

ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM  
Állatorvostudományi Doktori Iskola

**EMLŐSÖK ÉS MADARAK ROTAVÍRUSAINAK  
ÖSSZEHASONLÍTÓ FILOGENETIKAI  
VIZSGÁLATA**

Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei

Harami-Papp Hajnalka

Budapest, 2017

**Egyetemi doktori (PhD) értekezés tézisei**

**EMLŐSÖK ÉS MADARAK ROTAVÍRUSAINAK  
ÖSSZEHASONLÍTÓ FILOGENETIKAI  
VIZSGÁLATA**

**Harami-Papp Hajnalka**

Témavezető: Dr. Bányai Krisztián



**ÁLLATORVOSTUDOMÁNYI EGYETEM  
Állatorvostudományi Doktori Iskola**

Budapest, 2017

## Bevezetés

A Rotavirus nemzetség a *Reoviridae* család köz-, és állategészségügyi szempontból jelentős csoportja. A súlyos lefolyású gyomor-bélhurut (gastroenteritis) eseteknek emberekben és állatokban egyaránt az egyik leggyakoribb kórokozója.

Világszerte az 5 éves kor alatti gyermekek közel 95%-a legalább egyszer átesik rotavírus fertőzésen. Évente közel kétmillió gyermek szorul kórházi ellátásra és félmillió hal meg a fertőzés következtében. A gazdasági haszonállatok állományában számottevő károkat okoznak a rotavírus fertőzést kísérő tünetek, úgyszintén a testsúlycsökkenés, fejlődésbeli visszamaradás, végül a súlyos folyadékvesztés nyomán bekövetkező elhullás.

Egészségügyi jelentőségük miatt mind a humán, mind az emlős rotavírusok széleskörű kutatások tárgyát képezik. Ugyanakkor a házi- és vadmadarak rotavírusairól meglehetősen kevés információval rendelkezünk, bár gazdasági jelentőségük ugyancsak nem elhanyagolandó. A rotavírusok lineáris, szegmentált dsRNS genommal rendelkeznek. Ez a felépítés lehetőséget ad a szegmensek vírustörzsek közötti

keveredésére a (reasszortáció), mely nagyfokú genetikai diverzitást eredményez a rotavírusok között.

A fentiekből következően az Új kórokozók felfedezése Témacsoportunk (MTA ATK Állatorvos-tudományi Intézet) különféle, ritkán vizsgált gazdafajokból származó nagyszámú rotavírus genom szekvencia adat gyűjtését és feldolgozását tűzte ki elsődleges céljául. Az azonosított vírustörzsek genomjának összehasonlításával egyrészt szeretnénk feltérképezni az egyes evolúciós mechanizmusok diverzitás kialakításában betöltött jelentőségét. Másrészt, a nyert adatok segítségével jellemezhetővé válik a rotavírusok országokon és tájegységeken átívelő eloszlása, és könnyen követhetővé a különböző járványos megbetegedést okozó törzsek migrációja. E járványtani megfigyelések a jövőben lehetőséget adhatnak hatékonyabb védekezési stratégiák kidolgozására.

A széleskörű adatgyűjtés érdekében a korábban alkalmazott hagyományos laboratóriumi technikák mellett bevezettünk csoportunkban egy következő generációs molekuláris biológiai módszert is. Eredményeink tudományos bemutatására az így nyert adataink felhasználásával filogenetikai és összehasonlító vizsgálatokat végzünk.

## Célkitűzések

1. Hazai eredetű, valamint nemzetközi együttműködésben kutatócsoportunkhoz eljuttatott ritka vagy nehezen azonosítható A csoportú rotavírus (RVA) törzsek genomjának meghatározása klasszikus molekuláris módszerek adaptálásával.
2. Új generációs szekvenálás (IonTorrent szemikonduktív szekvenálás) módszerének bevezetése a klasszikus molekuláris módszerekkel nehezen vagy nem jellemezhető A csoportú rotavírusok (RVA) teljes genomjának meghatározására.
3. Irodalmi összefoglalók alapján az egyes gazdafajokból származó A csoportú rotavírus (RVA) törzsek genetikai diverzitásának feltérképezése, majd az általunk feldolgozott minták összehasonlítása a nemzetközi adatokkal.

