

IDENTIFICAZIONE DI MARKER MOLECOLARI PER LA DIFFERENZIAZIONE DI UN VACCINO IBV GENOTIPO QX

Listorti V.¹, Laconi A.^{2,3}, Catelli E.¹, Cecchinato M.⁴, Lupini C.¹, Naylor C.J.²

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna, via Tolara di Sopra, 50, 40064 Ozzano Emilia (BO), Italia.

²Department of Infection Biology, Faculty of Health and Life Sciences, University of Liverpool, Leahurst Campus, CH64 7TE, Neston, United Kingdom.

³Department of Pathobiology, Faculty of Veterinary Medicine, Utrecht University, Yalelaan 1, 3584CL, Utrecht, The Netherlands.

⁴Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Agripolis, viale dell'Università 16, 35020, Legnaro (PD), Italia.

Summary

IBV genotype QX causes sufficient disease in Europe for several commercial companies to have started developing live attenuated vaccines. Here, one of those vaccines (L1148) was fully consensus sequenced alongside its progenitor field strain (1148-A) to determine vaccine markers, thereby enabling detection on farms. Twenty eight single nucleotide substitutions were associated with the 1148-A attenuation, of which any combination can identify vaccine L1148 in the field. Sixteen substitutions resulted in amino acid coding changes of which half were in spike. One change in the 1b gene altered the normally highly conserved final 5 nucleotides of the transcription regulatory sequence of the S gene, common to all IBV QX genes. No mutations can currently be associated with the attenuation process. Field vaccination strategies would greatly benefit by such comparative sequence data being mandatorily submitted to regulators prior to vaccine release following a successful registration process.

INTRODUZIONE

Il virus della bronchite infettiva aviaria (IBV) è diffuso in tutto il mondo e determina gravi perdite economiche nell'industria avicola. IBV colpisce principalmente il pollo, causando problemi respiratori, ed in alcuni casi, renali e riproduttivi (Jackwood and de Wit 2013). La malattia è controllata principalmente con l'uso di vaccini vivi attenuati. Durante il processo di attenuazione i vaccini vivi attenuati perdono la loro patogenicità, rimanendo tuttavia in grado di stimolare una risposta immunitaria protettiva nell'ospite (Bijlenga et al., 2004; Gelb et al., 1983). In campo circolano diversi genotipi di IBV e generalmente la vaccinazione con genotipo omologo determina un'ottima protezione.

Alcuni genotipi circolano per un periodo limitato di tempo (Jackwood 2012; de Wit et al., 2011), altri diventano endemici e richiedono la messa a punto di vaccini omologhi per il loro controllo. Il genotipo QX isolato per la prima volta in Cina e in seguito in Europa circa vent'anni fa (YuDong et al., 1998) e recentemente classificato come *lineage* GI-19 (Valastro et al., 2016), ha reso necessaria la produzione di vaccini omologhi.

La circolazione di ceppi vaccinali rende difficile stabilire l'effettiva prevalenza dei genotipi di IBV circolanti nelle diverse aree. Uno studio epidemiologico condotto

in Italia tra il 2012 e il 2014, ad esempio, ha dimostrato come, dopo la sospensione dell'impiego del vaccino 793B, non sia stato più possibile evidenziare questo genotipo di IBV in campo, supportando l'ipotesi che i ceppi circolanti fossero tutti di origine vaccinale (Franzo et al., 2014). Molte situazioni non sono così delineate ed un'indagine epidemiologica corretta può essere ostacolata dall'impossibilità di distinguere in maniera univoca tra i ceppi di campo ed i vaccini. L'impiego di tecniche molecolari ha reso questa differenziazione relativamente semplice, ma solo nel caso in cui ci sia possibilità di avere accesso ai ceppi progenitori da cui originano i vaccini. Il paragone tra le sequenze di un vaccino e del suo ceppo progenitore permette, infatti, di identificare i marker vaccinali, ovvero le mutazioni avvenute durante il processo di attenuazione, uniche di quello specifico vaccino.

