

Parciální sekvenace jako nový přístup sérotypizace adenovirů

Partial sequencing: a new approach to adenovirus serotyping

Helena Jiřincová

Souhrn

V sezóně 2013/14 byly dominujícím respiračním patogenem adenoviry (hAdV). Adenoviry jsou poměrně bohatá skupina virů obsahujících dle současné klasifikace 60 sérotypů. Většina z nich je spojována s mnoha různými mírnými onemocněními od respiračních, přes gastroenteritidy až po encefalitidy. Pouze některé sérotypy vyvolávají závažné infekce s tendencí k lokálním epidemiím.

Pro majoritní výskyt jsme přistoupili k charakterizaci hAdV v sentinelových materiálech. Namísto klasické sérotypizace byla použita metoda parciálního sekvenování úseku hexonového genu o velikosti cca 800 párů bazí. Na základě BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analýzy bylo provedeno systematické zařazení u celkem 27 materiálů z celkového počtu 52 vzorků. V rámci klasifikace bylo nalezeno pouze 5 sérotypů (3B, 2C, 1C, 7B, 4E). Naprosto převažujícím sérotypem byl hAdV 3B, který byl prokázán v 63 % sekvenovaných materiálů. V souvislosti s adenovirovým onemocněním udávali téměř všichni nemocní rýmu, horečku s teplotou nad 38 °C a kašel. Zhruba polovina nemocných trpěla bolestí hlavy a malátností. Nebyly prokázány žádné sérotypy dávané do souvislosti se závažným onemocněním, což odpovídá vybrané kohortě pacientů. Nejméně u poloviny materiálů byl sérotyp určen přímo z klinického materiálu bez předchozí izolace.

Lze tedy shrnout, že sérotypizace/genotypizace provedená na základě parciálního sekvenování hexonového genu s použitím „nested“ (vnořených) primerů nevyžaduje izolaci viru na tkáňové kultuře. Metoda je dostupná a efektivní při charakterizaci adenovirů.

In the season 2013/14, the predominant respiratory pathogen was adenovirus (hAdV). Adenoviruses are a relatively large family of DNA viruses consisting of 60 serotypes classified into seven groups. Most of them are associated with many various mild diseases from respiratory infections through gastroenteritis to encephalitis. Some serotypes only cause severe infection with a tendency towards local outbreaks.

We have implemented the classification of hAdV in sentinel samples. Instead of conventional serotyping, partial sequencing of the approximately 800 pb segments of the hexon gene was used. Based on the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) analysis, 27 of 52 samples were fitted into the current classification system. Only five serotypes were found (3B, 2C, 1C, 7B, 4E). The clearly prevailing hAdV serotype was 3B, detected in 63 % of the samples sequenced. Nearly all patients with adenovirus infection reported runny nose, temperature above 38°C, and cough. About half of the patients complained of headache and malaise. No severe disease-associated serotype was detected, as expected given the selected cohort of patients. In at least half of the samples, the serotype was determined without the need for virus isolation on cell culture.

It can be concluded that serotyping based on partial hexon gene sequencing in combination with nested PCR does not require virus isolation on tissue culture. The method is time saving and effective in the characterization of adenoviruses.

Zprávy CEM (SZÚ, Praha) 2014; 23(8): 291–294.

