Leahurst Campus, University of Liverpool CH64 7TE - UK;*

²*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna - Via Tolara di Sopra, 50 40064 Ozzano Emilia (BO) - Italia;*

³*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università degli Studi di Padova Agripolis - Viale dell'Università, 16; 35020 Legnaro (PD), Italia.*

Summary

The study investigates the ability of subtype A Avian metapneumovirus (AMPV) to accept foreign genes and be used as a vector for delivery of Infectious bronchitis virus (IBV) QX genes to chickens. Initially the GFP gene was added to AMPV at all gene junctions in conjunction with the development of cassetted full length DNA AMPV copies. After 3 recombinant viruses had been recovered by reverse genetics, GFP positions supporting gene expression while maintaining virus viability *in vitro*, were determined. Subsequently, either S1 or nucleocapsid (N) genes of IBV were positioned between AMPV M and F genes, while later a recombinant was prepared by inserting S1 and N at AMPV MF and GL junctions respectively. Immunofluorescent antibody staining showed that all recombinants expressed the inserted IBV genes *in vitro* and furthermore, all recombinant viruses were found to be highly stable during serial passage. Eyedrop inoculation of chickens with some AMPV-IBV recombinants at one-day-old induced protection against virulent IBV QX challenge 3 weeks later, as assessed by greater motility of tracheal cilia from chickens receiving the recombinants. Nonetheless evidence of AMPV/IBV seroconversion, or major recombinant tracheal replication, were largely absent.

INTRODUZIONE

Avian metapneumovirus (AMPV) è un virus ad RNA appartenente alla famiglia delle *Paramyxoviridae* ed al genere *Metapneumovirus*. E' causa nel tacchino di un'infezione delle prime vie respiratorie, mentre nel pollo è responsabile di forme respiratorie più lievi. Sono stati sino ad ora individuati 4 sottotipi di AMPV (A, B, C e D), diversi tra loro dal punto di vista genetico, biologico e sierologico. Il genoma di AMPV comprende 8 geni (3'-N-P-M-F-M2-SH-G-L-5') ed ha una lunghezza di circa 13.5 kb (Easton *et al.*, 2004). Tecniche di *reverse genetics* (RG), recentemente messe a punto per AMPV sottotipo A (Naylor *et al.*, 2004) e C (Govindarajan *et al.*, 2006) hanno fornito uno strumento prezioso per la modifica *in vitro* del genoma virale e sono state sino ad ora utilizzate per vari scopi. Utilizzando la RG sono stati prodotti *in vitro* AMPV ricombinanti con mutazioni puntiformi, delezioni o inserzioni di geni reporter; di questi virus è stata inoltre valutata la capacità replicativa *in vivo* (Govindarajan *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2008; Naylor *et al.*, 2010; Brown *et al.*, 2011). Al momento non sono però

ancora disponibili informazioni sulla capacità del genoma di AMPV di accettare geni eterologhi appartenenti ad altri agenti virali, né sulla stabilità genetica del genoma di AMPV in tal modo modificato.

Il presente studio riporta l'inserzione nel genoma di AMPV di due diversi geni del *Coronavirus* agente eziologico della Bronchite infettiva (IBV). Si tratta di uno dei principali patogeni del pollo che, come AMPV, primariamente colpisce il tratto respiratorio, anche se è in grado di causare malattia anche a livello dell'apparato renale e riproduttivo. Il ceppo di IBV utilizzato in questo studio appartiene al genotipo QX, variante di recente emergenza in Europa (Worthington and Jones, 2008) e causa di notevoli perdite economiche per la sua capacità di eludere la risposta immunitaria stimolata dai vaccini attualmente in uso. In particolare sono stati scelti il gene S1 che codifica per l'omonima proteina di superficie, principale determinante antigenico di IBV (Cavanagh, 2007), ed il gene N che codifica per la proteina del nucleocapside. Di quest'ultima è stata già dimostrata la capacità d'indurre immunità protettiva (Seo *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2010).