Nel presente lavoro sono stati sequenziati per intero il genoma del ceppo vaccinale L1148 genotipo QX e del suo ceppo progenitore 1148-A. L'analisi delle mutazioni avvenute durante il processo di attenuazione ha portato all'identificazione dei marker vaccinali specifici, indispensabili per differenziare il ceppo vaccinale ed i ceppi di campo ed avere un quadro reale della circolazione del genotipo QX in campo.

MATERIALI E METODI

Estrazione dell'RNA virale, RT-PCR e sequenziamento

Sono state paragonate le sequenze del ceppo vaccinale commerciale QX-L1148 e del suo ceppo progenitore 1148-A, isolato su uova embrionate SPF.

L'RNA è stato estratto da entrambi i virus utilizzando il kit Qiamp viral RNA minikit (Quiagen, Hilden, Germany), seguendo le istruzioni fornite dal produttore. L'RNA è stato retro-trascritto utilizzando l'enzima Super Script III (Invitrogen, Carlsbad, USA) e successivamente amplificato utilizzando l'enzima Ranger (Bioline, London, UK). Per le reazioni sono stati seguiti i protocolli indicati dalle rispettive case produttrici. I primer utilizzati per la retro-trascrizione, l'amplificazione ed il sequenziamento erano stati precedentemente disegnati per il sequenziamento del genoma completo di IBV genotipo Q1 (Franzo et al., 2015). Primer specifici per il genotipo QX sono stati disegnati *ex novo* qualora necessario (tabella 1). Il sequenziamento è stato eseguito presso Source BioScience (Nottingham, UK). Sono state ottenute due sequenze per ciascuna regione analizzata. Nei punti in cui le sequenze del vaccino e del progenitore presentavano delle differenze, è stato ripetuto il sequenziamento partendo da una nuova retro-trascrizione, per confermare le differenze osservate.

RT-PCR della porzione 3' del genoma

La porzione 3' del genoma è stata sequenziata utilizzando un protocollo di 3'RACE precedentemente descritto (Laconi et al., 2016). L'RT è stata eseguita utilizzando un primer contenente 20 Timine (T) seguite da una sequenza *adaptor* nella sua porzione terminale 5'. Per la successiva amplificazione sono stati utilizzati 2 primer: il primer positivo disegnato su una sequenza localizzata all'interno del genoma, ed il negativo complementare alla sequenza dell'*adaptor*. Il prodotto di PCR è stato poi sequenziato utilizzando i primer complementari alla porzione amplificata, fino alla parte terminale del genoma costituita da una serie di ripetizioni del nucleotide Adenina (A) (tabella 1).

Analisi di sequenza

I cromatogrammi sono stati analizzati utilizzando il programma Crhomas (<http://technelysium.com.au/wp/chromas/>) e le sequenze allineate utilizzando Bioedit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>). È stata poi fatta un'analisi predittiva delle *Open Reading Frames* (ORF) utilizzando il programma ORF finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

Numeri di Accesso di GenBank

Le sequenze del ceppo vaccinale L1148 e del suo ceppo progenitore 1148-A sono state depositate nel database GenBank rispettivamente con i numeri di accesso KY933090 e KY933089.