Klíčová slova: adenoviry, respirační onemocnění, genotypizace, sérotypizace

Keywords: adenoviruses, respiratory tract infections, sequencing

Úvod

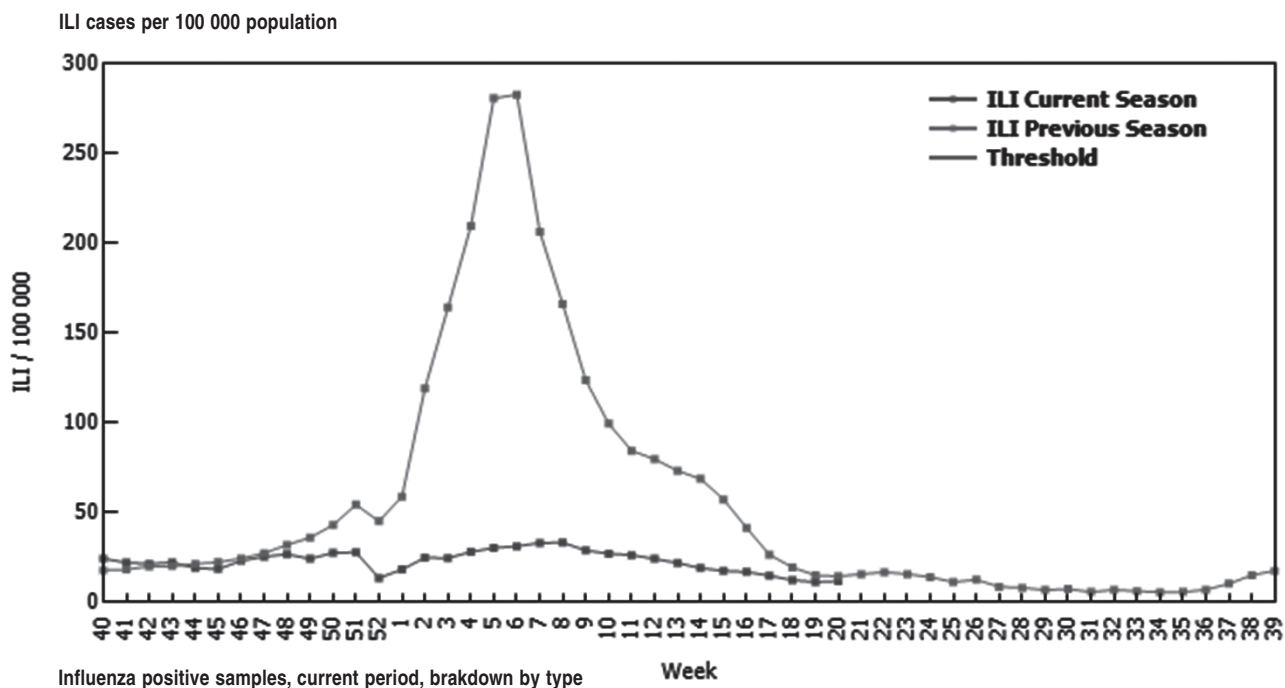
Zimní sezóna 2013/14 byla zcela netypická nejen neobvykle vysokými teplotami, nedostatkem sněhu, ale i praktickou absencí chřipky a ILI epizod. Rozdíl v počtu záchytů a izolací virů chřipky je v porovnání s loňskou sezónou více než markantní jak vyplývá z grafu 1. Mimořádně nízká nemocnost v důsledku infekce viry chřipky nebyla doposud v české republice zaznamenána, a to od roku 1956, a tuto situaci kopíroval i mimořádně nízký záchyt virů chřip-

ky typu A i B v populaci. Ve všech vyšetřených sentinelových materiálech byly viry chřipky detekovány pouze v 5 % materiálů. Dominujícím respiračním patogenem byly adenoviry.

V současnosti je známo více než 60 hAdV typů zařazených do 7 skupin (A–G). Adenoviry mají genom obsahující lineární dvouvláknovou DNA o velikosti 34–36 kb, přičemž homologní rekombinace hraje významnou roli v genetické diverzifikaci těchto virů [1]. Adenoviry vyvolávají celé spektrum onemocnění viz tabulka 1 [5].

Vyvolatelé respiračních onemocnění jsou nejčastěji zastoupeny ve skupinách B, C nebo E, a to především jako původci lehkých až inaparentních onemocnění. Přesto jsou známy případy závažných až fatálních onemocnění s charakterem lokální epidemie, které jsou obvykle způsobeny pouze omezeným spektrem sérotypů (7, 34, 4 a 21).

Graf 1: POROVNÁNÍ ILI NEMOCNOSTI SEZÓNĚ 2012/813 A 2013/14

Zdroj TESSY: <https://tessy.ecdc.europa.eu/TessyWeb>

Tabulka 1: KLASIFIKACE ADENOVIRŮ

Skupina	sérotyp	typické klinické projevy
A	12, 18, 31	střevní infekce
B	3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50, 55	respirační onemocnění, konjunktivitida, hemoragická cystitida, nervové infekce
C	1, 2, 5, 6, 57	respirační infekce
D	8, 9, 10, 13, 15, 17, 19, 20, 22-30, 32, 33, 36-39, 42-49, 51, 53, 54, 56	keratokonjunktivitida u imunokompromitovaných pacientů
E	4	konjunktivitida, respirační infekce
F	40, 41	průjemová onemocnění u dětí
G	52	gastroenteritida