Per verificare in quale posizione del genoma l'espressione di proteine eterologhe sia maggiore, inizialmente sono stati prodotti AMPV ricombinanti codificanti la *Green Fluorescent Protein* (GFP), che è stata inserita nelle diverse regioni intergeniche disponibili. Successivamente sono stati preparati diversi AMPV ricombinanti codificanti per le proteine S1 e/o N di IBV. I virus ricombinanti ottenuti sono stati inoculati in polli SPF in due diversi esperimenti per valutare la loro capacità d'indurre una risposta immunitaria protettiva in seguito ad infezione sperimentale con IBV mediante il test della motilità ciliare. La replicazione virale è stata valutata mediante real time RT-PCR (qRT-PCR) e la risposta immunitaria umorale specifica per IBV ed AMPV mediante test ELISA ed inibizione dell'emoagglutinazione (HI).

MATERIALI E METODI

Inserzione di GFP nel genoma di AMPV

Il plasmide contenente la copia in DNA (cDNA) dell'intero genoma di un ceppo AMPV sottotipo A (virus A) è stato modificato mediante la metodica di *site direct mutagenesis* in modo tale da inserire un sito di restrizione in ciascuna regione intergenica non codificante. Sono così stati ottenuti 7 plasmidi, ciascuno con il sito di restrizione in posizione differente corrispondente alle 7 regioni intergeniche. Dopo taglio enzimatico è stato inserito in ogni cDNA il gene che codifica per GFP. L'avvenuta ligazione, dopo trasformazione batterica, è stata verificata mediante screening delle singole colonie con specifiche PCR e successivo sequenziamento.

I virus ricombinanti sono stati ottenuti utilizzando la metodica di *reverse genetics* per AMPV messa a punto da Naylor *et al.* (2004). L'espressione della GFP è stata confermata mediante osservazione di fluorescenza al microscopio UV. La replicazione virale è stata valutata come titolo massimo ottenuto su cellule Vero dopo tre passaggi.

Inserzione dei geni S1 e/o N di IBV nel genoma di AMPV

Tre ceppi AMPV sottotipo A, a diverso grado di virulenza (denominati nel presente lavoro: vA; AvF e 309/04) sono stati utilizzati per preparare i plasmidi vettori nei quali inserire i gene S1 e/o N di IBV genotipo QX. L'inserzione del o dei geni nel genoma AMPV e la preparazione dei ricombinanti è stata eseguita seguendo le metodiche in

precedenza riportate per i ricombinanti AMPV GFP. In totale sono stati ottenuti 7 AMPV ricombinanti (Tabella 1). Per verificare la trascrizione del gene S1 e/o N inseriti sono state eseguite RT-PCRs specifiche per l'RNA messaggero (mRNA) (Brown *et al.*, 2011), mentre per verificare l'espressione delle proteine è stata eseguita immunofluorescenza (IF) su cellule Vero infettate con gli AMPV ricombinanti.

Prova *in vivo* di protezione al challenge con IBV

Per verificare la capacità immunogena nei confronti di IBV dei ceppi ricombinanti, sono state eseguite due prove sperimentali su polli SPF in condizioni di isolamento biologico.

Prova sperimentale 1. Settanta polli SPF di un giorno di vita sono stati suddivisi in 7 gruppi di 10 animali ciascuno. Nei primi 4 gruppi, gli animali sono stati inoculati per via oculare rispettivamente con i ceppi ricombinanti: A_{full S1 MF}, A vF_{full S1 MF}, A_{del S1 MF} e A vF_{del S1 MF} alla dose di 4 log₁₀ TCID₅₀. Un gruppo di controllo è stato inoculato con il ceppo AMPV AvF non modificato. Due altri gruppi sono stati tenuti come controllo, rispettivamente positivo e negativo, e sono stati inoculati con acqua sterile. Tre settimane dopo è stato eseguito il challenge come descritto più avanti.