RISULTATI

È stata ottenuta una sequenza consenso di 27.573 nt per entrambi i virus, mancante di circa 100 nt nella parte 5' UTR del genoma. L'analisi ha predetto la seguente organizzazione del genoma: 5'UTR-1a-1b-S-3a-3b-E-M-4b-4c-5a-5b-N-6b-3'UTR, con 13 ORFs per entrambi i virus. Sono state determinate le sequenze regolatrici della trascrizione (TRS), composte da 8 nucleotidi ciascuna, ad esclusione di quella *leader* posta nell'estremità 5' del genoma (tabella 2). L'allineamento delle due sequenze ha mostrato un'identità del 99,8%. Tra la sequenza del ceppo progenitore e del vaccino sono state evidenziate 28 differenze nucleotidiche. In particolare, con riferimento alla sequenza del vaccino, sono state identificate undici mutazioni nucleotidiche nel gene 1a-1b, 8 nel gene S, 2 nella regione 5'UTR, 2 nella regione 5b e 2 nella regione 3'UTR, una mutazione nella regione E, una nella regione M ed una nella regione 5a (tabella 3). Delle 28 mutazioni nucleotidiche osservate, 8 sono silenziose, 4 localizzate in regioni non codificanti e 16 sono codificanti. Sette mutazioni amminoacidiche sono localizzate nel gene S, 5 nella regione 1a-1b, ed 1 ciascuna nelle regioni E, M e 5b. Alcune delle mutazioni codificanti osservate determinano dei cambiamenti amminoacidici in grado di condizionare la struttura e conseguentemente la funzionalità delle proteine. In particolare le mutazioni in posizione 20460 (Met-->His) e 21438 (Glu-->Gln) nella porzione S1 del gene S ed in posizione 25664 (Asp-->Tyr) nel gene 5b determinano un cambio di polarità dell'amminoacido codificato. La mutazione osservata in posizione 15693, nella regione 1b codificante per la proteina non strutturale Nsp13, determina la sostituzione di un amminoacido aromatico (Pro), con un amminoacido alifatico ed a minor ingombro sterico (Leu).

Nella TRS del gene S del vaccino è stata identificata una mutazione nella regione altamente conservata composta dai 5 nucleotidi finali (AACAA --> ACCAA)

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il paragone della sequenza del vaccino L1148 con la sequenza del suo ceppo progenitore ha portato all'individuazione di marker vaccinali, utili per identificare il ceppo vaccinale in campo.

Il sequenziamento della porzione del genoma compresa tra le posizioni 21073 e 21438, contenente 4 marker vaccinali ravvicinati tra loro, può essere utilizzato come strumento per differenziare il vaccino. Tale porzione del genoma può essere retro-

trascritta, amplificata e sequenziata facilmente ed in maniera economica, utilizzando i primer riportati in questo lavoro.

L'importanza di mettere a disposizione della comunità scientifica le sequenze dei ceppi progenitori e dei vaccini, dovrebbe essere tenuta in considerazione dalle case farmaceutiche o dovrebbe essere resa obbligatoria dalle autorità competenti nel momento della registrazione dei vaccini. Differenziare i ceppi vaccinali e di campo è importante per programmare adeguatamente i piani vaccinali in base alla reale circolazione dei diversi genotipi in campo, per tenere sotto controllo la circolazione dei vaccini e per prevenire la scorretta attribuzione di focolai di campo a fenomeni di reversione a virulenza di ceppi vaccinali.

L'identificazione delle mutazioni tra i ceppi progenitori ed i vaccini potrebbe, inoltre, essere un punto di partenza importante per nuovi studi volti a determinare quali di queste siano responsabili dell'attenuazione dei ceppi progenitori e dei meccanismi coinvolti in tale processo. In questo studio sono state individuate 4 mutazioni importanti che potrebbero giocare un ruolo nell'attenuazione del ceppo vaccinale in esame. In letteratura è stato riportato che la patogenicità di IBV è legata alle caratteristiche della polimerasi e della proteina S. Le mutazioni da noi osservate nelle regioni codificanti per queste proteine (1a-1b ed S) potrebbero, quindi, avere un significato nell'attenuazione del ceppo progenitore (Armesto et al., 2009; Stevenson-Leggett et al., 2016). Anche la mutazione identificata nel TRS del gene S del vaccino, determinando una regolazione negativa della trascrizione del gene S (Bentley et al., 2013), può essere legata ad una diminuzione della patogenicità. La mutazione nel gene 5b potrebbe essere legata ad una modulazione della risposta immunitaria dell'ospite. Infatti, è stato dimostrato che la proteina 5b è implicata nel meccanismo di inibizione della produzione di proteine da parte dell'ospite (Kint et al., 2016).

