

## Zárójelentés a „Teljes genom alapú rotavírus surveillance: a molekuláris epidemiológiai vizsgálatok új megközelítése” c. T100727 ikt. sz. NKFI-OTKA kutatási programról (2016)

A rotavírusok évente 100 milliónál több fertőzést okoznak az 5 évesnél fiatalabb gyermekek körében; ebből 2 millió eset kórházi ápolást igényel és 2013. évi becslések alapján még mindig >200000 eset halállal végződik. 2006-2007 óta két vakcina kapható világszerte, hazánkban is. A vakcinák hatásosságát nagy figyelem kíséri, és ismerve a vírus változékonyságát, számos országban állítottak fel törzsfigyelő hálózatot a cirkuláló törzsek azonosítására és nyomon követésére. A monitorozást rutinszerűen a két felszíni (ún. neutralizációs) fehérje változatainak meghatározásával végzik. Az NKFI-OTKA kutatási projekt célja az volt, hogy teljes genom szekvenciák felhasználásával vizsgálja a rotavírus fertőzések molekuláris epidemiológiai jellemzőit és ezzel alternatívát nyújtson a hagyományos PCR alapú technikákra épülő genotipizálási megközelítések mellett.

### Módszertani fejlesztések

A projekt első évében a csoportunk számára újdonságnak számító, újgenerációs szekvenálással (NGS) kapcsolatos technikák adaptálását és apróbb fejlesztéseket végeztünk saját üzemeltetésű NGS platformon. Módszerünkben első lépésként a székletmintából preparált RNS kivonatból random RT-PCR módszerrel DNS termék készül. Ebből a PCR termékből állítunk elő egyedi azonosítóval (szekvencia vonalkóddal) ellátott, az adott NGS-platformmal (mely jelen esetben az Ion Torrent PGM) kompatibilis DNS könyvtárat. E lépést követően lehetőség nyílik a különböző vonalkóddal jelölt minták összekeverésére. Klonális amplifikációt követően kerül sor a szekvenálásra, melyet különböző áteresztőképességű szekvenáló chip-eken lehet végrehajtani. A kapott egyedi, 120-230 nukleotida hosszúságú szekvenciákat referencia szekvenciákhoz illesztjük. Ennél a műveletnél szigorú illesztési paramétereket beállítva tudjuk az ismert genotípusú szekvenciákhoz hasonlítani a minőségi előkészítésen átesett szekvenciákat. Ez a megközelítés gyors, egyszerű és pontos genotipizálást tesz lehetővé, mely a kapott eredmények szerint jól alkalmazható a rotavírus surveillance vizsgálatokban.

A kialakított protokoll segítségével jelentősen tudtuk csökkenteni az egy rotavírus törzsre eső szekvenálás költségeit részben azzal, hogy egyedi azonosítókkal (szekvencia vonalkódokkal) ellátott adapterek felhasználásával fokoztuk a multiplexitást (akár 96 minta egyidejű futtatására is lehetőség van, ugyanakkor 60-nál több mintát ritkán futtattunk egyidejűleg), részben pedig azzal, hogy egyes lépéseknél a reakcióterfogatókat is csökkenteni tudtuk. Kidolgoztunk egy antigén-antitest kötődésen alapú, mágneses gyöngyök segítségével végzett partikula dúsítási eljárást is, amivel csökkenthető volt a szennyeződések (ti. szennyező gazda eredetű, bakteriális és virális RNS/DNS) mennyisége a mintákban, ami által jobb minőségű és nagyobb mennyiségű releváns szekvencia adathoz juthattunk. A módszer hatásosságát jól szemlélteti, hogy összehasonlító vizsgálatokban adott mintából partikula dúsítással eliminálni lehetett az idegen RNS/DNS mennyiség >90%-át. Ugyanakkor a módszer érzékenysége az eddigi adatok alapján még további fejlesztést kíván, hiszen az alacsony partikulaszámú mintákból általában nem sikerült teljes rotavírus genom szekvenciákat generálni. Az érzékenység fokozásában segíthet majd a megfelelő specificitású antitestek használata is. Vizsgálatainkban ezideig ugyanis kereskedelemben kapható poliklonális ellenanyagokkal dolgoztunk, viszont indiai együttműködés keretein belül kifejlesztett peptid-ELISA módszerben alkalmazott 'kvázi' monoklonális antitestek a partikula-dúsítási eljárásban jobb eredményt hozhatnak.