## **Anyag és módszer**

### **Minták**

A vizsgálatainkhoz felhasznált 12 rotavírus pozitív bélsár/bélszövet mintát a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal (NÉBIH), a CEVA-Phylaxia Oltóanyagtermelő Zrt., a kuvaiti Public Authority for Agriculture and Fish Resources, valamint az írországi Irish Equine Centre munkatársai bocsájtották rendelkezésünkre. A minták ló, ó-világi teve, kutya, házityúk, fácán és pulyka gazdafaj eredetűek voltak, melyek Magyarországon, Írországban valamint Kuvaitban kerültek gyűjtésre.

### **Molekuláris módszerek**

A bélsárminták szuszpenziójából a teljes RNS kivonása QIAamp viral RNA Mini Kit (QIAGEN) segítségével történt. A rotavírus törzsek genomjának teljes vagy részleges meghatározását részben klasszikus molekuláris módszerekkel végeztük, a 12 törzsből nyolc esetében. Ennek során a virális dsRNS-ről egy-, vagy kétlépéses RT-PCR során készítettünk cDNS átíratot, melynek további PCR alapú amplifikálásához nagy számú specifikus primert terveztünk. Az így kapott DNS nukleinsav sorrendjét a klasszikus, Sanger-féle

szekvenálási módszerrel határoztuk meg. A genom szegmensvégek meghatározását RNS ligálásos módszerrel végeztük.

Négy rotavírus törzs teljes genomjának meghatározására egy új generációs szekvenálási módszert vezettünk be. Ennek során először egy módosított SISPA (sequence independent single primer amplification) módszerrel erősítettük fel a vírusgenomot, majd ezt követően a teljes genom meghatározását egy Ion Torrent szemikonduktor szekvenáló készülék felhasználásával végeztük (Ion Personal Genome Machine®, Life Technologies).

A Sanger-féle szekvenálás eredményeként visszkapott szekvencia adatokat BioEdit, valamint GeneDoc programokkal ellenőriztük, és illesztettük homológ referenciákhoz. Az Ion Torrent szekvenáló készülék adta eredményeket a CLC Bio programmal (<http://www.clcbio.com/>) dolgoztuk fel.

A filogenetikai törzsfák elkészítéséhez a MEGA5 programot használtuk, maximum likelihood fa-rekonstrukciós algoritmust és a Bayes-i információs kritérium segítségével kiválasztott szubsztitúciós modellt alkalmazva. A törzsfá megbízhatóságát 500-szor megismételt bootstrap teszttel ellenőriztük.

## Eredmények

### Emlős rotavírusok

Nemzetközi együttműködésben először határoztunk meg két **ló eredetű RVA** genomot teljes hosszúságában. Mindkét törzs Írországból, közel azonos időből, azonos gyűjtésből származott, és hasonló genom összetétellel rendelkezett, ennek ellenére jelentős filogenetikai eltérést mutatott. Az egyik ló RVA törzs nagyfokú szekvenciális hasonlóságot mutatott egy Dél-Afrikából származó ló RVA törzssel. A másik írországi ló RVA törzs kisebb mértékben, de eltért az együttműködés által feldolgozott, illetve számos azóta publikált további ló RVA törzsektől. Egyes génjei Argentínából, míg más génjei Japánból vagy Nagy-Britanniából származó ló RVA törzsekkel mutattak rokonságot. A ló RVA-k epidemiológiájának jobb megismerése érdekében irodalmi összehasonlító vizsgálatot is végeztünk.

Meghatároztuk egyúttal egy **teve eredetű RVA törzs** részleges genomját, melynek bizonyos génjeiről elsőként szereztünk szekvencia információt klasszikus molekuláris módszerekkel. A meghatározott gének juh, szarvasmarha, sertés és humán eredetű RVA törzsekkel alkottak egy leszármazási csoportot, elkülönülve további



Egyiptomból és Kuvaitból származó teve RVA törzsektől. A filogenetikai elemzés alapján feltételezhető, hogy a vizsgált teve RVA törzs humán és állati RVA törzsek reasszortációja során keletkezett. Az NSP4 gén szekvenciájának nukleinsav hasonlósága a korábban meghatározott 14 féle E genotípushoz viszonyítva alatta maradt a 80 %-os hasonlósági határértéknek, ezért a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport hozzájárulásával új, E15 számú genotípusként lett bevezetve.