Per attribuire in maniera definitiva un significato a queste mutazioni, bisognerebbe introdurle singolarmente nel genoma, utilizzando tecniche di *reverse genetics*. e valutare le caratteristiche fenotipiche dei virus prodotti.

BIBLIOGRAFIA

1. Jackwood MW, de Wit S (2013). Infectious bronchitis. In: Swayne D.E., Glisson J.R., McDougald L.R., Nolan L.K., Suarez D.L., Nair V., (eds.), Diseases of Poultry 13th edition. Wiley-Blackwell pp. 139-159.
2. Bijlenga G, Cook JK, Gelb J Jr, and de Wit JJ (2004). Development and use of the H strain of avian infectious bronchitis virus from the Netherlands as a vaccine: a review. *Avian Pathol.* 33: 550-557.
3. Gelb JJ and Cloud SS (1983). Effect of serial embryo passage of an Arkansas-type avian infectious bronchitis virus isolate on clinical response, virus recovery, and immunity. *Avian Dis.* 27: 679-687.
4. Jackwood MW (2012). Review of infectious bronchitis virus around the world. *Avian Dis.* 56: 634-641.

5. de Wit JJ, Cook JK and van der Heijden HM (2011). Infectious bronchitis virus variants: a review of the history, current situation and control measures. *Avian Pathol* 40: 223-235.
6. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G and Monne I (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect Genet Evol.* 39: 349-364.
7. YuDong W, YongLin W, ZiChun Z, GenChe F, YiHai J and XiangE L (1998). Isolation and identification of glandular stomach type IBV (QX IBV) in chickens. *Chinese Journal of Animal Quarantine.* 13: 1-3.
8. Franzo G, Naylor CJ, Lupini C, Drigo M, Catelli E, Listorti V, Pesente P., Giovanardi D, Morandini E. and Cecchinato M. (2014). Continued use of IBV 793B vaccine needs reassessment after its withdrawal led to the genotype's disappearance. *Vaccine.* 32:6765-6767.
9. Franzo G, Listorti V, Naylor CJ, Lupini C, Laconi A, Felice V, Drigo M., Catelli E. and Cecchinato M. (2015). Molecular investigation of a full-length genome of a Q1-like IBV strain isolated in Italy in 2013. *Virus Res.* 210: 77-80.
10. Laconi A, Clubbe J, Falchieri M, Lupini C, Cecchinato M, Catelli E, Listorti V. and Naylor C.J. (2016). A comparison of AMPV subtypes A and B full genomes, gene transcripts and proteins led to reverse-genetics systems rescuing both subtypes. *J Gen Virol.* 97:1324-1332.
11. Bentley K, Keep SM, Armesto M and Britton P. (2013). Identification of a noncanonically transcribed subgenomic mRNA of infectious bronchitis virus and other gammacoronaviruses. *J Virol.* 87: 2128-2136.
12. Kint J, Langereis MA, Maier HJ, Britton P, van Kuppeveld FJ, Koumans J, Wiegertjes G.F and Forlenza M. et al. (2016). Infectious Bronchitis Coronavirus Limits Interferon Production by Inducing a Host Shutoff That Requires Accessory Protein 5b. *J Virol.* 90:7519-7528.
13. Armesto M, Cavanagh D, Britton P. (2009). The replicase gene of avian coronavirus infectious bronchitis virus is a determinant of pathogenicity. *PLoS One.* 4: e7384.
14. Stevenson-Leggett P, Britton P and Bickerton E (2016). Generation of a recombinant infectious bronchitis virus suggests that the S protein is a determinant of pathogenicity. Proceedings of the 9th International symposium on avian coronavirus and pneumovirus, Utrecht, The Netherlands, 21-24 June, 2016 4th annual meeting of the COST action FA1207 on controlling avian coronaviruses, p.122.

Tabella 1: Primer utilizzati per le RT, le PCR e il sequenziamento dell'intero genoma dei ceppi di IBV L1148 e 1148-A.