Prova sperimentale 2. Sessanta polli SPF di un giorno di vita sono stati suddivisi in 6 gruppi di 10 animali ciascuno. Quattro di questi gruppi sono stati inoculati con i ceppi ricombinanti 309_{full S1 MF}, A vF_{full S1 MF + N GL}, A vF_{N MF} and A vF_{full S1 MF} per via oculare alla dose 4 log₁₀ TCID₅₀. I rimanenti due, tenuti come gruppi di controllo positivo e negativo, sono stati inoculati con acqua sterile.

Ventuno giorni dopo la vaccinazione (g.p.v.), tutti i gruppi, eccetto il gruppo di controllo negativo, sono stati sottoposti a challenge con un ceppo IBV genotipo QX alla dose di 4 log₁₀ TCID₅₀.

Al 4° ed al 6° giorno post infezione (g.p.i.) cinque animali per gruppo/giorno sono stati soppressi per prelevare la trachea e valutare la motilità ciliare (vedi paragrafo seguente). In entrambe le prove, gli animali sono stati quotidianamente monitorati per eventuale comparsa di sintomatologia clinica, sia post-vaccinazione che post-infezione.

Al 18° g.p.v., dagli animali sono stati prelevati campioni di sangue da sottoporre a test ELISA per IBV e AMPV e a test HI per IBV. A 3, 6, 9 g.p.v. sono stati eseguiti tamponi rinofaringei per valutare la replicazione *in vivo* dei ricombinanti mediante qRT-PCR (Cecchinato *et al.*, 2011).

Valutazione della motilità ciliare

L'inoculazione di polli SPF con ceppi IBV di campo provoca infezione e danno dell'epitelio ciliare tracheale, che si può evidenziare al microscopio ottico con la perdita della motilità ciliare. Considerando questa caratteristica, la protezione indotta da un vaccino per IBV è misurabile dal mantenimento della motilità ciliare delle sezioni tracheali ottenute dai soggetti sottoposti ad infezione di prova (Frangipane and Jungback, 2004). La Farmacopea Europea prende proprio questo metodo come test di riferimento per la valutazione della protezione vaccinale per IBV.

In entrambe le prove sperimentali, al 4° e 6° g.p.i., dalle trachee prelevate dagli animali soppressi, sono state ottenute sezioni trasversali dello spessore di 1mm. Da ogni trachea sono stati selezionati 10 anelli (3 prelevati dalla parte prossimale, 4 dalla parte media e 3 dalla parte distale della trachea) ed esaminati al microscopio ottico rovesciato per determinarne la presenza/assenza di attività ciliare.

I risultati della motilità ciliare dei gruppi sperimentali sono stati analizzati mediante test *chi-quadro*; differenze con $p < 0.05$ sono considerate significative.

RISULTATI

Caratterizzazione dei ricombinanti AMPV+GFP

Sono stati ottenuti 7 virus ricombinanti ciascuno con il gene GFP inserito in una diversa regione intergenica. La maggiore replicazione virale (espressa come \log_{10} TCID₅₀/ml in cellule VERO) si è ottenuta con i ricombinanti in cui il gene GFP era inserito in regioni a valle del genoma virale. Quando il GFP è stato inserito a monte del genoma (fra i geni N e P) il titolo è risultato di $2,1 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, mentre in tutte le altre posizioni ha superato $4 \log_{10}$ TCID₅₀/ml, mostrando un picco massimo di $5 \log_{10}$ TCID₅₀/ml nella posizione fra M ed F. Nei monostrati cellulari in cui i ricombinanti sono stati ottenuti e replicati si è sempre osservata un'intensa fluorescenza legata all'espressione di GFP.

