

VACCINI O CEPPLO DI CAMPO? LEZIONI DALLA VARIANTE 2

Franzo G.¹, Tucciarone C.M.¹, Homonnay Z.², Dauphin G.³, Koutoulis K.C.⁴, Cecchinato M.¹, Legnardi M.¹

¹*Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute (MAPS), Università di Padova, Legnaro, Italia*

²*Ceva Phylaxia, Szállás u. 5., 1107 Budapest, Ungheria*

³*Ceva Santé animale, 10 Avenue de la Ballastière, 33500 Libourne, France*

⁴*Dipartimento di Malattie Aviare, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università della Tessaglia, 43100 Karditsa, Grecia*

Summary

The control of infectious bronchitis (IB), one of the most impactful viral diseases of poultry, is largely based on routine vaccine administration. Despite their efficacy, the vast reliance on live-attenuated vaccines implies significant risks due to their capability to replicate and be transmitted among animals and farms. The detection of strains genetically related to vaccines complicates the diagnostic process and understanding of the viral molecular epidemiology. Moreover, reversion to virulence and associated clinical outbreaks can also occur.

In the present study, three vaccine vials, based on IBV lineage GI-23 (also known as Variant2) were deep sequenced through Next Generation Sequencing (NGS) to investigate the presence and features of viral subpopulations. To investigate the implications for the field and identify potential markers suitable for a DIVA strategy, the S1 sequences of strains originating from farms in different countries were sequenced and classified based on the knowledge of their vaccination history and comparison with the sequence of the applied vaccine. Although all considered vaccine batches shared the same consensus sequence, different subpopulations were identified suggesting independent and poorly constrained evolutionary processes. The vaccine consensus sequences and the respective subpopulations clustered with vaccine strains sampled from farms and no genetic features were consistently shared with field strains. Therefore, the vaccine-induced outbreaks more likely originate from *in vivo* evolution rather than selection of already present subpopulations. Although some amino acid residues were more commonly detected in either field or vaccine strains, no consistent marker could be identified.

This evidence, coupled with the occurrence of subpopulations within IBV GI-23-based vaccines and the variability among different production batches herein demonstrated makes the differentiation between field and vaccine-derived strains extremely challenging, based on sequence analysis alone. The knowledge of farm management and vaccination history should thus be considered for a proper epidemiological investigation.

INTRODUZIONE

L'uso della vaccinazione ha rappresentato una delle maggiori scoperte nella storia della medicina ed è uno strumento fondamentale per il controllo delle malattie, incluse quelle emergenti, di interesse umano e veterinario. Nel corso del tempo nuove tecniche di sviluppo e somministrazione dei vaccini hanno permesso di massimizzarne l'efficacia e la facilità d'uso, minimizzando allo stesso tempo gli effetti collaterali [1]. Tuttavia, alcuni

