

Vaccinate:

Report Quasi-Specie virali rilevate in due lotti Priorix Tetra



Report Quasi-Specie virali rilevate in due lotti Priorix Tetra

Nei metodi classici di attenuazione di un virus vaccinale si procede fino a quando non si ottiene un'attenuazione soddisfacente (cioè che abbatte la virulenza senza modificare l'immunogenicità), indipendentemente dal numero di passaggi o da quante mutazioni questo può comportare.

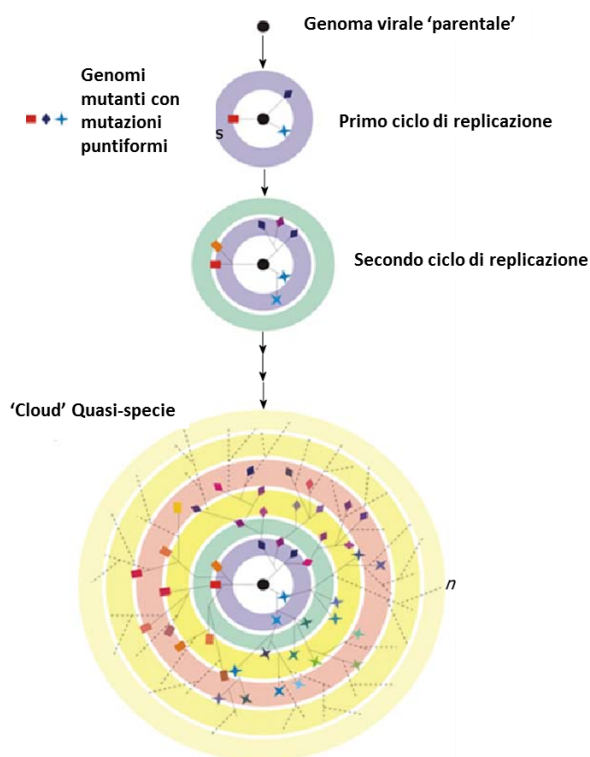
In realtà, con l'eccezione dei ceppi vaccinali contro la polio orale OPV, le mutazioni responsabili dell'attenuazione della maggior parte dei vaccini a virus attenuati non sono state completamente caratterizzate. È comunque dimostrato che in alcuni virus attenuati, il numero di mutazioni attenuanti è piuttosto piccolo.

Dati i rapidi tassi di mutazione di tutti i virus, ma in particolare dei virus a RNA, non sorprende che alcuni virus vaccinali revertano alla virulenza. Questa propensione al ripristino della neurovirulenza è uno dei motivi per cui l'OPV è stato sostituito con il vaccino inattivato di polio virus (IPV).

Tale reversione può verificarsi come un risultato di mutazioni posteriori (back-mutation) che annullano le mutazioni attenuanti, mutazioni compensatorie in altre parti del genoma o per ricombinazione.

I virus sono noti per lo scambio rapido di informazioni genetiche tra ceppi simili e con le cellule ospiti che infettano e questo scambio ha profondi effetti sulla natura e la rapidità dell'evoluzione del virus e dell'ospite.

I virus che costituiscono i vaccini a virus attenuati MPRV (morbillo, parotite, rosolia e varicella) presentano la caratteristica di essere delle quasi-specie, cioè delle popolazioni di mutanti molto simili tra di loro. Le quasi-specie hanno la capacità di interagire con l'ambiente esterno e all'interno del vaccinato adattandosi rapidamente attraverso una selezione dei mutanti più favoriti nella replicazione. Ciò significa che le quasi-specie nel vaccino saranno sempre diverse da quelle che si troveranno nel vaccinato in seguito alla replicazione nell'organismo dopo l'inoculazione, e saranno sempre diverse da quelle che si trovano nell'ambiente. Ciò potrebbe spiegare le ricorrenti epidemie con virus costituiti da quasi-specie in popolazioni con alte coperture vaccinali, e la comparsa di virus vaccinali che revertano e diventano infettivi, vanificando lo sforzo di eradicare il virus.



Modified from Echeverría, N. et al. (2015). *World Journal of Hepatology*, 7, 831-845

Le quasi-specie virali sono definite come 'collezioni' di genomi virali strettamente correlati sottoposti a un processo continuo di variazione genetica, competizione tra le varianti generate e selezione delle distribuzioni più idonee in un dato ambiente.¹

Queste distribuzioni di mutanti (definite anche 'sciami mutanti' o 'nubi mutanti') si generano in cellule e organismi infetti, a seguito della replicazione di virus a RNA e di alcuni virus a DNA.