Caratterizzazione dei ricombinanti AMPV+IBV

I geni di IBV sono stati inseriti con successo nel cDNA. Da questi, mediante RG, sono stati ottenuti virus ricombinanti la cui presenza è stata resa evidente dall'effetto citopatico tipico di AMPV determinato nelle cellule Vero. RT-PCR sull'RNA messaggero virale ha confermato l'avvenuta trascrizione nei ricombinanti del gene S1 e/o N di IBV. L'espressione delle proteine S1 e/o N di IBV è stata confermata per tutti i ricombinanti mediante immunofluorescenza.

Sierologia e qRT-PCR

In generale non è stata rilevata risposta anticorpale significativa per IBV e AMPV nei gruppi sperimentali, sia con HI che con ELISA. La qRT-PCR per AMPV ha mostrato minima replicazione per tutti i virus ricombinanti con la sola eccezione del 309_{full S1 MF} che ha mostrato capacità di replicarsi nella maggior parte degli animali (Tabella 2).

Motilità ciliare dopo l'infezione di prova

Al 4° g.p.i. in tutte le sezioni tracheali ottenute dai gruppi sperimentali sottoposti ad infezione di prova, sia inoculati con i ricombinanti che di controllo, si è evidenziata ciliostasi completa.

Al 6° g.p.i., qualche sezione di trachea di animali vaccinati con ricombinanti ha mostrato motilità ciliare. Ciò è stato osservato nei gruppi AvF_{full S1 MF+N GL'}, AvF_{N MF} ed A_{S1 MF?} con percentuali decrescenti dal primo all'ultimo (Tabella 2). Le percentuali di motilità osservate in questi gruppi differivano significativamente rispetto a quelle osservate nei gruppi di controllo ($p < 0.05$).

Segni clinici e lesioni macroscopiche

Non è stata mai osservata sintomatologia clinica post-vaccinazione.

Al 6° g.p.i., nella prova 1, sono stati osservati sintomi clinici in un soggetto del gruppo di controllo positivo e due del gruppo AvF. L'esame necroscopico di questi soggetti ha evidenziato lesioni renali tipiche dell'infezione da IBV genotipo QX.

CONCLUSIONI

Il presente studio ha dimostrato la possibilità di generare ricombinanti AMPV sottotipo A in grado di veicolare il gene reporter GFP e geni eterologhi di IBV, ed esprimere

in modo stabile le corrispondenti proteine. Alcuni dei ceppi AMPV-IBV ricombinanti ottenuti, se inoculati in polli SPF al primo giorno di vita, sono stati in grado di conferire un certo grado di protezione al challenge con IBV genotipo QX. Tuttavia l'assenza di risposta immunitaria specifica e lo scarso titolo virale dei ricombinanti nelle prime vie respiratorie, indicano che il livello di replicazione virale è in genere molto scarso. Saranno necessari ulteriori approfondimenti volti a comprendere quali siano i fattori essenziali per l'induzione di una protezione efficace nei confronti di IBV e a migliorare le performance di AMPV come vettore di geni eterologhi.