Meghatároztunk továbbá egy **kutya eredetű RVA törzs** teljes genomját új generációs szekvenálás módszerével. A kutya RVA törzs legnagyobb, teljes genomra kiterjedő szekvencia hasonlóságot egy olaszországi eredetű, bélgyulladásos gyermekből származó humán RVA törzssel mutatta, és NSP1 gén esetében e két törzs egyedi (A15) genotípust hordozott. Ugyanakkor a kutya RVA törzs más kutya/macska RVA törzsekkel is mutatott leszármazási kapcsolatot. A kutya RVA törzs és a 99%-ban hasonló humán RVA törzs alapján feltételezhető a kutyáról-emberre történő gazdafaj átmenet.

## **Madár rotavírusok**

Meghatároztuk továbbá hét, magyarországi eredetű madár RVA törzs teljes, illetve részleges genomját fácán és pulyka gazdafajokból, valamint egy laboratóriumi kontrollként alkalmazott, házityúk eredetű rotavírus izolátum teljes genomját, klasszikus molekuláris módszerekkel valamint új generációs szekvenálás módszerével.

A **házityúk RVA törzs** genomösszetétele eltért a korábban az irodalomban leírt házityúk RVA törzsek genomösszetételétől, és inkább pulyka RVA törzsekre jellemző genotípus konstellációval rendelkezett.

A **fácán eredetű RVA törzsek** ( $n = 5$ ) meglehetősen változékonyságot mutattak, egy törzs nagymértékben hasonlított már korábban meghatározott németországi, illetve magyarországi fácán RVA törzsekre. Két fácán RVA törzs magas fokú hasonlóságot mutatott pulyka RVA törzsekkel. Két fácán RVA törzs tyúk eredetű RVA törzsekkel mutatott leszármazási kapcsolatot. Feltételezésünk szerint a fácán RVA törzsek könnyen vesznek részt reasszortációs eseményekben más madarak rotavírusaival.

A két meghatározott magyarországi **pulyka RVA törzs** között nagyfokú nukleinsav szekvencia hasonlóság állt fenn, valamint további pulyka RVA törzsekkel mutattak szoros leszármazási kapcsolatot. A hazai madár RVA törzsek teljes vagy részleges genom meghatározására részben klasszikus molekuláris módszereket, részben új generációs szekvenálás módszert alkalmaztunk.

## Új tudományos eredmények

1. Részvételünkkel elsőként került meghatározásra ló eredetű A csoportú rotavírusok teljes genomszekvenciája. A filogenetikai elemzés a ló RVA-kra jellemző erősen konzervált genom konstellációt tárt fel.

2. Elsőként határoztunk meg teve eredetű A csoportú rotavírus részleges nukleinsav szekvenciáját VP7, VP4, VP1, VP2, NSP2, NSP3, NSP4, és NSP5 génekből. A filogenetikai elemzés után javaslatot tettünk új NSP4 genotípus bevezetésére (E15), melyet a Rotavírus Klasszifikációs Munkacsoport elfogadott.

3. Elsőként határoztuk meg egy hazai eredetű kutya A csoportú rotavírus teljes genomszekvenciáját. A filogenetikai elemzés eredménye bizonyítékul szolgált a szokatlan NSP1 A15 genotípus kutya RVA eredetére, mely alátámasztja a direkt kutyáról emberre fajok közti átmenet elméletét.

4. Elsőként határoztuk meg magyarországi eredetű, madár gazdafajokból (házityúk, fácán, pulyka) származó nyolc RVA törzs teljes vagy részleges genomját. Megállapítottuk, hogy ezen madár RVA törzsek genomösszetételére a különböző gazdafaj eredetű gének alkotta mozaikosság jellemző, melynek hátterében a

reasszortáció állhat, hozzájárulva a madár rotavírusok genetikai állományának változékonyságához.