RT	Sequence 5'-3'	Sequencing	Sequence 5'-3'
2,06-	ttagtaaaaagaccacc	0,67+	cctaaggattacgctgatgctttg
4,26-	catactttgcgcatc	1,26+	ttcgcaggaactgtctgcaagc
6,18-	agaaaacctacaccag	2,52+	tagaggaaatgcacagcttggtgc
8,18-	gtaaagaatgtactaacc	3,04+	tacaccaatgtcacagcttggtgc
QX10,20-	cacagttgtgtcactaactcaag	3,1+	ctctcgatgttgtaattaccatctgg
12,1-	ctccataagaatcctg	4,8+	tgattgtgatgttgtaattaccatctgg
14,13-	taaaacttggtgttcc	5,32+	ctattagtcttagggcaatatggg
QX16,15-	ggtcaacatactaacctcatctacc	6,53+	gttaaacctacagcatatgcttacc
QX18,10-	catagaagaagaatggcatagctttc	7,17+	aatgctcctccggtagatggaag
19,73-	caaaatgcattactcgc	QX 8,50 +	gtgtatacatgtacacaccgctg
22,51-	catatctcttttgacc	9,26+	cctgtcactatgcttcaatggtag
QX24,20-	ctactcacctgttcaattgtttctc	QX 9,40 -	ctaattatcgggtgaactttctgagc
26,23-	accaactttagtggtgc	10,6+	ggtaaatccacctaactgtgtggg
27,89-	ttgctctaactctatac	QX10,90-	cagccaagtctctcaagattgac
Dta-Adaptneg	gcatctcgaggctgtggcttttttttttt ttttttta	QX11,50+	gaagcaggcaatcaaatatgttgac
Dtc-Adaptneg	gcatctcgaggctgtggcttttttttttt tttttttc	11,13+	gaagtagatagcatggagagacg
Dtg-Adaptneg	gcatctcgaggctgtggcttttttttttt tttttttg	12,64+	gacttaaagtcagaagtaacagctg
		13,18+	gatctcctcaagtatgattatactgagg
PCR	Sequence 5'-3'	14,69+	caaggctctgtagcagatattctgg
0,06+	gcgctagattccaacttaacaaaacg	15,25+	aagtgtgctatgacatgcatgc
2,03-	gacttgcgaacaagatgccaatgcc	16,09-	cacataaagcatcaacagctgcatgag
1,92+	tgaggcttgcataatgaaaagtgcg	15,99+	ggcaagcagaagcgctactacagta
4,2-	ggtataaagaggatttcttatcctcaa- gatcatg	16,62+	catgaaagtggctcagcctacaac
4,1+	cggaggatgggttaataaccgc	QX16,80-	gaatcagctgtaacacagaatatac