BIBLIOGRAFIA

1. Brown PA, Lupini C, Catelli E, Clubbe J, Ricchizzi E and CJ Naylor. (2011).. A single polymerase (L) mutation in avian metapneumovirus increased virulence and partially maintained virus viability at an elevated temperature. *Journal of General Virology* 92:346-354.
2. Cavanagh D. (2007). Coronavirus avian infectious bronchitis virus. *Veterinary Research* 38:281- 297.
3. Cecchinato M, Lupini C, Mondin A, Muñoz Pogoreltseva OS, Listorti V and E Catelli. (2011). Development of Real Time RT-PCR Tests for Detection and Differentiation of Avian Metapneumovirus. 17th World Veterinary PoultryCongress – Proceedings, Cancun, México, 14-16 August 2011:334-341.
4. Easton AJ, J. Domachowske B, and HF Rosenberg. (2004). Animal pneumoviruses: molecular genetics and pathogenesis. *Clinical Microbiology Review* 17:390-412.
5. Frangipani J A, and C Jungback. (2004). Immunogenicity testing of vaccines against Avian Infectious Bronchitis - Comparison of several methods to demonstrate experimental infection. Proceedings IV International Symposium on Avian Corona- and Pneumovirus Infections: 202 - 212.
6. Govindarajan D, Buchholz UJ and SK Samal. (2006). Recovery of avian metapneumovirus subgroup C from cDNA: cross-recognition of avian and human metapneumovirus support proteins. *Journal of Virology* 80:5790-5797.
7. Ling R, Sinkovic S, Toquin D, Guionie O, Etteradossi N and AJ Easton. (2008). Deletion of the SH gene from avian metapneumovirus has a greater impact on virus production and immunogenicity in turkeys than deletion of the G gene or M2-2 open reading frame. *Journal of General Virology* 89:525-533.
8. Naylor CJ, Brown PA, Edworthy N, Ling R, Jones RC, Savage CE and AJ Easton. (2004). Development of a reverse-genetics system for Avian pneumovirus demonstrates that the small hydrophobic (SH) and attachment (G) genes are not essential for virus viability. *Journal of General Virology* 85:3219-3227.
9. Naylor CJ, Lupini C and P Brown. (2010). Charged amino acids in the AMPV fusion protein have more influence on induced protection than deletion of the SH or G genes. *Vaccine* 28:6800 - 6807.
10. Seo SHW, Smith LR and EW Collisson. (1997). The carboxyl-terminal 120-residue polypeptide of infectious bronchitis virus nucleocapsid induces cytotoxic T- lymphocytes and protects chickens from acute infection. *Journal of Virology* 71:7889-7894.

11. Worthington KJ, Currie RJ and RC Jones . (2008). A reverse transcriptase-polymerase chain reaction survey of infectious bronchitis virus genotypes in Western Europe from 2002 to 2006. *Avian Pathology* 37:247-257.
12. Yu D, Han Z, Xu J, Shao Y, Li H, Kong X and S. Liu. (2010). A novel B-cell epitope of avian infectious bronchitis virus N protein. *Viral Immunology* 23:189-199.

Tabella 1. AMPV ricombinanti codificanti geni di IBV.

Nome ricombinante	AMPV d'origine	Inserito IBV QX	Regione intergenica
A _{del S1 MF}	A	S1*	MF
A _{full S1 MF}	A	S1	MF
A vF _{del S1 MF}	A vF	S1*	MF
A vF _{full S1 MF}	A vF	S1	MF
A vF _{N MF}	A vF	N	MF
A vF _{full S1 MF + N GL}	A vF	S1+ N	MF + GL
309 _{full S1 MF}	309/04	S1	MF

* il gene S1 inserito mostrava una delezione di 15 nt

Tabella 2. Risultati della sierologia, della qRT-PCR e della motilità ciliare della prove sperimentali.

Gruppo	AMPV qRT PCR (g.p.v. ¹)	Sierologia (18 g.p.v.)			% anelli tracheali con motilità ciliare (g.p.i. ²)				
		AMPV		IBV	4	6			
		3	6	9			ELISA	HI	ELISA
Prova sperimentale 1	A _{del S1 MF}	4/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.*	0	20
	A _{full S1 MF}	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.	0	24
	A vF _{del S1 MF}	0/10	0/10	1/10	0/10	1/10	n.e.	0	0
	A vF _{full S1 MF}	0/10	0/10	0/10	0/10	2/10	n.e.	0	0
	A vF	0/10	0/10	5/10	2/10	0/10	n.e.	0	0
	C +	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.	0	0
	C -	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	n.e.	100	98
Prova sperimentale 2	A vF _{N MF}	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0	32
	A vF _{full S1 MF + N GL}	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0	40
	309 _{full S1 MF}	6/10	8/10	6/10	3/10	0/10	0/10	0	8
	A vF _{full S1 MF}	0/10	1/10	1/10	0/10	0/10	0/10	0	2
	C +	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0	4
	C -	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	0/10	100	100

1 giorni post vaccinazione

2 giorni post infezione

* non eseguito