## Tudományos publikációk

**Lektorált, impakt faktoralal rendelkező tudományos folyóiratban megjelent közlemények**

Papp H., Mihalov-Kovács E., Dóró R., Marton S., Farkas S.L., Giammanco G.M., De Grazia S., Martella V., Bányai K. **Full-genome sequencing of a Hungarian canine G3P[3] Rotavirus A strain reveals high genetic relatedness with a historic Italian human strain** Virus Genes 50: pp. 310-315. (2015)

IF: 1,285

Papp H., Malik Y.S., Farkas S.L., Jakab F., Martella V., Bányai K. **Rotavirus strains in neglected animal species including lambs, goats and camelids** Virusdisease 25: pp. 215-222. (2014)

IF: 0,364

Papp H., Marton S., Farkas S.L., Jakab F., Martella V., Malik Y.S., Palya V., Bányai K. **Classification and characterization of a laboratory chicken rotavirus strain carrying G7P[35] neutralization antigens on the genotype 4 backbone gene configuration** Biologicals 42: pp. 299-304. (2014)

IF: 1,209

Papp H., Rigó D., Dán Á., Farkas S.L., Oldal M., Jakab F.,  
Bányai K. **Szokatlan rotavírus antigén  
kombináció azonosítása fiatal fécánban** Magyar  
Állatorvosok Lapja 136: pp. 729-735. (2014)

IF: 0,185

Papp H., Matthijssens J., Martella V., Ciarlet M., Bányai  
K. **Global distribution of group A rotavirus  
strains in horses: A systematic review** Vaccine  
31: pp. 5627-5633. (2013)

IF: 3,49

Matthijssens J., Mino S., Papp H., Potgieter C., Novo L.,  
Heylen E., Zeller M., Garaicoeachea L., Badaracco  
A., Lengyel G., Kisfali P., Cullinane A., Collins P.,  
Ciarlet M., O'Shea H., Parreno V., Banyai K.,  
Barrandeguy M., Van Ranst M. **Complete  
molecular genome analyses of equine rotavirus  
A strains from different continents reveal  
several new genotypes and a largely conserved  
genotype constellation** Journal Of General  
Virology 93: pp. 866-875. (2012)

IF: 3,13

Papp H.\*, Al-Mutairi L.Z.\*, Chehadeh W., Farkas L.S.,  
Lengyel Gy., Jakab F., Martella V., Szűcs Gy.,  
Bányai K. **Novel NSP4 genotype in a camel**

**G10P[15] rotavirus strain** Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica 59: pp. 411-421. (2012)

\*megosztott első szerzőség

IF: 0,65

**Nemzetközi konferencia kiadványban megjelent absztraktok**

Papp H., Borzák R., Farkas Sz., Kisfali P., Lengyel Gy., Molnár P., Melegh B., Matthijnssens J., Jakab F., Martella V., Bányai K. **Independent zoonotic transmission of porcine G4P[6] rotaviruses identified sporadically in hungarian pediatric patients over a 15 year period**; 5th European Rotavirus Meeting, 2013.10.6-9., Valencia, Spanyolország (2013)

Papp H., Dán Á., Ursu K., Bányai K. **Reassortant rotavirus strains identified in Hungarian pheasants**; FEMS 2013, 5th Congress of European Microbiologists, 2013.07.21-25., Leipzig, Németország, (2013)

Papp H., Al Muair L.Z., Lengyel G., Grósz G., El-Sayed F.H., Esam A.A., Szűcs G., Bányai K. **Molecular characterization of a Kuwaiti camel rotavirus**



**strain**; 4th European Rotavirus Meeting, 2011.10.2-5., Altafiumara, Olaszország (2011)

László B., Papp H., Dandár E., Deák J., Gray J., Iturriza-Gomara M., Jakab F., Juhász Á., Kovács J., Kónya J., Lengyel Gy., Martella V., Mészáros J., Mészner Zs., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Puskás E., Schneider F., Tóth A., Tóth E., Szűcs G., Bányai K. **Prevalence of human rotavirus strains in Hungary, 2007-2011**; 4th European Rotavirus Meeting, 2011.10.2-5., Altafiumara, Olaszország (2011)

László B., Papp H., Dandár E., Deák J., Gray J., Iturriza-Gomara M., Jakab F., Juhász Á., Kovács J., Kónya J., Lengyel Gy., Martella V., Mészáros J., Mészner Zs., Mihály I., Molnár P., Nyúl Z., Pátri L., Puskás E., Schneider F., Tóth A., Tóth E., Szűcs Gy., Bányai K. **Emerging human rotavirus strains, 2007-2010, Hungary**; International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance 2011.02.4-7., Bécs, Ausztria (2011)

**Doktori kutatás témájához nem kapcsolódó tudományos közlemények**

Pongor L., Harami-Papp H., Méhes E., Czirók A., Gyórfy B. **Cell Dispersal Influences Tumor Heterogeneity and Introduces a Bias in NGS Data Interpretation.** Scientific Reports. 2017 Aug 4;7(1):7358.

