

EVOLUZIONE DEL GENOTIPO QX IN PRESENZA DI DIFFERENTI STRATEGIE VACCINALI

Franzo G., Legnardi M., Tucciarone C.M., Drigo M., Martini M., Cecchinato M.

Università degli studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Viale dell'Università 16, 35020 Legnaro (PD)

Summary

Despite less frequent than antimicrobial resistance, some episodes of vaccine failures have been demonstrated and appear relatively common in intensively-raised livestock.

Infectious bronchitis virus (IBV) is a widespread avian coronavirus, whose control relies mainly on extensive vaccine administration. However, the continuous emergence of new vaccine-immunity escaping variants prompts the development of new vaccines.

In the present work, a large-scale molecular epidemiology study was performed to evaluate the role of homologous vaccination in driving IBV evolution, benefiting from the introduction of a new vaccine in the vast majority of Northern-Italy broiler farms in late 2014. The results of several biostatistic analyses evaluating the Spike-protein S1 subunit evolution consistently demonstrated the presence of a higher pressure in the post-vaccination period. A tendency towards diversification was detected essentially in sites located on the protein surface, within or nearby domains involved in viral attachment or related functions. These evidences suggest the action of a vaccine-induced immunity in conditioning viral evolution, potentially leading to the emergence of new vaccine-escape variants. Extending far beyond the poultry industry, the great plasticity of rapidly-evolving RNA-viruses in response to human intervention is demonstrated once more, highlighting the clear implications for animal and especially human health.

INTRODUZIONE

La Bronchite infettiva (BI) è una malattia infettiva di primaria importanza per l'avicoltura, essendo responsabile di rilevanti perdite economiche a livello mondiale.

L'agente eziologico, avian infectious bronchitis virus (IBV) è un membro della specie *Avian coronavirus*, genere *Gammacoronavirus*, famiglia *Coronaviridae*. Come gli altri membri della famiglia, si caratterizza per una grande variabilità antigenica e fenotipica, conseguente all'alto tasso di mutazione e di ricombinazione. Le conseguenze di questa variabilità sono particolarmente evidenti nel caso dello *Spike* virale (ed in particolare della sub-unità S1), proteina strutturale implicata nel tropismo cellulare, nel legame recettoriale e nell'induzione dell'immunità cellulare e umorale neutralizzante (Jackwood et al., 2012). La grande variabilità genetica dell'S1 è stata inoltre sfruttata per la classificazione di IBV in genotipi e *lineage*, i quali possono differire significativamente per proprietà biologiche, immunologiche e distribuzione geografica (Valastro et

al., 2016).

Le implicazioni per il controllo della malattia sono oramai ben note. Attualmente, il controllo della malattia si basa in massima parte sull'uso della vaccinazione. Tuttavia, le peculiarità fenotipiche dei diversi genotipi o addirittura di specifici ceppi esitano frequentemente in fenomeni di limitata cross-protezione, richiedendo l'uso di combinazioni di vaccini al fine di aumentare lo spettro di protezione e lo sviluppo di nuovi vaccini, per fronteggiare l'emergenza o l'introduzione di nuovi genotipi (Cook et al., 1999).

Sebbene questo scenario sia ampiamente assodato, le reali forze implicate nell'evoluzione di IBV sono tuttora poco conosciute. Infatti, un elevato tasso di mutazione o ricombinazione non si traduce automaticamente in un'elevata variabilità biologica: acciocché nuove varianti fenotipiche possano persistere e diffondersi queste devono essere favorevolmente selezionate dall'ambiente. È facilmente intuibile come l'immunità dell'ospite, sia essa naturale o di origine vaccinale, possa rappresentare uno dei maggiori fattori in grado di condizionare l'evoluzione virale. Nel caso di IBV sembrano sussistere diverse condizioni affinché l'immunità vaccinale possa condizionare l'evoluzione virale, selezionando specifici ceppi e favorendo l'emergere di nuove varianti. L'applicazione massiva e precoce della vaccinazione e l'elevato *turn-over* degli animali determinano la replicazione e l'evoluzione virale in un "ambiente" condizionato essenzialmente dall'immunità vaccinale, piuttosto che da quella naturale. La protezione solo parziale indotta dai vaccini attualmente disponibili permette con una certa frequenza la circolazione, anche prolungata, di ceppi di campo in allevamenti vaccinati e potrebbe ulteriormente favorire la selezione di *vaccine-escape variants*. Sebbene teoricamente plausibili, conferme sperimentali a supporto di tale ipotesi nel caso di IBV sono, ad oggi, mancanti (Read and Mackinnon, 2010).