approcci tradizionali, come l'uso di virus attenuati, sono tuttora largamente applicati specialmente in medicina veterinaria, dove fattori economici e pratici giocano un ruolo di primaria importanza. Il virus della bronchite infettiva (IBV) è un ottimo esempio in tal senso, poiché la vaccinazione rappresenta un presidio fondamentale per il controllo della malattia da esso causata ed è quindi ampiamente utilizzato a livello mondiale. In particolare, i vaccini vivi attenuati sono quelli maggiormente applicati, in quanto garantiscono lo sviluppo di una forte immunità locale, umorale e cellulare, quantomeno nei confronti di ceppi geneticamente simili al vaccino. Inoltre, il loro sviluppo è relativamente semplice, il che permette di aggiornarli e introdurne di nuovi al variare dello scenario epidemiologico, fatto particolarmente frequente in funzione dell'elevato tasso evolutivo di IBV. Infine, la capacità di replicare ne permette una più agevole somministrazione in condizioni di campo, in incubatoio o in allevamento [2, 3]. L'escrezione del virus vaccinale può anche contribuire a migliorare il *coverage* complessivo in popolazioni vaccinate in modo sub-ottimale. D'altra parte, questi vantaggi comportano degli inevitabili effetti collaterali. L'attenuazione implica la selezione di varianti caratterizzate da una minor virulenza. Tuttavia, i virus a singolo filamento di RNA come IBV sono caratterizzati da un elevato tasso di mutazioni, indicativamente una mutazione ad ogni replicazione del genoma virale [4]. Non sorprende quindi che diverse varianti possano emergere sia *in vivo* che *in vitro*, come già dimostrato in precedenza anche nel caso di vaccini vivi attenuati [5]. Ne consegue che il processo di attenuazione sia spesso scarsamente prevedibile e controllabile e che alcune sottopopolazioni virali con una virulenza residuale potrebbero mantenersi, venendo poi selezionate durante la replicazione negli animali. Inoltre, anche in assenza di questo fenomeno, non vi è alcuna garanzia nei confronti di fenomeni di reversione a virulenza, in particolare qualora si instaurino "*rolling reactions*" in popolazioni animali solo parzialmente vaccinate. Entrambi questi fenomeni potrebbero esitare nell'emergere di focolai di malattia indotta dal vaccino. La capacità del virus di replicare e diffondere fra gli animali e gli allevamenti ha anche importanti implicazioni dal punto di vista epidemiologico. Il riscontro di sequenze "simil-vaccino" in episodi di malattia può essere riconducibile a diverse cause: 1) riscontro accidentale del vaccino in presenza di altre cause di malattia, 2) coinfezione del vaccino con il ceppo di IBV di campo, nei confronti del quale la protezione è spesso parziale, 3) somiglianza casuale fra ceppi di campo e vaccinale, 4) reversione a virulenza del vaccino o selezione di sottopopolazioni vaccinali con diversa virulenza. È chiaro che ciascuno di questi scenari ha importanti ricadute pratiche sulla gestione dell'allevamento e sullo sviluppo e somministrazione dei vaccini. Sfortunatamente, la discriminazione fra ceppi di campo e vaccinali rappresenta ad oggi un problema largamente irrisolto. La recente espansione della Variante2 (lineage GI-23) in diversi paesi africani, asiatici, europei e più recentemente americani, ha determinato l'introduzione del vaccino omologo in molti stati [6, 7]. Questa scelta, a prescindere dai benefici pratici, ha ostacolato lo studio della reale presenza e prevalenza del ceppo di campo, nonché la stima delle conseguenze cliniche ed economiche. La routinaria attività diagnostica si focalizza tipicamente sul sequenziamento di parte del gene S1, regione determinante per il tropismo, la virulenza e l'immunogenicità del virus. Questo gene si caratterizza inoltre per una maggiore variabilità genetica che permette una migliore risoluzione nella caratterizzazione dei ceppi [8]. Nonostante ciò, sovente anche questa regione risulta inadeguata per la discriminazione fra ceppi vaccinali e di campo, non essendo stati definiti dei chiari *cut-off* [9]. In presenza di un numero limitato di mutazioni, diverse spiegazioni possono

essere chiamate in causa: errori nel sequenziamento, evoluzione del vaccino in campo, selezione di sottopopolazioni vaccinali preesistenti, riscontro di ceppi di campo simili al vaccino, ecc. Sulla base di quanto detto, due tematiche appaiono particolarmente pressanti per i medici veterinari: la differenziazione fra ceppi di campo e vaccinali e la comprensione se il riscontro di ceppi di origine vaccinale in presenza di segni clinici sia riconducibile a forme di reversione a virulenza o rappresenti un riscontro incidentale. L'identificazione di sottopopolazioni vaccinali e la loro caratterizzazione può essere di grande utilità per capire se alcune di queste siano più prone alla replicazione *in vivo* e possano emergere quindi come agenti di *outbreak* clinici. Inoltre, il confronto con sequenze ottenute in campo potrebbe contribuire alla comprensione dell'impatto della variabilità intra-vaccino nel complicarne la differenziazione rispetto ai ceppi di campo e potenzialmente alla definizione di mutazioni marker. A tal fine, tre lotti di vaccino basato su Variante2 sono stati sequenziati tramite *Next Generation Sequencing* (NGS) per valutare la presenza e struttura di sottopopolazioni virali. Inoltre, le sequenze ottenute sono state confrontate con quelle ottenute da ceppi campionati in diversi allevamenti europei, per i quali lo status vaccinale fosse noto.