## Rotavírus genomszekvenálások

A teljes genomszekvenáláson alapuló módszer kidolgozását követően közel 1300, hazai és nemzetközi együttműködésben gyűjtött rotavírusra pozitív mintát dolgoztunk fel három év alatt. Ez nagyságrendileg közel áll a pályázat célkitűzésében szereplő ambiciózus 1600-1800 mintához, ugyanakkor a pályázat 4 éve során a forint gyengülése erősen kihatott a reagens költségekre és végeredményben a megvizsgálható minták/törzsek számára is. Menet közben a minták ~10%-áról bizonyosodott be, hogy nem alkalmas a további elemzésre. Ezen arányszám mögött egyes esetekben a székletminták alacsony vírusszámja állt. Más esetekben pedig az derült ki, hogy az antigén-kimutatáson alapuló rutindiagnosztikai laboratóriumi vizsgálatok időnként fals pozitív eredményeket adnak; így tudtukon kívül olyan mintákat dolgoztunk fel, amelyek valójában rotavírusra negatívak voltak. Ezen okulva, idővel bevezettünk egy rotavírusra specifikus qRT-PCR alapú módszert illetve egy, a genomi RNS poliakrilamid gélelektroforézissel és ezüst festéssel történő kimutatására irányuló módszert. Mindkét technika alkalmasnak bizonyult a virális RNS relatív mennyiségének és integritásának ellenőrzésére és támpontot nyújtott ahhoz is, hogy a megfelelő mintákkal dolgozzunk tovább.

### *Hazai rotavírus törzsdiverzitás felmérésére irányuló vizsgálatok*

Miután a projekt első évében a teljes genom alapú vizsgálatokat sikeresen beépítettük laboratóriumunk módszertani repertoárjába, 2013-2015 között már kizárólag ezt a módszert használtuk a rutin rotavírus törzsmonitorozásban. Összességében, a 2012-2015 közötti időszakot tekintve 867 rotavírusra pozitív székletmintát dolgoztunk fel vírusmetagenomikai megközelítéssel. Ezen felül pedig további 251 db, a 2012 előtti időszakból gyűjtött minta is feldolgozásra került ugyanezzel a technikával.

E jelentés megírásakor a maga teljességében csak a 2012 során gyűjtött törzsek összehasonlító elemzésének eredményei érhetők el. Ebben az évben 484 magyarországi humán rotavírus törzset genotipizáltunk. A leggyakoribb genotípus kombinációk a G9P8 (43%) és a G1P8 (34%) voltak. A genomszekvenálásnak alávetett 125 törzset 9 egyedi genotípus konstellációba tudtuk besorolni; ezek közül 2-2 kissé eltérő konstellációt figyeltünk meg a G9P8, G1P8, és a G2P4 törzseknél, 1-1 egyedi konstellációt pedig a G4P8, G3P4 és a G3P9 genotípusú törzsek esetében. Ennek megfelelően a P8 VP4 genotípusú törzsek túlnyomó többsége az ún. 'Wa-like' genocsoportba tartozott, a P4 VP4 genotípust hordozó törzsek pedig a 'DS1-like' genocsoportba voltak sorolhatóak. Egy-egy G9P8 és G1P8 törzs a két fő genocsoportra jellemző génváltozatok reasszortánsának bizonyult. Hasonlóképp, az egyetlen G3P9 törzs a DS1-like és egy harmadik, az ún. 'AU-1-like' genocsoport reasszortánsa volt. A 11 gén filogenetikai elemzése a főbb genocsoportokon belül további allélkombinációk elkülönítését tette lehetővé. A G1P8 és G9P8 törzsek esetében 4-4, a G4P8 és G2P4 törzsek esetében 3-3 allélkombinációt azonosítottunk. Az egyik említésre méltó megfigyelésünk az volt, hogy a relatíve gyakori G2P4 allélkombinációban a VP1 és VP6 gén valószínűsíthetően egy juh- vagy szarvasmarha-eredetű rotavírus törzsből származhatott. A G4P8 törzsek génösszetételében az ezekkel a törzsekkel együtt keringő G1 és G9 törzsek allélváltozatainak keveredését figyeltük meg. A 2012. évi hazai rotavírus törzsek egyikénél sem találtunk rá bizonyítékot, hogy kialakításukban Rotarix vagy Rotateq vakcinatörzs-eredetű gének vettek volna részt. A törzsek földrajzi megoszlását illetően a G9P8, G1P8 és G2P4 genotípusú rotavírusok között egyaránt találtunk olyan, gyakorinak mondható allélkombinációt, amelyek az ország több régiójában is kimutathatóak voltak; közülük is a domináns G9P8 törzs mind a kilenc vizsgálati helyen előfordult. A minor variánsok általában egy-egy megyéből kerültek elő.