Doposud byl zlatým standardem pro sérotypizaci virus-neutralizační test (VNT), tato metoda je poměrně pracná, dlouhotrvající vzhledem k nutnosti izolace viru na buněčné kultuře. Rovněž nejsou vždy dostupná dostatečně specifická antiséra či monoklonální protilátky, které nereagují křížově s více sérotypy, a proto dochází, především v rámci některých sérotypů, k nespecifickým reakcím [2]. Rozšíření a čím dál tím větší dostupnost molekulárně biologických technik jako např. PCR a sekvenace je výhodou pro diagnostiku a charakterizaci virových patogenů. V současnosti je typizace umožněna na základě identifikace hypervariabilní oblasti v genu pro hlavní kapsidový protein. Tato hypervariabilní oblast (HRV) obsahuje 7 oblastí, z nichž 6 se nachází na smyčce jedna (L1) a jedna v úseku smyčky 2 (L2). Tyto HRV oblasti jsou typicky konzervativní pro daný sérotyp/genotyp, a umožňují tak systematické zařazení daného AdV [3]. V případě molekulárních

metod je přesnějším vyjádřením genotypizace, namísto původně užívaného termínu sérotypizace.

Vzhledem k tomu, že byla vyvinuta vakcína proti sérotypům 4 a 7 ze skupiny A, která se uplatňuje v prevenci onemocnění u rekrutovaných vojáků v některých zemích světa (4-18), a rovněž jsou k dispozici antivirotika, která však *in vitro* vykazují pouze typovou specifitu (4-28) nabývá genotypizace významu nejen v rámci charakterizace patogenního agens, ale v rámci léčebného přístupu.

Materiál a metodika

Surveillance ARI je primárně zaměřena na sledování výskytu virů chřipky typu A/B a subtypů (H1, H3 či variant Yamagata/Viktorina). NRL pro chřipku sledovala v rámci pravidelné surveillance v období od 40. kalendářního týdne (KT) 2013 do 21. KT 2014 kromě virů chřipky rovněž přítomnost dalších respiračních agens: respiračního syncytiálního viru (hRSV), lidských metapneumovirů (hMPV), lidských koronaviřů (hCoV), bokaviřů (hBoV), virů parainfluenzy, (PIV) a adenovirů (hAdV). Základním materiálem pro vyšetření byl stěr z nosohltanu (NSP) ambulantních nemocných. Materiál byl zajištěn od nemocných dospělých i dětí, kteří v sezóně 2013/14 navštívili praktického lékaře s ILI/ARI projevy. Veškeré materiály byly vyšetřeny na přítomnost chřipky viru A/B a v případě negativního výsledku (95 % materiálů) byly vyšetřovány na další respirační viry a to komerční soupravou ARGENE® Range. Průkaz nechřipkových virů byl prováděn skupinově specifickou PCR v reálném čase (qPCR).

hAdV pozitivní materiály byly vybrány pro klasifikaci a genotypizaci (sérotypizaci). Použili jsme dvě dvojice nested primerů z oblasti hexonového genu (nt 19135–nt – 20030) [4]. Amplikony byly analyzovány na 1% agaróзовém gelu a produkty o velikosti 820nt (895nt) byly sekvenovány v obou směrech s použitím vnitřních amplifikačních

primerů na přístroji GA 3500 (Life technologies). Editace a kvalitativní analýza sekvencí byla provedena pomocí programu Sequencing Analysis software (Life technologies). Získané sekvence byly porovnány s databází sekvencí GenBank pomocí algoritmu BLAST.

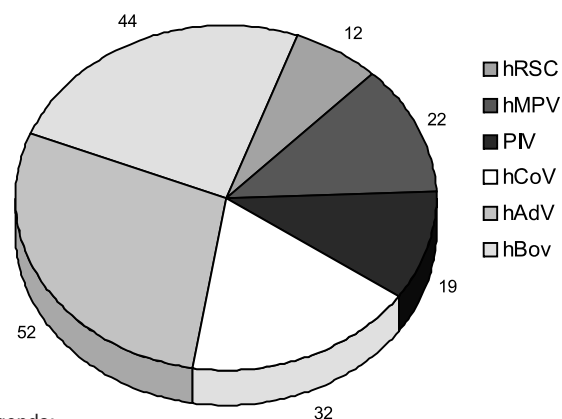
Výsledky

Celkem bylo vyšetřeno 434 vzorků, které byly chřipka A/B negativní, přičemž ve 45,5 % byl zachycen nejméně jeden z výše uvedených patogenů. V 52 vzorcích byl zjištěn adenovirus (13 %). Virus chřipky A/B byl detekován pouze u necelých 5 % sentinelových materiálů (viz graf 2).