MATERIALI E METODI

Sequenziamento dei ceppi vaccinali

Tre boccette di vaccino basato su Variante2, appartenenti a lotti differenti (ID: 20381107A, 20381076B and 20381115B) sono state selezionate e ricostituite in acqua ultrapura per biologia molecolare. L'RNA è stato estratto a partire da 200µL della soluzione ottenuta usando il kit *High Pure RNA Isolation* (Roche, Basilea, Svizzera). I campioni sono stati sottoposti a NGS utilizzando la piattaforma NovaSeq6000 dopo aver preparato le apposite librerie con il kit *TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Pre*.

Analisi dei dati NGS

Le *read* ottenute sono state analizzate al fine di eliminare artefatti legati alla procedura di sequenziamento e filtrare le sequenze di scarsa qualità. Inizialmente le *read* di ciascuna *vial* vaccinale sono state allineate ad un genoma di referenza (*re-sequencing*) di Variante2, ottenendo così la rispettiva sequenza consenso, che è stata successivamente utilizzata per un secondo *round* di allineamento. Considerata la rilevanza in termini diagnostici, le analisi si sono focalizzate sulla regione S1, la cui variabilità è stata valutata in termini di presenza e frequenza di *Single nucleotide variation* (SNV) utilizzando LoFreq [10]. L'intero aplotipo (i.e. la sequenza della specifica sottopopolazione) è stato inoltre ricostruito e la sua frequenza stimata utilizzando il software Claque [11].

Caratterizzazione dei ceppi di campo

Ottantatré campioni di archivio derivanti da diversi stati d'Europa, precedentemente caratterizzati come Variante2 sulla base del sequenziamento della terza regione iper-variabile e per i quali fosse nota l'anamnesi vaccinale, sono stati selezionati per il sequenziamento dell'intera regione S1 con metodo Sanger. Dopo valutazione della qualità delle sequenze, queste sono state allineate fra loro e con la sequenza consenso e le sottopopolazioni del vaccino. Le sequenze campionate in allevamento sono state infine classificate come "di campo" o "vaccinali" sulla base della percentuale dell'identità nucleotidica rispetto ai ceppi vaccinali applicati e della conoscenza dell'anamnesi vaccinale dell'allevamento. Dopo traduzione delle sequenze nucleotidiche in aminoacidi è

stata valutata la presenza di *marker* che permettessero una consistente differenziazione nelle due tipologie.

Analisi filogenetica

Sulla base della regione S1, sono stati ricostruiti degli alberi filogenetici utilizzando il metodo di Massima Verosimiglianza implementato in IQ-Tree [12]. A tal fine è stato utilizzato sia l'allineamento nucleotidico che aminoacidico. Sono stati anche ricostruiti dei network di aplotipi utilizzando l'algoritmo *minimum spanning tree*, implementato nella libreria *pegas* di R [13].

RISULTATI

Ricostruzione delle SNV e degli aplotipi vaccinali tramite NGS

La sequenza consenso della regione S1 è risultata essere identica fra i tre lotti vaccinali. In ciascuno di questi però si sono evidenziate diverse SNV, rispettivamente 11, 25 e 15 nei lotti 20381076B, 20381107A e 20381115B. Le SNV differivano sia per localizzazione che per frequenza fra i diversi lotti, con l'eccezione di quattro posizioni variabili condivise (i.e. nt 50, 364, 1172 e 1280) dai tre vaccini. Due ulteriori siti (i.e. 126 e 554) sono risultati variabili in due dei tre lotti (Figura 1).