Il presente lavoro si propone di studiare l'impatto della vaccinazione sull'evoluzione dei ceppi di campo del genotipo QX (*lineage* GI-19), beneficiando del particolare scenario determinatosi in Italia. Un radicale cambiamento nelle strategie di controllo ha infatti interessato una parte rilevante delle aziende del Nord Italia, permettendo di dividere chiaramente il periodo dello studio in una fase precedente e successiva all'introduzione della vaccinazione omologa nei confronti di questo genotipo (Franzo et al., 2016).

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni e sequenziamento

Quattrocentodieci campioni (pool di tamponi tracheali), ottenuti da diversi allevamenti del Nord Italia nel periodo 2012-2017, precedentemente risultati positivi per IBV utilizzando il kit Virus-IBV-kit (Gensig, Southampton, UK) sono stati amplificati e sequenziati nella regione ipervariabile del gene S1 utilizzando i *primer* XCE1 and XCE2 descritti da Cavanagh et al., (1999) (Cavanagh et al., 1999). Al fine di ottenere una genotipizzazione preliminare, le sequenze ottenute più quelle di riferimento proposte da Valastro et al. (2016) sono state allineate utilizzando il software MAFFT (Standley, 2013) e un albero filogenetico è stato ricostruito utilizzando IQ-TREE (Trifinopoulos et al., 2016). I

ceppi classificati come QX sono stati selezionati e, quando possibile, la regione codificante l'intera sub-unità S1 è stata amplificata e sequenziata utilizzando dei primer disegnati utilizzando Primer3 (disponibili su richiesta).

Analisi di sequenza

Tutte le sequenze della sub-unità S1 sono state allineate con TranslatorX, tenendo conto della loro natura codificante, e la genotipizzazione è stata confermata utilizzando l'approccio precedentemente descritto. Eventuali ceppi ricombinanti sono stati identificati ed esclusi utilizzando RDP4 (Martin et al., 2015). Le sequenze così ottenute sono state suddivise in 2 dataset, corrispondenti al periodo antecedente e successivo all'introduzione della vaccinazione omologa (i.e. Novembre 2014).

I dataset così ottenuti sono stati quindi analizzati con diversi metodi statistici, basati sull'analisi dei tassi di sostituzione sinonimo e non-sinonimo, al fine di valutare e comparare l'intensità delle pressioni selettive agenti sui ceppi di IBV circolanti in diversi "ambienti vaccinali". In particolare è stata valutata, in modo indipendente su ciascuno dei due dataset, la presenza di siti proteici sottoposti a pressioni selettive diversificanti (i.e. determinanti un aumento della variabilità della sequenza aminoacidica fra i diversi ceppi) o direzionali (i.e. determinanti una tendenza dei ceppi a introdurre un particolare aminoacido in una specifica posizione della proteina), pervasive (i.e. costanti nel corso del tempo) o episodiche (i.e. attive solo in certi periodi della storia evolutiva). In aggiunta, l'insorgenza di pressioni selettive diversificanti e direzionali dopo l'introduzione della vaccinazione omologa è stata valutata contestualmente sui due dataset, selezionando il periodo precedente all'introduzione della vaccinazione come *baseline*.

Homology modeling della sub-unità S1 dei ceppi italiani.

Al fine di meglio comprendere il significato biologico delle pressioni selettive agenti sui ceppi considerati, la struttura terziaria di un ceppo rappresentativo fra quelli campionati è stata ricostruita tramite *homology modeling* utilizzando il server SWISS-MODEL (Waterhouse et al., 2018). Il modello ottenuto è stato quindi editato e visualizzato con Chimera.

RISULTATI

Analisi delle sequenze e stima delle pressioni evolutive

Centocinquantacinque campioni sono stati preliminarmente classificati come appartenenti al genotipo QX; per 95 di questi è stato possibile ottenere la sequenza dell'intera subunità S1. In tutti i casi la genotipizzazione preliminare è stata confermata. Un ceppo ricombinante QX-793B e quattro sequenze risultate geneticamente identiche a quelle del vaccino somministrato (tutte campionate nel periodo post-vaccinazione) sono state escluse dallo studio. Nel dataset finale sono state quindi incluse 90 sequenze, di cui 39 campionate nel periodo pre-vaccinazione e 51 nel post-vaccinazione.