Z 52 vzorků jsme pomocí PCR získali u 29 vzorků amplicon o velikosti očekávaných 895 (vnější pár primerů), či 820 nt (vnitřní pár primerů), 27 vzorků se podařilo na základě získané sekvence pomocí BLAST analýzy přiřadit k některému z adenovirových sérotypů (tabulka 2, graf 3)

V rámci 27 vyšetření bylo nalezeno pouze 5 sérotypů (3B, 2C, 1C, 7B, 4E). Celkem 17 izolátů (tedy 63 % ze

Graf 2: ZASTOUPENÍ SLEDOVANÝCH RESPIRAČNÍCH VIRŮ V SENTINELU V SEZÓNĚ 2013/14
Celkem 181 pozitivních záchytů

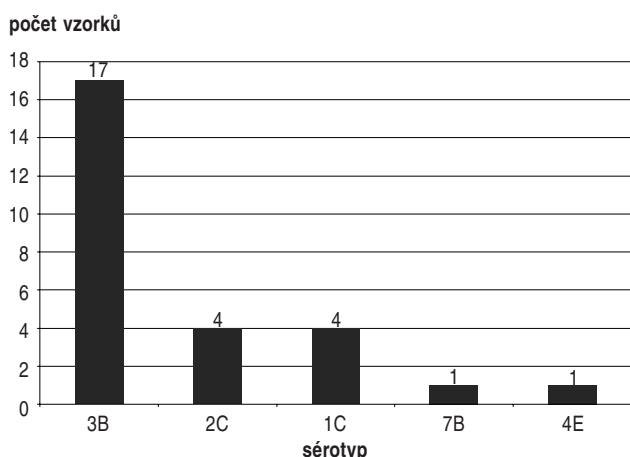


Legenda:

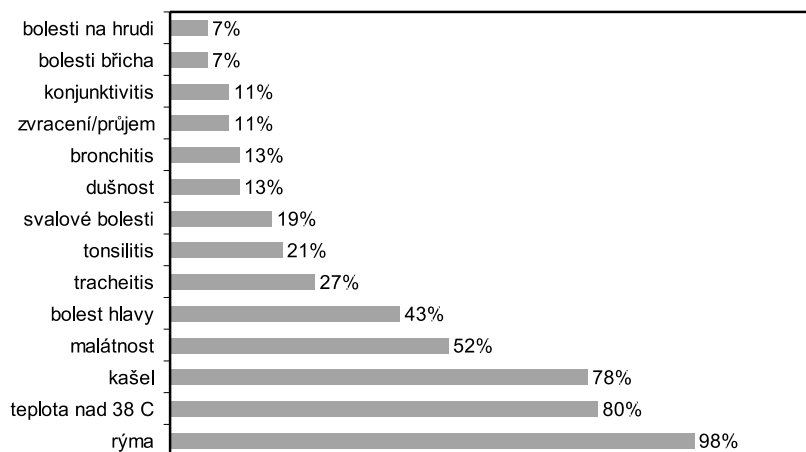
hRSV – respiračního syncytiální virus; hMPV – lidský metapneumovirus; hCoV – lidský koronavirus; hBoV – bokaviry; PIV – viry parainfluenzy; hAdV – adenoviry.

Tabulka 2: VÝSLEDKY BLAST (BASIC LOCAL ALIGNMENT SEARCH TOOL) ANALÝZY ADENOVIRŮ

Číslo příjmu	Výsledek	Seq	BLAST						
			Genbank acc. no.	Total score	Query coverage	E value	Identities	Gaps	Average seq coverage
67/14	HAdV 1 (C)	782	FJ943635.1	1445	100%	0.0	782/782 (100%)	0/782 2	2
74/14	HadV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
120/14	HAdV 4 (E)	716	AY599837.1	1323	100%	0.0	716/716 (100%)	0/716 2	2
122/14	HAdV 2 (C)	803	AY224392.1	1483	100%	0.0	803/803 (100%)	0/803 2	2
128/14	HadV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
234/14	HAdV 2 (C)	803	KC585031.1	1483	100%	0.0	803/803 (100%)	0/803 2	2
363/14	HadV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
55/14	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
338/14	HAdV 1 (C)	479	JX173086.1	885	100%	0.0	479/479 (100%)	0/479 1	1
4164/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4178/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4183/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4262/13	HAdV 3 (B)	746	KC570906.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4300/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4389/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4390/13	HAdV3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4408/13	HAdV3 (B)	633	FR849554.1	1166	100%	0.0	633/633 (100%)	0/633 2	2
4421/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
351/14	HAdV 2 (C)	803	KC585031.1	1478	100%	0.0	803/803 (100%)	0/803 2	2
369/14	HAdV 3 (B)	788	EF494643.1	1458	99%	0.0	785/787 (99%)	0/787 2	2
41/14	HAdV 3 (B)	746	EF494643.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4263/13	HAdV 3 (B)	746	FR849554.1	1378	100%	0.0	746/746 (100%)	0/746 2	2
4221/13	HAdV 1 (C)	803	KC570885.1	1480	100%	0.0	802/803 (99%)	0/803 2	2
386/14	HAdV 2 (C)	709	KC585031.1	1304	99%	0.0	706/706 (100%)	0/706 1	1
4273/16	HAdV 1 (C)	803	JX173078.1	1480	100%	0.0	801/803 (99%)	0/802 2	2
114/14	HAdV 7 (B)	644	KC570908.1	1190	100%	0.0	644/644 (100%)	0/644 1	1
4409/14	HAdV 3 (B)	321	FR849554.1	593	100%	3e-166	321/321 (100%)	0/321 1	1