A 2013-2015-re vonatkozó genotípus megoszlást tekintve 2013-ban az előző évihez hasonló törzsmegoszlást figyeltünk meg, a G9P8 (39%) és G1P8 (27%) törzsek relatív dominanciájával. Ugyanakkor 2014-ben és 2015-ben is genotípus-váltást figyeltünk meg;

míg 2014-ben az uralkodó genotípus a G2P4 (67%) volt, addig 2015-ben a G4P8 (69%) genotípus dominált. Ez utóbbi években a G9P8 maradt a második leggyakoribb genotípus kombináció (~13-14%-kal). Ebben az időszakban a ritka genotípusok között találtunk zoonotikus, macska-bovin reasszortáns (G3P9, G6P9) és sertés eredetű (G4P6) törzseket is (<1%-os gyakorisággal). Az erre a periódusra vonatkozó evolúciós számítások kiértékelése ugyan még folyamatban van, egy 2015 során újonnan felbukkanó G3P8 törzs filogenetikai vizsgálatát azonban már elvégeztük. E törzs érdekessége az, hogy nem a G3P8 antigénkombinációra jellemző Wa-like genocsoportba, hanem a DS1-like genocsoportba sorolt rotavírusokéhoz hasonlított a törzsek genotípus konstellációja. További különlegessége e törzseknek az, hogy a G3 VP7 gén valószínűsíthetően lovak rotavírusaitól származik, ami egy ritkának vélt gazdaváltás és reasszortációs esemény eredménye lehet. Ez a törzs az utóbbi években több kontinensen is megjelent és néhol (pl. Ausztráliában) az uralkodó törzsek egyike ez a vírus volt.

Az adatok feldolgozása során véletlenül azonosítottunk néhány (n=4) *Rotavirus C* törzset eredetileg *Rotavirus A* pozitívként kapott székletmintában. E Magyarországon ritkán kimutatott vírusok genetikai elemzése azt mutatta, hogy közeli rokonságban állnak a viszonylag újonnan, Ázsiából ismertté vált genetikai vonallal, ami e törzsek széles földrajzi szóródását mutatja.

#### *Nemzetközi együttműködésekben elvégzett felmérések*

Olaszországi, tajvani, indiai és kameruni kollégák által kezdeményezett rotavírus genomikai és molekuláris epidemiológiai projektek közös megvalósítására is sor került a pályázat támogatásával.

- Olaszországi együttműködések
  - o A Parmai Egyetem munkatársaival (Prof Medici és mtsai) együttműködve megszekvenáltunk és elemeztünk 15, a 2009-2013 időszakból származó G3P8 rotavírus törzset. A felszíni antigének alapján a törzsek két csoportba voltak oszthatók: többségük a G3-I és P8-III klaszterbe tartozott, egy törzs pedig a G3-I és P8-IV klaszterbe volt sorolható. Ezen felül ugyanezzel a csoporttal történt együttműködésben azonosítottunk és elemeztünk két *Rotavirus C* fajba tartozó humán törzset is, amelyek VP3 génjükben különböző genotípust képviseltek.
  - o A Palermo Egyetem munkatársaival (Prof De Grazia és mtsai) együttműködve 23 G12 törzs szekvenálását végeztük el. Az egyik G12 törzs különösen érdekes volt, mert számos, addig ismeretlen génváltozatot hordozott. A VP7, VP4, NSP1, és NSP4 génjében a törzs a világszerte sporadikusan előforduló G12P9 törzsekre hasonlított. A VP6, NSP3, és NSP5 génjei viszont állati (nyúl és szarvasmarha) eredetű törzsekre emlékeztetett, míg a VP1-VP3 és NSP2 gének új genotípust képviseltek. Az új genotípus-jelölteket azóta a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport (RCWG) ratifikálta. A többi G12 (G12P8) törzs genetikai elemzése több (legfeljebb 5), egymástól független behurcolásról árulkodott, relatíve rövid időn belül. A vizsgálati években e törzsek összességében jelentős prevalenciát mutattak, ami részben a kérdéses típus elleni antitestek populáció szintű hiányával is magyarázható.
  - o A Bari Egyetem munkatársaival (Prof Martella és mtsai) együttműködésben azonosítottunk egy új VP7 genotípust (G29) egy bari-i csecsemő kevert rotavírus fertőzésből. Közel rokon VP7 gént indiai együttműködésben szarvasmarhából is kimutattunk, de akkor a részleges génszekvencia alapján az új genotípus ratifikálása nem történt meg.
- Tajvani együttműködés
  - o A tajvani CDC munkatársaival (Wu és mtsai) végzett közös munkában ~700 G2P4 és G1P8 törzs neutralizációs antigénjeinek filogenetikai elemzését végeztük el. Mindkét genotípus kombináció esetében több genetikai vonal együttes cirkulációját