L'analisi delle pressioni selettive diversificanti pervasive (i.e. agenti in modo costante nel tempo) ha evidenziato una più intensa pressione dopo l'introduzio-

ne della vaccinazione, in particolare nella regione compresa fra gli aminoacidi 300 e 400 (Figura 1).

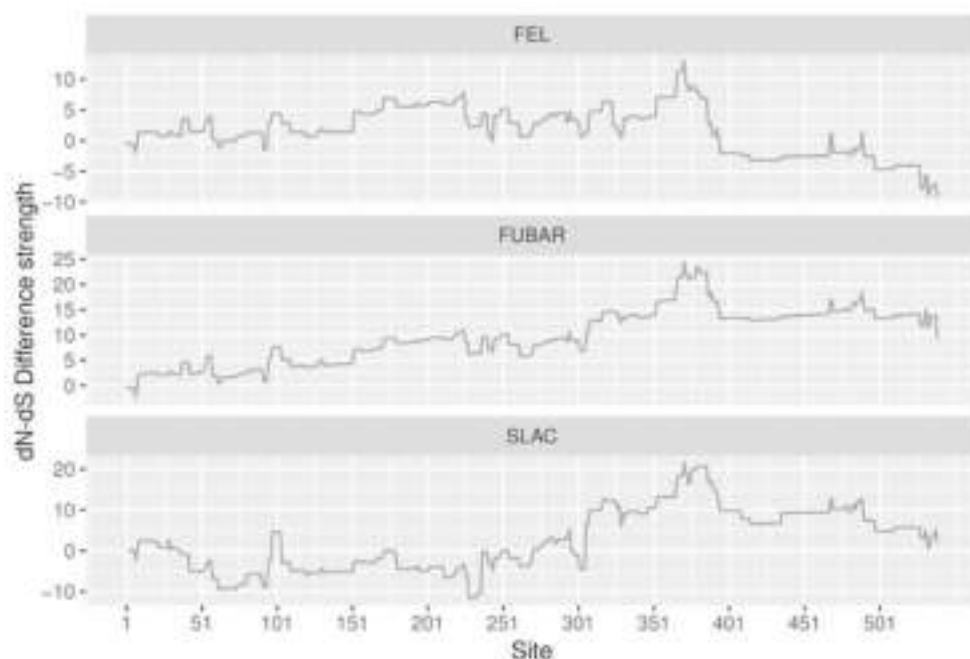


Figura 1) Plot rappresentante lo score cumulativo (calcolato con 3 distinti approcci statistici) basato sulla differenza fra tasso di mutazioni non sinonimo e sinonimo (dN-dS) nel periodo precedente e successivo all'introduzione della vaccinazione omologa. Punteggi maggiori di 0 indicano una più intensa pressione selettiva nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa.

Tuttavia, in nessuno di questi siti la differenza è risultata statisticamente significativa. Al contrario, nei ceppi campionati dopo l'introduzione della vaccinazione omologa, è stato possibile identificare siti dell'S1 (aa 9, 29, 54, 65, 96 e 483) sottoposti ad una pressione selettiva diversificante episodica (i.e. agenti in specifici momenti del processo evolutivo della specie) statisticamente significativa. Similmente, l'analisi congiunta dei due dataset ha evidenziato l'insorgenza sia di pressioni diversificanti (aa 9, 65, 225 and 483) che direzionali (aa 29, 394 and 486) nei ceppi campionati nel periodo post-vaccinazione.

Homology modeling

La ricostruzione della struttura quaternaria dello *Spike* ha permesso di identificare la localizzazione dei siti sottoposti a pressioni selettive (Figura 2). In generale, i siti esposti sulla superficie dell'S1 sono risultati sottoposti a pressioni selettive diversificanti più intense nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione omologa. In particolare, la regione in cui tale differenza è risultata più marcata corrisponde al dominio C-terminale dell'S1, dove sono stati identificati dei potenziali siti per il lega-

me recettoriale. Diversi siti sottoposti a pressioni selettiva direzionale sono risultati in stretta prossimità al sito di legame recettoriale prima citato e a un altro potenziale sito di legame, localizzato nel dominio N-terminale della proteina. Tutti i siti della proteina che si sono dimostrati essere interessati da pressione selettiva episodica diversificante sono risultati essere esposti sulla superficie della sub-unità S1 (Figura 2).