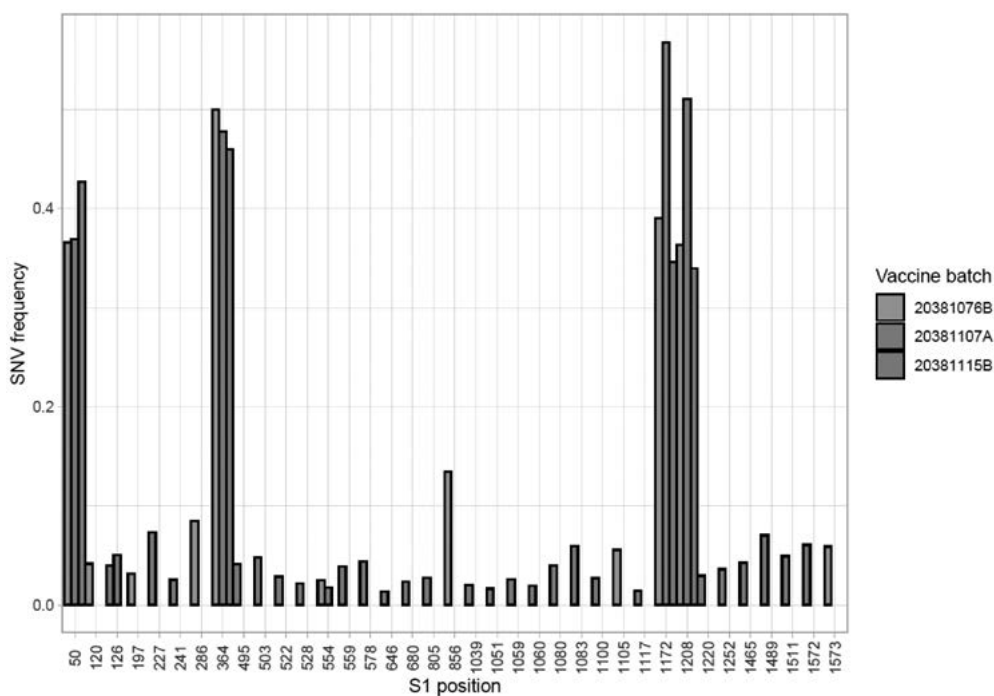


Figura 1. Grafico a barre rappresentante la frequenza dei nucleotidi alternativi rispetto a quelli caratterizzanti la sequenza di riferimento. Solamente le posizioni dell'S1 ove sono state identificate SNV sono state riportate. I diversi lotti vaccinali sono codificati da diversi colori.

La ricostruzione degli aplotipi ha confermato l'identità della sequenza consenso dei diversi lotti, sebbene ciascuno di questi presentasse degli aplotipi minori caratteristici. Degno di nota è stato il riscontro di tre aplotipi che, pur presenti in lotti vaccinali diversi, erano geneticamente simili (Figura 2). In tutti i casi, con una sola eccezione, la variabilità nucleotidica riscontrata determinava delle mutazioni non-sinonimo rispetto al consenso.