Graf 3: ZASTOUPENÍ SÉROTYPŮ ADENOVIRŮ V ČESKÉ REPUBLICE V SEZONĚ 2013/14

sekvenovaných vzorků a 33 % ze všech vzorků) bylo zařazeno do sérotypu 3 ze skupiny B. Ve skupině B jsme ještě zachytili v jednom materiálu sérotyp 7, další frekventovanou skupinou byla skupina C, kde byl nalezen sérotyp 1 (1 vzorek – 4 %) a 2 (4 vzorky – 15 %). Sérotyp 4 ze skupiny E byl zjištěn pouze v jednom případě (4 %). Pouze z části materiálů se podařilo izolovat virus na buněčné kultuře, nejméně v polovině případů byla parciální sekvence provedena přímo z klinického materiálu.

Graf 4: ČETNOST KLINICKÝCH PŘÍZNAKŮ V RÁMCI ADENOVIROVÉ INFEKCE U AMBULANTNÍCH PACIENTŮ

Při odběru klinického materiálu jsou zaznamenávány rovněž symptomy. V souvislosti s adenovirovým onemocněním udávali téměř všichni nemocní rýmu (98 %), horečku nad 38°C (80 %) a kašel (78 %). Zhruba 50 % nemocných trpělo bolestí hlavy a malátností. Přehled klinických příznaků v souvislosti s onemocněním adenovirovou infekcí je znázorněn v grafu 4.

Závěr

Adenoviry byly v sezóně 2013/14 dominujícím ARI patogenem a nejčastěji byl určen jako původce infekce sérotyp 3 ze skupiny B. Nebyly prokázány žádné sérotypy spojené se závažným onemocněním, což odpovídá vybrané kohortě pacientů. Nejméně u poloviny materiálů byl sérotyp určen bez izolace viru na buněčné kultuře. Lze tedy shrnout, že sérotypizace provedena na základě parciálního sekvenování hexonového genu s použitím nested primerů nevyžaduje izolaci viru na tkáňové kultuře, je časově dostupná a efektivní metoda při charakterizaci adenovirů.

LITERATURA

- 1) Robinson CM, Singh G, Lee JY, Dehghan S, Rajaiya J, Liu EB, Yousuf MA, Betensky RA, Jones MS, Dyer DW, Seto D, Chodosh J. Molecular evolution of human adenoviruses. *Sci Rep.* 2013;1812 (3), 1-7 | DOI: 10.1038/srep0181
- 2) Mahr JA, Gooding LR. Immune evasion by adenoviruses. *Immunol Rev.* 1999; 168: 121–130.
- 3) Biere B, Schweiger B. Human adenoviruses in respiratory infections: Sequencing the hexon hypervariable region reveals high sequence variability. *J Clin Virol.* 2010; 47: 366–371.
- 4) Lu X, Erdman DD. Molecular typing of human adenoviruses by PCR and sequencing of a partial region of the hexon gene. *Arch Virol* 2006; 151: 1587–1602.
- 5) Wang S L, Chi CY, Kuo HP, Tsai HP, Wang SM, Liu CC, Su IJ, Wang JR. High-Incidence of Human Adenoviral Co-Infections in Taiwan. *Plos One* 2013; 8(9): 1–8.

RNDr. Helena Jiřincová
NRL pro chřipku a nechřipkovou
virovou respirační onemocnění
SZÚ –CEM