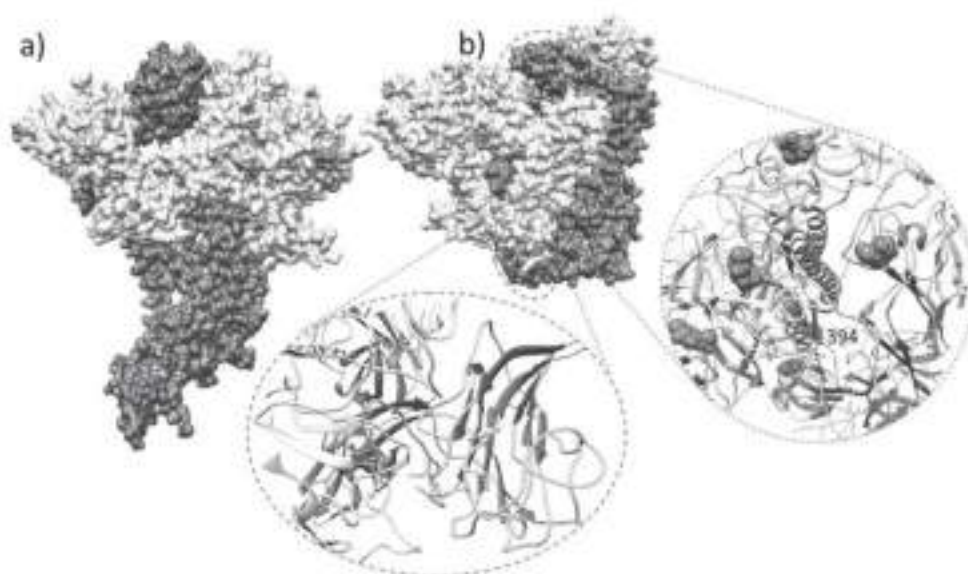


Figura 2) Vista laterale (a) e dall'alto (b) della struttura quaternaria dello Spike di IBV. La struttura completa dello *Spike* è riportata solamente per un monomero (in grigio), mentre la regione dell'S1 è riportata per i restanti 2 monomeri. Nel monomero colorato, le differenze nelle pressioni selettive fra il periodo precedente e successivo all'introduzione della vaccinazione sono state codificate con una scala colori dal viola (più intense nel periodo post-vaccinazione) all'azzurro (più intense nel periodo pre-vaccinazione). Nel restante monomero (bianco), i siti sottoposti a pressioni episodiche diversificanti o direzionali nel periodo post-vaccinazione omologa sono riportati rispettivamente in rosso e verde. La regione con il più alto dN-dS *score* (AA 300-400) (vedi anche Figura 1) è evidenziata in giallo. Con una visualizzazione a "ribbon" sono stati evidenziati i domini proteici più rilevanti: l'inserto inferiore riporta il sito di legame recettoriale nell'N-terminale della proteina e la struttura ad ansa che funge da "copertura" (in verde), mentre l'inserto sulla destra riporta il dominio C-terminale con il corrispondente sito recettoriale (in verde). Per entrambi gli inserti i siti sottoposti a pressioni selettive sono evidenziati con il codice colore precedentemente descritto.

DISCUSSIONE

L'intervento umano ha modificato drammaticamente l'ambiente in cui evolvono i patogeni. L'esempio più evidente e attuale è probabilmente quello dell'emergenza e diffusione dei fenomeni di resistenza a farmaci antimicrobici e antivirali. I virus a RNA appaiono particolarmente avvantaggiati in questa "corsa agli armamenti" contro i trattamenti introdotti dall'uomo in virtù della loro grande capacità di mutare ed evolvere rapidamente. Nonostante ciò, i vaccini sono stati a lungo considerati molto resistenti nei confronti dell'evoluzione virale (Kennedy and Read, 2017). Le ragioni che preven- gono o limitano l'emergenza di varianti in grado di eludere l'immunità vaccinale sono molteplici, ma fra le più rilevanti va considerata la capacità della vaccinazione di dimi- nuire o azzerare la popolazione di ospiti suscettibili e la replicazione virale. Poiché la selezione naturale è più efficace in grandi popolazioni, la selezione delle varianti più *fit* è limitata in presenza di piccole popolazioni. Inoltre, i vaccini inducono un'immunità *multi-target* e variabile in funzione del singolo soggetto, rendendo improbabile il con- testuale sviluppo di tutte le mutazioni fenotipiche necessarie ad eludere l'eterogenea risposta dell'ospite, specie a livello di popolazione (Kennedy and Read, 2017).