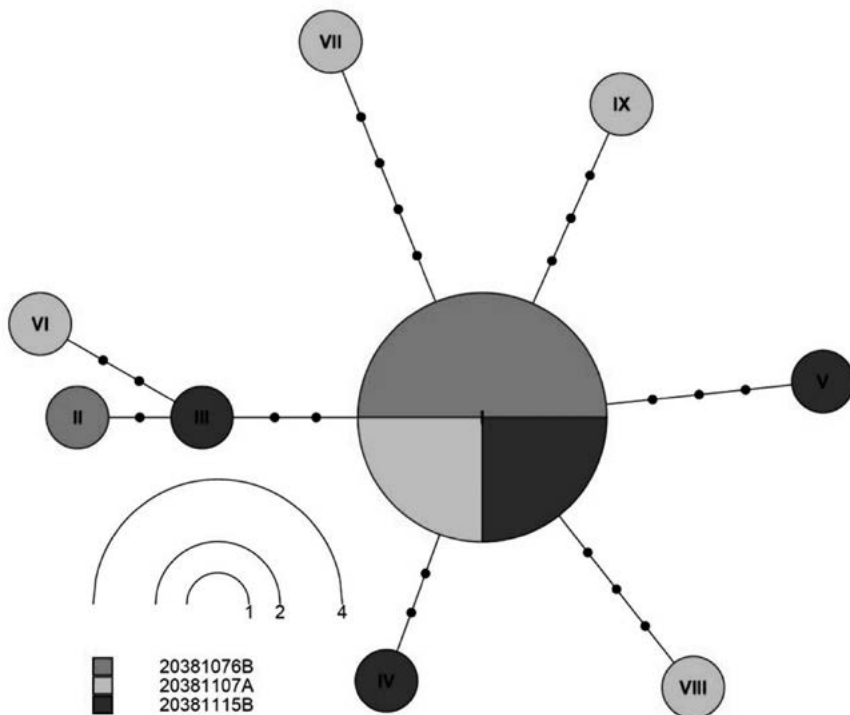


Figura 2. Network degli aplotipi ricostruiti per ciascun lotto vaccinale (codificati con diversi colori). Sequenze identiche sono rappresentate da cerchi il cui diametro è proporzionale alla frequenza della rispettiva sottopopolazione. Il numero di mutazioni è descritto da cerchi neri sui corrispettivi rami.

Analisi dei ceppi di campionati in allevamento.

La sequenza completa nella regione S1 è stata ottenuta da 67 ceppi di campo, dei quali era nota l'anamnesi vaccinale. Combinando quest'informazione, l'analisi filogenetica e il confronto dell'identità di sequenza con le referenze vaccinali, gli stipiti sono stati classificati in "ceppi di campo" (n=38) e "ceppi di origine vaccinale" (n=29). Tre campioni sono stati classificati come ceppi di campo nonostante originassero da animali vaccinati in funzione dell'elevata distanza genetica (i.e. $p\text{-distance} > 0.3\%$; $> 5\text{ mismatch}$). Al contrario, 15 campioni originati da allevamenti non vaccinati sono stati classificati come vaccini in quanto geneticamente fortemente legati alla referenza vaccinale. L'analisi filogenetica ha confermato la presenza di due gruppi principali, uno comprensivo dei ceppi vaccinali, l'altro di quelli di campo (Figura 3).