- észleltük és megfigyeltük az egyes genetikai vonalak relatív jelentőségének változását is évről évre. Ezen felül a G2P4 genotípus esetében új genetikai vonalakat írtunk le mind a G2 VP7, mind a P4 VP4 génekre, továbbá számos addig nem azonosított antigén kombinációt is meghatároztunk.
- Ebben a kooperációban a teljes genomszekvenálások és elemzések elsősorban zoonotikus törzsek jellemzésére irányultak. A pályázati támogatás ideje alatt publikált (G8P14, G3P3, P6 és P19) törzsekre vonatkozó részleges genetikai jellemzéseket mára teljes genomra vonatkozó elemzésekkel frissítettük. Ezek a vizsgálatok megerősíteni látszanak azt, hogy a tajvani P6 és P19 VP4 genotípusú humán törzsek sertésből erednek, továbbá azt is, hogy egy-egy sporadikusan azonosított G3P3 és G8P14 törzs kutyától illetve valamilyen kérődző gazdaállattól származik. Az adatok egy részét már publikáltuk, de az újabb elemzésekből további publikációk várhatóak a következő év során.
  - Kameruni együttműködés
    - Kameruni kollégákkal végzett együttműködésben részt vettünk különböző földrajzi régiókból származó rotavírus törzsek vizsgálatában. A rotavírus fertőzések gyakoriságának felmérésén túl vizsgálataink kiterjedtek a felszíni antigének genotípusainak vizsgálatára, valamint 31 törzs teljes genetikai jellemzésére is. Ebben a projektben módszertani szempontból az egyik lényeges felismerés az volt, hogy a hagyományos módszerrel (azaz multiplex PCR-rel) végzett genotipizálás alkalmatlannak bizonyult a G6 genotípusú törzsek kimutatása esetén. Ugyanis a G12 VP7 genotípusra tervezett, és nemzetközi együttműködésben validált genotipizáló PCR primer aspecifikusan kötődött és félretipizálta ezeket a törzseket a hagyományos fészkes-PCR alapú tipizáló vizsgálatban. Ez a megfigyelés az általunk újonnan használt módszer előnyeit mutatja a széles körben használt (és a WHO által is preferált), PCR fragmens hossz különbségeken alapuló tipizálási módszerekkel szemben. Ennek megfelelően, újra értékelve a hagyományos módszerekkel kapott eredményeket rá kellett ébrednünk, hogy a korábban csak sporadikus esetekből ismert G6 genotípusú törzsek jóval gyakoribbak ebben a régióban, mint azt korábban sejtettük. További érdekes megállapítás volt, hogy kameruni csecsemőktől és különböző háziállatoktól (úm. sertés, borjú) párhuzamosan gyűjtött mintákból ugyanazt a G12 rotavírus törzset azonosítottuk, ami felveti e gazdafajok rezervoár szerepét a G12 törzsek fennmaradásában.

## Összefoglaló tanulmányok

- Az Infection, Genetics and Evolution folyóirat számára Jon Gentsch (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia, USA) közreműködésével vendégszerkesztői feladatot ellátva különszámot jelentettünk meg "Genetic diversity and evolution of rotavirus strains: possible impact of global immunization programs" címmel.
- Összefoglaló közleményben vizsgáltuk a vakcinák bevezetése óta dokumentált rotavírus genotípus megoszlásra vonatkozó információkat, közel 47000 törzsre elérhető adat elemzésével. A 2006-2013 közötti időszakban a vakcina bevezetése előtti időszakhoz képest nem változott az orvosi szempontból jelentős genotípusok megoszlása. És bár a vizsgálati időszak alatt 11 új antigén kombinációt jelentettek a világ különböző részeiről, ezek egyike sem jelentett valós járványügyi veszélyt. Mindazonáltal figyelemre méltó az a tény, hogy az új kombinációk egy része a humán-bovin reasszortáns vakcina törzsek és vad-típusú törzsek reasszortációjából alakult ki.
- Egy másik összefoglaló közleményben rámutattunk arra, hogy a globálisan hozzáférhető rotavírus vakcinák (Rotarix és Rotateq) egyaránt kiválóan védő hatású homo- és heterotípusos immunválaszt; így jelenleg nincs okunk azt feltételezni, hogy a vakcinában nem szereplő antigén változatok ellen, beleértve az újonnan (pl. állatokból) felbukkanó antigén változatokat is, ne lennének alapvetően hatásosak ezek a vakcinák.
- A humán rotavírusok zoonozisos eredetéről adott áttekintésben azon túlmenően, hogy taglaltuk az állatról emberre történő terjedés változatait és azok lehetséges ökológiai