Nonostante ciò, con sempre maggior frequenza, vari studi hanno dimostrato la pre- senza di significative eccezioni, anche in medicina veterinaria, in particolare in specie allevate in modo intensivo quali suini e pollame (Franzo et al., 2016; Read and Mackinnon, 2010).

Il presente studio, effettuato in condizioni di campo (eludendo in questo modo i *bias* determinati dalle condizioni sperimentali) appare confermare l'interazione fra immu- nità indotta dalla vaccinazione ed evoluzione virale. Infatti, pressioni selettive più in- tense sono state osservate in azione su ceppi del genotipo QX campionati dopo l'in- troduzione della vaccinazione omologa. Diversi siti localizzati sulla superficie della proteina sono risultati sottoposti ad una pressione selettiva episodica, diversificante o direzionale, solamente nel periodo successivo all'introduzione della vaccinazione.

In particolare, una delle regioni dove è stato possibile osservare la maggiore differenza in termini di intensità delle pressioni selettive corrisponde ad una regione nel dominio C-terminale dell'S1, dove è localizzato un potenziale sito di legame recettoriale (Figu- ra 2) (Shang et al., 2018). È possibile che anticorpi aventi come target questa regione possano dimostrare una maggiore attività neutralizzante, inducendo di conseguenza pressioni selettive più intense. Simili ipotesi possono essere chiamate in causa per giu- stificare la presenza di siti sottoposti a pressioni selettive nelle regioni 24-62 e 87-93 dell'S1 (o in stretta prossimità a queste), dove precedenti studi hanno evidenziato la presenza di epitopi (Zou et al., 2015). Infine, altri 2 siti (i.e. 483 e 487), che hanno rive- lato una tendenza al cambiamento dopo l'introduzione della vaccinazione, risultano in stretta prossimità con una struttura ad ansa che costituisce una sorta di "copertura" per un altro sito di legame recettoriale, localizzato nell'estremità N-terminale dell'S1 (Fu- gura 2) (Shang et al., 2018). È stato infatti suggerito che questa "copertura" si sia evo- luta nel corso della storia dei coronavirus per proteggere i siti di legame della risposta immunitaria. Anticorpi in grado di legarsi in prossimità di queste regioni potrebbero quindi alterare o inibire la funzionalità di siti vitali per l'infettività virale, direttamente o tramite interferenza sterica.

Sulla base di queste evidenze, e in funzione della congruenza fra i siti sottoposti a pres- sione selettiva e la loro funzione biologica, appare lecito sostenere che la variazione

nelle strategie vaccinali abbia condizionato l'evoluzione dei ceppi del genotipo QX in Italia, potenzialmente favorendo quelle varianti meno suscettibili all'immunità vaccinale. Le reali cause alla base delle pressioni selettive determinate dalla vaccinazione, soprattutto in medicina veterinaria, non sono ancora del tutto chiare. Com'è noto, l'immunità indotta nei confronti di IBV non è sterilizzante, e una certa replicazione anche negli animali vaccinati è stata più volte dimostrata. Questo scenario è ulteriormente peggiorato dalla copertura solo parziale che spesso è possibile ottenere in allevamento e che, sebbene usualmente sufficiente a prevenire o limitare l'insorgenza di segni clinici, permette una prolungata circolazione dei ceppi di campo in una popolazione solo parzialmente immune. Tali debolezze potrebbero consentire la presenza di una popolazione virale abbastanza grande da permettere alla selezione naturale di agire, favorendo le varianti virali più adatte al nuovo "ambiente vaccinale". In funzione della vaccinazione precoce e della breve vita degli animali, è facile sostenere che l'immunità vaccinale sia la forza dominante nel modellare l'evoluzione virale. La presenza di un unico ceppo vaccinale (a differenza dei molteplici ceppi di campo) e la limitata variabilità genetica degli animali potrebbe favorire la presenza di un'immunità di popolazione più omogenea, e quindi la selezione di specifiche mutazioni.