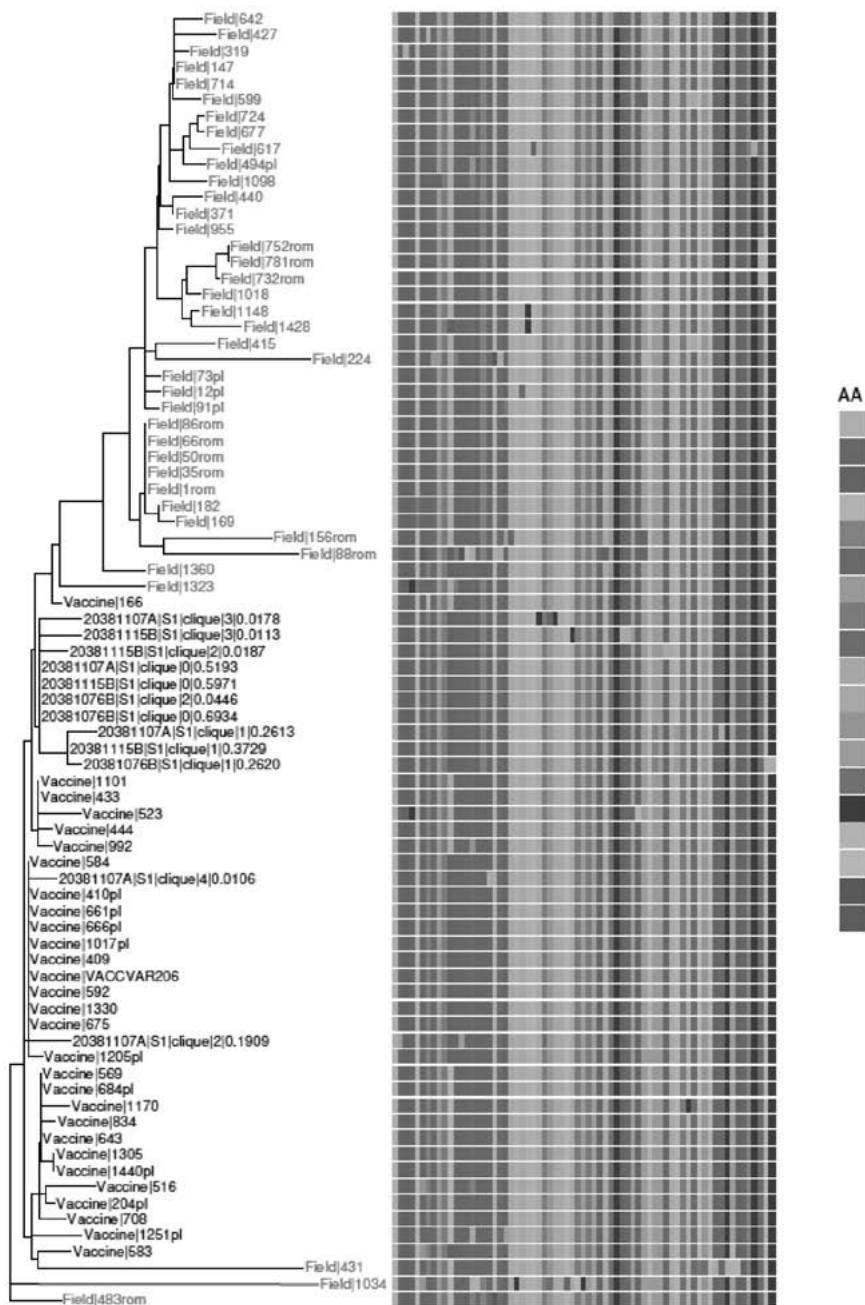


Figura 3. Grafico riportante le relazioni filogenetiche fra i ceppi campionati dagli allevamenti, le sequenze vaccinali consenso e le rispettive sottopolazioni. I ceppi di campo sono stati evidenziati in rosso. Il profilo aminoacidico delle posizioni variabili dell'S1 è riportato a destra di ciascun ceppo.

Sebbene nessuna posizione aminoacidica abbia permesso una sicura identificazione dei ceppi vaccinali, data la presenza di diverse eccezioni, alcuni residui hanno rivelato una diversa distribuzione nei ceppi vaccinali rispetto a quelli di campo (i.e. posizione 61, 93, 122 e 317) (Figura 3).

Nessuna delle sottopopolazioni identificate nei vaccini risultava geneticamente correlata né condivideva posizioni caratteristiche con i ceppi di campo, con una sola eccezione rappresentata dall'aminoacido 122 (Prolina), presente sia nella sequenza consenso che nella maggior parte degli aplotipi vaccinali minori. È interessante notare come il residuo in posizione 122 dei lotti ivi sequenziati differiva rispetto a quello presente nella sequenza del ceppo vaccinale caratterizzato in precedenza ed utilizzato come referenza.