6,08-	caaataatattagaagaccaaataaagc- caattcc	17,18+	caacatgtttataacacgtgatgaggc
5,93+	gattctttgatgtgttacgctattgtgcag	18,18+	taacctacctgggttaatgggtg
8,05-	cctggtttagtatactcacatacactacc	18,71+	gaagagaaatattcgacactgcc
QX7,80+	cttccatagcattgtttgctctag	19,86+	tgacatgtttctgttcttccagattg
10,02+	cagtattattggagttgtgctgaag	QX19,50+	agtagccaatgatggcaatgacgatg
12,08-	gaatcctgatccggagttggacttggc	QX19,90+	gcttcagtcggcttgacatgtgg
12,01+	gtggcagcaggtaacaccttagg	19,97+	gatagccaataatggcaatgatgacg
14,12-	ataaaactgtgtttccaataactacagg	QX20,60+	ctgcacatgagtgcactgttgggtg
QX13,90+	gaggtgacgtctaaatatttgaatg	QX21,70-	caaaattcgtgcttaattcacctg
QX16,15-	ggtcaacatactaacctcatctacc	22,48+	ccatttctagtaattgtagcactgg
QX15,06+	gatgattgcactcgcatagtacctc	22,99+	ctctagcattacaacaaattcaa- gatgttg
QX18,10-	catagaagaagaatggcatagctttc	24,60+	ctgtgtctttttctgatacatgggtag
17,94+	cggtgtctatgatataggcaaccctaaagg	25,27+	gacgtaatactatcgtatgggtcag
19,67-	gtattgacagagtgtgtactttgcc	QX25,87+	ctcaattaagggttttagataggttaattc
QX18,10-	catagaagaagaatggcatagctttc	QX26,88-	gacatgtaggtaatacaactacatgcc
19,46+	gtaacagtgcaattgattaccatagc	QX27,20+	cctacatgtctatcgccaggg
22,26-	tccatacgcglttgtatgtactcatctg	QX21,70-	caaaattcgtgcttaattcacctg
QX21,90+	ggtaaatcctgtgaagatgtaataaac	22,48+	ccatttctagtaattgtagcactgg
QX24,20-	ctactcacctgttcaattgtttctc	22,99+	ctctagcattacaacaaattcaa- gatgttg
23,99+	cattatgcctcaatgagtaagtgtgg	24,60+	ctgtgtctttttctgatacatgggtag
26,22-	aactttaggtggctttggctctcc	25,27+	gacgtaatactatcgtatgggtcag
26,02+	gaaaagcgcgaattatctgagagaagg	QX25,87+	ctcaattaagggttttagataggttaattc
27,83-	catagccaattaaacttaactaaac- taaaatttagctc	QX26,88-	gacatgtaggtaatacaactacatgcc
26,49+	gatagccaagatggtatagtgtggg	QX27,20+	cctacatgtctatcgccaggg
Adapt neg	gcatctcgagggtgtggtgc		

Tabella 2: Sequenze dei TRS del ceppo progenitore 1148-A e del ceppo vaccinale L1148. E' evidenziata la mutazione osservata nel TRS del gene S del ceppo vaccinale.

Gene	posizione nucleotidica di inizio del TRS	TRS progenitore	TRS vaccino
S	20208	AGG AACAA	AGG ACCAA
3	23740	CTGAACAA	CTG AACAA
M	24326	CTT AACAA	CTTAACAA
4b	24800	CTG AACAA	CTG AACAA
5	25390	ACC AACAA	ACCAACAA
N	25740	CTT AACAA	CTT AACAA
6b	26901	CAA AACAA	CAA AACAA

Tabella 3: Differenze nucleotidiche ed amminoacidiche osservate tra il ceppo progenitore 1148-A ed il ceppo vaccinale L1148, in grigio sono evidenziate le mutazioni amminoacidiche

Regione del Genoma	Posizione nel genoma	Nucleotide		Amminoacido	
		progenitore	vaccino	progenitore	vaccino
5'UTR	78	C	T	n.c.	n.c.
5'UTR	257	C	T	n.c.	n.c.
Nsp 2	548	C	T	N	N
Nsp 2	1970	C	T	F	F
Nsp 3	3322	C	T	T	I
Nsp 3	4597	T	G	I	S
Nsp 3	6209	C	T	C	C
Nsp 4	8688	G	A	N	N
Nsp 8	10929	C	A	L	I
Nsp 12	14440	C	T	V	V
Nsp 13	15693	C	T	P	L
Nsp 14	17239	C	T	N	N
Nsp 16	20212	A	C	E	D
S1	20460	G	C	M	H
S1	20521	C	A	D	K
S1	21073	C	T	T	I
S1	21435	G	T	G	F
S1	21436	G	T	G	F
S1	21438	G	C	E	Q
S2	22902	T	A	S	T
S2	22921	C	T	S	L
E	24281	G	T	A	S
M	25048	A	C	E	A
5a	25616	C	T	Y	Y
5b	25664	G	T	D	Y
5b	25831	C	T	N	N
3'UTR	27074	C	T	n.c.	n.c.
3'UTR	27539	T	C	n.c.	n.c.

n.c.: non codificante