alapjait, az újabb irodalmi adatokra hivatkozva arra a felismerésre is kitértünk, hogy a zoonotikus törzsekkel szembeni fogékonyságot részben a gazdaszervezet vércsoportja határozza meg.

### **Az eredmények publikálása**

A vizsgálatok eredményeiből eddig egy könyvfejezet és 22 nemzetközi folyóiratcikk készült, melyek kumulatív impakt faktora 61,338 (Q1 folyóiratban - 15; Q2 - 6; Q3 - 1) (ezekre eddig >100 független hivatkozást kaptunk). Ezenkívül két kézirat van jelenleg elbírálás alatt és reményeink szerint legalább további 3-4 kéziratot fogunk még közlésre benyújtani 2016-2017-ben. Ezek a tervezett publikációk a 2013-2015 évi teljes genomszekvenálásra épülő surveillance vizsgálat eredményeit, valamint egyes genotípusok (pl. P9, G1-G4, G9 és G12) evolúciós mechanizmusait mutatják majd be. Ezen felül további publikációk várhatóak az olaszországi és tajvani együttműködésekben vizsgált törzsek elemzéseiből.

Jelen pályázat is segített két diplomamunka elkészítésében (Borzák Réka, ELTE, 2012; Dallos Bianka, BME, 2012). Továbbá Alessandro Magri olaszországi MSc hallgató (University of Parma), aki Erasmus ösztöndíjjal vendégeskedett nálunk, téziseit szintén pályázatunk segítségével készítette. PhD disszertációját Antalné László Brigitta 2013-ban védte a Debreceni Egyetemen, míg Valentine Ngum Ndze 2014-ben védte meg doktori téziseit a kameruni Yaounde-i Egyetemen (bár ez utóbbi mű alapjául szolgáló cikkekben a pályázatra történő hivatkozások megjelennek, sajnos a disszertációban ennek nincs nyoma). Dóró Renáta a PTE Biológiai Doktori Iskolájába nyert felvételt követően teljes képzési ideje alatt a hazai rotavírus surveillance vizsgálatokban vett részt. Készülő disszertációjának témája ("Humán rotavírusok evolúciós mechanizmusai") a 2012-2015 közötti időszakban szekvenált rotavírus törzsek genomszekvenálásának vizsgálati eredményeire épül.

### **Összegzés**

Összefoglalva, a rotavírus RNS-ről random generált DNS könyvtárak alkalmasak voltak a teljes virális genomok összeállítására és a módszer szélesebb genotípus spektrumúnak bizonyult, mint bármely, jelenleg használt rotavírus genotipizáló rendszer. A kidolgozott bioinformatikai algoritmus megbízhatóan azonosítja a gyakori és ritka genotípusokat, valamint a kevert fertőzéseket egyaránt. Mindezen felül a laboratóriumunkban meghatározott ~1200 rotavírus genom nagyságrendileg ma példa nélküli a szakirodalomban. Csak hogy érzékeltessük ennek az adatmennyiségnek a nagyságát, jelenleg a Génbank adatbázisban megközelítőleg 2900 olyan rotavírus (*Rotavirus A*) genomszekvencia van deponálva, amely a világ más laboratóriumaiból származik. Más szavakkal, az általunk ma ismert, elemzésbe vonható teljes rotavírus genomszekvenciák közel 30%-át mi határoztuk meg. A vizsgálati időszak alatt jelentős genotípus diverzitást figyeltünk meg, melynek eredményeként több új genotípusról is beszámoltunk. A pályázati időszak alatt nyert tapasztalok alapján igazolva látjuk azt a kezdeti elképzelésünket, miszerint a teljes genomszekvenálásnak jelentős szerepe kell, hogy legyen a jövőben végzett rotavírus törzsmonitorozás területén, amihez természetesen az is kell, hogy a módszert még költségkímélőbb módon lehessen majd kivitelezni.