IF: 4,259 (2016)

Menyhárt O., Harami-Papp H., Sukumar S., Schäfer R., Magnani L., de Barrios O., Gyórfy B. **Guidelines for the selection of functional assays to evaluate the hallmarks of cancer.** Biochim Biophys Acta. 2016 Dec;1866(2):300-319.

IF: 5,083

Harami-Papp H., Pongor L.S., Munkácsy G., Horváth G., Nagy Á.M., Ambrus A., Hauser P., Szabó A., Tretter L., Gyórfy B. **TP53 mutation hits energy metabolism and increases glycolysis in breast cancer.** Oncotarget. 2016 Oct 11;7(41):67183-67195.

IF: 5,008

Papp H., László B., Jakab F., Ganesh B., De Grazia S., Matthijssens J., Ciarlet M., Martella V., Bányai K.  
**Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle** *Veterinary Microbiology* 165: pp. 190-199. (2013)

IF: 3,13

Ndze V.N., Achidi E.A., Papp H., Kovács E., Farkas S.L., Adiogo D., Kisfali P., Ngeng M.B., Abena M.T.O., Martella V., Esona M.D., Bányai K. **Shared G12 VP7 gene among human and bovine rotaviruses detected in Cameroonian villages** *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 60:(1) pp. 21-28. (2013)

IF: 0,65

Ndze V.N., Papp H., Akum A.E., Hortense G.K., László B., Farkas S., Kisfali P., Melegh B., Esona M.D., Bowen M.D., Bányai K., Gentsch J.R., Obama Abena M.T. **One Year Survey of Human Rotavirus Strains Suggests the Emergence of Genotype G12 in Cameroon** *Journal of Medical Virology* 85:(8) pp. 1485-1490. (2013)

IF: 2,37

Papp H., Borzák R., Farkas S., Kisfali P., Lengyel G., Molnár P., Melegh B., Matthijssens J., Jakab F.,

Martella V., Bányai K. **Zoonotic transmission of reassortant porcine G4P[6] rotaviruses in Hungarian pediatric patients identified sporadically over a 15 year period** Infection, Genetics and Evolution 19: pp. 71-80. (2013)

IF: 2,77

László B., Kónya J., Dandár E., Deák J., Farkas Á., Gray J., Grósz G., Iturriza-Gomara M., Jakab F., Juhász Á., Kisfali P., Kovács J., Lengyel Gy., Martella V., Melegh B., Mészáros J., Molnár P., Nyúl Z., Papp H., Pátri L., Puskás E., Sántha I., Schneider F., Szomor K., Tóth A., Tóth E., Szűcs Gy., Bányai K. **Surveillance of human rotaviruses in 2007-2011, Hungary: exploring the genetic relatedness between vaccine and field strains** Journal of Clinical Virology 55:(2) pp. 140-146. (2012)

IF: 3,29

Mladenova Z., Papp H., Lengyel G., Kisfali P., Steyer A., Steyer A.F., Esona M.D., Iturriza-Gómara M., Bányai K. **Detection of rare reassortant G5P[6] rotavirus, Bulgaria** Infection, Genetics and Evolution 12: pp. 1676-1684. (2012)

IF: 2,77

Ursu K., Papp H., Kisfali P., Rigó D., Melegh B., Martella V., Bányai K. **Monitoring of group A rotaviruses in wild-living birds in Hungary** Avian Diseases 55:(1) pp. 123-127. (2011)

IF: 1,46

Bányai K., Papp H., Dandár E., Molnár P., Mihály I., Van Ranst M., Martella V., Matthijnssens J. **Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of a zoonotic human G8P[14] rotavirus strain** Infection, Genetics and Evolution 10: pp. 1140-1144. (2010)

IF: 3,09