È importante sottolineare che modelli matematici predicono che le quasi-specie virali non sono semplicemente una raccolta di mutanti diversi, ma un gruppo di varianti interattive, che insieme contribuiscono alle caratteristiche della popolazione.² Gli spettri mutanti sono la fonte dell'adattabilità del virus perché costituiscono depositi dinamici (in continua evoluzione) di varianti virali genotipiche e fenotipiche.

Nella Figura accanto è riportata una rappresentazione schematica che descrive in modo semplice il concetto di quasi-specie: un genoma virale 'parentale' (pallino nero riempito) dà origine a diverse varianti (quadrati colorati, prismi e stelle). I cerchi concentrici rappresentano cicli di replicazione. La distribuzione risultante dopo ripetuti cicli di replicazione viene spesso definita 'cloud' (nuvola) Quasi-specie.

Il concetto di quasi-specie nacque da una formulazione teorica dell'evoluzione molecolare che enfatizzava la replicazione soggetta a errore di semplici replicati RNA o 'RNA-like', caratteristica essenziale dell'auto-organizzazione e della versabilità delle forme di vita primitive.³

Il sequenziamento di nuova generazione (NGS) ha notevolmente espanso la capacità di esaminare la composizione di mutanti quasi-specie virali in

substrati complessi.⁴

¹ Domingo E, Sheldon J, Perales C. Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2012;76(2):159–216

² Eigen M. Viral quasispecies. *Sci Am*. 1993;269:42–9.

³ Eigen M. Self-organization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften*. 1971;58:465–523.

⁴ Seifert D., Beerenwinkel N. (2015) Estimating Fitness of Viral Quasispecies from Next-Generation Sequencing Data. In: Domingo E., Schuster P. (eds) *Quasispecies: From Theory to Experimental Systems*. Current Topics in Microbiology and Immunology, vol 392. Springer, Cham



È già stata descritta in letteratura la presenza di quasi-specie anche in vaccini da virus vivi attenuati. La sequenza genomica e le caratteristiche biologiche delle sottopopolazioni quasi-specie possono differire in modo significativo, e la selezione di una sottopopolazione più virulenta, nell'ospite vaccinato, può avere conseguenze avverse.

Il virus contenuto nel vaccino della parotite è ad esempio una distribuzione di mutanti quasi-specie e la neuro-attenuazione è stata proprio associata a cambiamenti nel livello di eterogeneità genetica in specifici siti genomici (5).⁵ Il ceppo Urabe utilizzato in passato nel vaccino per la parotite (non più utilizzato a causa dell'elevata neuro-virulenza), contiene sottopopolazioni che differiscono nella sequenza del gene per l'emoagglutinina-neuroaminidasi e nella propensione a causare meningiti post-vaccinali (6).⁶ Riguardo il virus vaccinale a DNA della varicella vOka, dal 2002 è noto che non è un singolo virus ma una miscela virale (7).⁷ Anche le popolazioni di virus del morbillo sono quasi-specie. Già in un lavoro del 1988, l'analisi delle infezioni delle cellule HeLa con un ceppo vaccinale di virus del morbillo aveva stimato una diversità intra-popolazione di 6-9 posizioni per genoma (8).⁸ La ricerca sui database pubblici di articoli su quasi-specie del virus della rosolia in vaccini, non ha prodotto alcun risultato.

Lo studio delle quasi-specie è quindi di grande importanza perché permette di valutare vari aspetti:

- se i virus contenuti in un vaccino sono in grado di mutare tra un lotto e l'altro in maniera incontrollabile,
- se nel suo insieme la popolazione di mutanti può contenere dei virus in grado di revertire e infettare il vaccinato,
- se tale popolazione può agire determinando una pressione selettiva sull'ambiente causando un'inevitabile resistenza al vaccino.

Cosa abbiamo trovato?

Dai primi risultati dell'analisi del genoma dei virus vaccinali contenuti in due lotti di Priorix Tetra è confermato quanto segue:

- È stato possibile sequenziare i virus della varicella (virus a DNA), della parotite e del morbillo.
- Il virus della rosolia non era in quantità sufficiente da poter essere sequenziato.
- Dei tre virus sequenziati, il virus del morbillo non era in quantità sufficiente da poter studiare la presenza delle popolazioni di mutanti.

Ne segue che sono stati studiati in maniera approfondita i virus della varicella e della parotite. **I risultati confermano i dati di letteratura che riportano la presenza di quasi-specie per entrambi i virus.**

Va specificato che l'EMA non ha fornito le sequenze dei virus vaccinali a cui fare riferimento per un confronto con i risultati ottenuti dal sequenziamento in quanto coperte da segreto industriale, per cui sono state utilizzate le sequenze presenti nelle banche dati pubbliche. Per i virus della varicella è stato utilizzato come genoma di riferimento quello del virus selvatico, mentre per il virus della parotite il genoma vaccinale Jeryl-Lynn.