Ulteriori studi saranno chiaramente necessari per confermare la validità di queste ipotesi. Nel frattempo, una cura particolare dovrebbe essere dedicata alla gestione e ottimizzazione delle strategie vaccinali già implementate, soprattutto al fine di minimizzare la circolazione di IBV e conseguentemente il suo potenziale evolutivo. L'utilizzo di una combinazione di vaccini eterologhi rappresenta una comune alternativa alla vaccinazione omologa. Poiché una maggiore eterogeneità nella risposta immunitaria è spesso annoverata fra i benefici di questa strategia, questa potrebbe ulteriormente ostacolare l'emergenza di varianti in grado di eludere la risposta vaccinale. Conseguentemente, gli eventuali benefici e limiti di una vaccinazione eterologa rispetto a quella omologa dovrebbero essere attentamente valutati e considerati al fine di definire delle linee guida per una vaccinazione ottimale.

BIBLIOGRAFIA

1. Cavanagh, D., Mawditt, K., Britton, P., Naylor, C.J. (1999). Longitudinal field studies of infectious bronchitis virus and avian pneumovirus in broilers using type-specific polymerase chain reactions. *Avian Pathol.* 28, 593–605. doi:10.1080/03079459994399
2. Cook, J.K.A., Orbell, S.J., Woods, M.A., Huggins, M.B. (1999). Breadth of protection of the respiratory tract provided by different live-attenuated infectious bronchitis vaccines against challenge with infectious bronchitis viruses of heterologous serotypes. *Avian Pathol.* 28, 477–485. doi:10.1080/03079459994506
3. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Blanco, A., Nofrarías, M., Biarnés, M., Cortey, M., Majó, N., Catelli, E., Cecchinato, M., (2016). Effect of different vaccination strategies on IBV QX population dynamics and clinical outbreaks. *Vaccine* 34, 5670–5676. doi:10.1016/j.vaccine.2016.09.014
4. Franzo, G., Tucciarone, C.M., Cecchinato, M., Drigo, M. (2016). Porcine circovirus type 2 (PCV2) evolution before and after the vaccination introduction: A large scale epidemiological study. *Sci. Rep.* 6. doi:10.1038/srep39458
5. Jackwood, M.W., Hall, D., Handel, A. (2012). Molecular evolution and emergence of avian gammacoronaviruses. *Infect. Genet. Evol.* 12, 1305–1311. doi:10.1016/j.mee-

- gid.2012.05.003
6. Kennedy, D.A., Read, A.F. (2017). Why does drug resistance readily evolve but vaccine resistance does not? *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284, 20162562. doi:10.1098/rspb.2016.2562
 7. Martin, D.P., Murrell, B., Golden, M., Khoosal, A., Muhire, B. (2015). RDP4: Detection and analysis of recombination patterns in virus genomes. *Virus Evol.* 1, 1–5. doi:10.1093/ve/vev003
 8. Read, A.F., Mackinnon, M.J.(2010). Pathogen evolution in a vaccinated world. *Evol. Heal. Dis.* 2, 139–152. doi:10.1093/acprof:oso/9780199207466.003.0011
 9. Shang, J., Zheng, Y., Yang, Y., Liu, C., Geng, Q., Luo, C. (2018). Cryo-EM structure of infectious bronchitis coronavirus spike protein reveals structural and functional evolution of coronavirus spike proteins 1–19.
 10. Standley, K. (2013). MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability.(outlines version 7). *Mol. Biol. Evol.* 30, 772–780. doi:10.1093/molbev/mst010 [doi]
 11. Trifinopoulos, J., Nguyen, L.-T., von Haeseler, A., Minh, B.Q. (2016). W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.* 44, W232–W235. doi:10.1093/nar/gkw256
 12. Valastro, V., Holmes, E.C., Britton, P., Fusaro, A., Jackwood, M.W., Cattoli, G., Monne, I. (2016). S1 gene-based phylogeny of infectious bronchitis virus: An attempt to harmonize virus classification. *Infect. Genet. Evol.* 39, 349–364. doi:10.1016/j.meegid.2016.02.015
 13. Waterhouse, A., Bertoni, M., Bienert, S., Studer, G., Tauriello, G., Gumienny, R., Heer, F.T., de Beer, T.A.P., Rempfer, C., Bordoli, L., Lepore, R., Schwede, T. (2018). SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 46, W296–W303. doi:10.1093/nar/gky427
 14. Zou, N., Xia, J., Wang, F., Duan, Z., Miao, D., Yan, Q., Cao, S., Wen, X., Liu, P., Huang, Y. (2015). Two novel neutralizing antigenic epitopes of the s1 subunit protein of a QX-like avian infectious bronchitis virus strain Sczy3 as revealed using a phage display peptide library. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 168, 49–55. doi:10.1016/j.vetimm.2015.08.008