DISCUSSIONE

Questo studio ha premesso di investigare la presenza e le caratteristiche di sottopopolazioni virali in diversi lotti vaccinali per studiarne le implicazioni pratiche. È stato quindi possibile confermare l'eterogeneità intra-vaccino e fra lotti vaccinali. Diverse posizioni della regione S1 hanno rivelato SNV, sebbene con diversa frequenza e localizzazione. Poiché ogni lotto è il risultato di un processo di attenuazione almeno parzialmente indipendente, l'assenza di pattern comuni supporta l'idea di un processo casuale (*genetic drift*) ascrivibile all'elevato tasso di mutazione di IBV, rispetto ad un'evoluzione direzionale frutto di specifici vincoli evolutivi. Similmente, il fatto che la maggior parte delle mutazioni fosse non sinonimo (un tipo di mutazioni solitamente rapidamente eliminate dalla selezione naturale in quanto deleterie per la fitness virale), suggerisce una tendenza "all'esplorazione" casuale di diverse soluzioni evolutive. Ciò detto, un numero limitato di SNV è risultato essere condiviso dalle sottopopolazioni di almeno due lotti. Inoltre, è stata identificata una clade filogenetica che includeva aplotipi presenti nei tre vaccini. Non è quindi possibile escludere la presenza di alcune pressioni che favoriscano una convergenza evolutiva in specifiche posizioni del genoma virale. In alternativa, la somiglianza evidenziata in queste posizioni potrebbe essere il residuo del processo di attenuazione del ceppo di campo. Sarebbe quindi di interesse comprendere se queste varianti presentino un vantaggio evolutivo durante la replicazione *in vivo*. Il confronto con le sequenze dei ceppi di campo sembra negare questa opportunità, data l'assenza di *clustering* di questi aplotipi con ceppi di campo e l'assenza di SNV condivise con quest'ultimi. Di conseguenza, anche ammettendo un effetto primario di ceppi di origine vaccinale nel determinare sintomatologia clinica, questo sarebbe più probabilmente ascrivibile a una progressiva reversione a virulenza in condizioni di campo, piuttosto che alla selezione di varianti più aggressive già presenti nel vaccino. Il confronto con ceppi campionati in allevamento ha inoltre permesso di evidenziare, qualora ve ne fosse ulteriormente bisogno, la difficoltà nella differenziazione di ceppi di campo e vaccini. Non è stato infatti possibile identificare alcun *marker* né a livello di sequenze consenso né di sottopopolazioni. Tuttavia, alcuni residui aminoacidici sono stati più comunemente riscontrati in una delle due categorie, il che permette, sebbene con una limitata confidenza, di propendere per l'una o l'altra, specialmente quando più residui forniscono una classificazione concordante. Data la presenza di molteplici eccezioni, qualsiasi responso deve essere interpretato con cautela e in modo critico. La conoscenza dello status vaccinale può sicuramente contribuire ad un responso più

accurato e andrebbe sicuramente considerato. Anche in questo caso però, un approccio critico è fondamentale, in quanto è ben noto come l'immunità indotta dal vaccino non sia sterilizzante e il *coverage* ottenuto sia spesso parziale. Ne consegue che il riscontro di ceppi di campo in popolazioni vaccinate non possa essere escluso. Similmente, è ben nota la capacità del virus vaccinale attenuato di replicare e diffondere anche fra allevamenti. Ciò permette facilmente di spiegare i risultati talvolta conflittuali fra storia vaccinale e caratterizzazione genetica dei ceppi, riscontrata anche nel presente studio. Un'ultima, fondamentale sfida è rappresentata dall'impossibilità di definire dei chiari *cut-off* di identità nucleotidica che possano supportare la classificazione dei ceppi. Anche nel presente studio, tale criterio è stato fissato sulla base di una *expert opinion*, e presenta quindi dei caratteri di arbitrarietà. Sebbene i lotti vaccinali considerati presentassero un'identica sequenza consenso e le sottopopolazioni non condividessero dei marker con i ceppi di campo, è interessante notare come un lotto più antico del vaccino, precedentemente sequenziato con metodo Sanger e utilizzato come riferimento, presentasse un differente aminoacido in posizione 122, condiviso da alcuni aplotipi minori degli attuali vaccini. L'aspetto più interessante è che i vaccini sequenziati nel presente studio condividevano, in questa posizione, lo stesso profilo aminoacidico dei ceppi di campo, mentre la sequenza vaccinale più antica differiva da questi ultimi e coincideva con i ceppi classificati come vaccini. Di conseguenza, è possibile speculare che una certa variabilità sia presente almeno fra lotti vaccinali prodotti a grande distanza di tempo, complicando ulteriormente la classificazione e l'interpretazione dello scenario epidemiologico. Ceppi di origine vaccinale potrebbero presentare motivi o distanze sistematicamente differenti dai ceppi di campo in funzione dello specifico lotto di produzione. Poiché i tentativi di classificazione al momento si basano proprio su soglie di distanze genetiche e/o posizioni *marker*, le conseguenze di questo fenomeno possono essere facilmente immaginate. Complessivamente, considerate tutte le fonti di incertezza, i risultati del presente studio sottolineano la necessità e superiorità di un'analisi razionale delle sequenze ottenute e dell'anamnesi di allevamento caso per caso, rispetto all'applicazione acritica di un qualsiasi algoritmo decisionale. Una conoscenza approfondita dello scenario epidemiologico, in particolare prima e dopo l'introduzione della vaccinazione, risulterebbe sicuramente di grande beneficio nell'interpretazione dei dati. Infine, la disponibilità delle sequenze del genoma completo dei ceppi vaccinali e dei loro progenitori, sia a livello di consenso che di sottopopolazioni, potrebbe contribuire all'identificazione dei reali marker di attenuazione vaccinale e quindi alla differenziazione degli stessi.