Nel genoma della varicella vaccinale sono state individuate 245 varianti rispetto al genoma di riferimento utilizzato per l'analisi (genoma selvatico del ceppo Dumas). Di queste varianti, **154 sono varianti 'maggiori'** rispetto al virus selvatico supportate dalla totalità delle sequenze che coprono il sito polimorfico, **mentre le restanti 91 sono varianti minori** (minority variants) cioè siti che mostrano, rispetto al genoma di riferimento, una mutazione con frequenza inferiore al 100% (generalmente tra l'1% e l'80%).

Dal confronto tra le varianti trovate nei due lotti non emerge alcuna differenza, questo perché la varicella è un virus a DNA con minore frequenza di mutazione.

⁵ Sauder CJ, Vandenburgh KM, Iskow RC, Malik T, Carbone KM, Rubin SA. Changes in mumps virus neurovirulence phenotype associated with quasispecies heterogeneity. *Virology*. 2006 Jun 20;350(1):48-57. Epub 2006 Feb 21. PubMed PMID: 16494912.

⁶ Shah D, Vidal S, Link MA, Rubin SA, Wright KE. Identification of genetic mutations associated with attenuation and changes in tropism of Urabe mumps virus. *J Med Virol*. 2009 Jan;81(1):130-8. doi: 10.1002/jmv.21381. PubMed PMID:19031463.

⁷ Gomi Y, et al. 2002. Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J. Virol*. 76:11447-11459

⁸ Cattaneo R, Schmid A, Eschle D, Bacsko K, ter Meulen V, Billeter MA. Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell*. 1988;55(2):255-65

Per far comprendere in modo più chiaro che cosa si intende con variante minore, di seguito un semplice esempio:

Sito polimorfico G	
Variante MAGGIORE	
ACTGTAC G TTTTAGTC	genoma di riferimento
ACTGTAC A TTTTAGTC	100% delle sequenze mostra la A
Variante MINORE	
ACTGTAC G TTTTAGTC	genoma di riferimento
ACTGTAC G TTTTAGTC	80% delle sequenze mostra la G, come il riferimento
ACTGTAC C TTTTAGTC	20% delle sequenze mostra la C

Nel **genoma vaccinale della parotite sono state individuate 40 varianti minori** rispetto al genoma di riferimento utilizzato per l'analisi (genoma vaccinale Jeryl-Lynn), la maggior parte localizzate nel gene-NP (proteina del nucleocapside) e aventi impatto basso sulla proteina (varianti sinonime, cioè che non portano ad un cambio amminoacidico) o moderato (varianti 'missense' cioè che portano ad un cambio amminoacidico, ovvero a mutazioni non sinonime) nella proteina codificata.

Di seguito un esempio di varianti sinonime e 'missense':

Reference	Alternative	Effect	Impact	Reference Aminoacid	Alternative Aminoacid
CAA A AATC	CAA C AATC	synonymous_variant	LOW	PNNQ	PNNQ
TT	CC	missense_variant	MODERATE	L	P
G TA	G CA	missense_variant	MODERATE	V	A
TT TAGA	CC TAGA	missense_variant	MODERATE	FR	PR
G TC	G CC	synonymous_variant	LOW	GQ	GQ
A TTCCAAAATG	A CTCCAAAATG	missense_variant	MODERATE	GF QNG	GL QNG
A TTTCAGC	C TTTCAGC	missense_variant	MODERATE	D FS	A FS
TT	CT	synonymous_variant	LOW	L	L

In **rosso** sono segnate le varianti delle quasi-specie presenti

In **blu** sono segnate i cambi di amminoacidi determinati dalle varianti delle quasi-specie

Ciò significa che queste mutazioni (sia le varianti 'maggiori' che le varianti minori) danno origine a proteine con diversa immunogenicità e che gli anticorpi che si formeranno di conseguenza potrebbero legarsi in maniera parziale o nulla alle proteine del ceppo selvatico.

Maggiore è il numero di varianti, maggiore sarà la differenza tra gli anticorpi in grado di legarsi ai virus vaccinali e quelli che si legano ai virus infettivi selvatici.

Dal confronto tra le varianti minori della parotite trovate nei due lotti emergono 4 differenze. Ciò significa che i virus a RNA sono in grado di mutare rapidamente, in maniera non controllabile e che lotti diversi possono presentano quasispecie diverse!

È importante ora monitorare nel tempo lotti diversi e testare vaccini diversi contenenti questi virus attenuati per verificare il grado di variabilità delle quasispecie presenti.