BIBLIOGRAFIA

1. Lombard M, Pastoret PP, and AM Moulin. (2007). A Brief History of Vaccines and Vaccination. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Epizooties* 26: 29–48.
2. Legnardi, M.; Tucciarone, C.; Franzo, G.; Cecchinato, M. (2020). Infectious Bronchitis Virus Evolution, Diagnosis and Control. *Vet. Sci.* 7. doi:10.3390/vet-sci7020079.
3. Franzo G, Swart W, Boyer W, Pasotto D, Ramon G, Koutoulis K and M Cecchinato. (2020). No Good Vaccination Quality without Good Control: The Positive Impact of a Hatchery Vaccination Service Program. *Poult. Sci.* 99: 2976–2982. doi:10.1016/j.psj.2020.03.017.

4. Duffy S. (2018). Why Are RNA Virus Mutation Rates so Damn High? *PLOS Biol.* 16: e3000003, doi:10.1371/journal.pbio.3000003.
5. Franzo G, Naylor CJ, Drigo M, Croville G, Ducatez MF, Catelli E, Laconi A and M Cecchinato. (2016). Evidence of Subpopulations in AMPV Vaccines Using NGS. (2016). In *Proceedings of the Proceedings of 9th International Symposium on Avian Corona- and Pneumoviruses – 4th Annual Meeting of the Cost Action FA1207 on controlling Avian Coronaviruses* (p. 194).
6. Houta MH, Hassan KE, El-Sawah AA, Elkady MF, Kilany WH, Ali A and AS Abdel-Moneim. (2021). The Emergence, Evolution and Spread of Infectious Bronchitis Virus Genotype GI-23. *Arch. Virol.* 166: 9–26.
7. Houta MH, Hassan KE, Legnardi M, Tucciarone CM, Abdel-Moneim AS, Cecchinato, M.; El-Sawah AA, Ali A and G Franzo. (2021). Phylodynamic and Recombination Analyses of Avian Infectious Bronchitis GI-23 Reveal a Widespread Recombinant Cluster and New Among-Countries Linkages. *Animals* 11. doi:10.3390/ANI11113182.
8. Valastro V, Holmes EC, Britton P, Fusaro A, Jackwood MW, Cattoli G and I Monne. (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.
9. Legnardi M, Franzo G, Koutoulis KC, Wiśniewski M, Catelli E, Tucciarone CM and Cecchinato M. (2019). Vaccine or Field Strains: The Jigsaw Pattern of Infectious Bronchitis Virus Molecular Epidemiology in Poland. *Poult. Sci.* 98: 6388–6392, doi:10.3382/ps/pez473.
10. Wilm A, Aw PPK., Bertrand D, Yeo GHT, Ong SH, Wong CH, Khor CC, Petric R, Hibberd ML and N Nagarajan. (2012). LoFreq: A Sequence-Quality Aware, Ultra-Sensitive Variant Caller for Uncovering Cell-Population Heterogeneity from High-Throughput Sequencing Datasets. *Nucleic Acids Res.* 40: 11189–11201, doi:10.1093/nar/gks918.
11. Töpfer A, Marschall T, Bull RA, Luciani F, Schönhuth A and N Beerenwinkel. (2014). Viral Quasispecies Assembly via Maximal Clique Enumeration. *Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)* 8394 LNBI: 309–310. doi:10.1007/978-3-319-05269-4_25.
12. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A and BQ Minh. (2015). IQ-TREE: A Fast and Effective Stochastic Algorithm for Estimating Maximum-Likelihood Phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 32: 268–274, doi:10.1093/molbev/msu300.
13. Paradis E. (2010). Pegas: An R Package for Population Genetics with an Integrated-Modular Approach. *Bioinformatics*, 26: 419–420, doi:10.1093/bioinformatics/btp696.