

**UNIVERSITY OF PÉCS**

Doctoral School of Biology and Sportbiology

**Exploring the genetic diversity of mosquito-derived viruses in  
Central Europe with *in vitro* and molecular biological methods**

*PhD Thesis*

**Brigitta Zana**

Supervisor:

**Professor Ferenc Jakab**

**PhD**

**PÉCS, 2023**

## 1. Introduction

Pathogenic viruses are major causative agents of morbidity and mortality among animals and humans. The efficient transmission of viruses between susceptible hosts is the main driving force of these agents to persist in nature and to cause disease. Arthropod-borne viruses (arboviruses) are a group of viral pathogens that require hematophagous arthropods, mainly mosquitoes and ticks, to transmit viruses between vertebrates via blood feeding (Mueller and Cao-Lormeau, 2018). In arbovirus transmission, mosquitoes are counted as the most important vectors, although many are transmitted by ticks, phlebotomine sand flies, and other arthropods (Rückert and Ebel, 2018). Mosquito-borne diseases cause millions of infections annually. For example, dengue cases have risen 8-fold during the last two decades from 505,430 cases in 2000 to over 5,2 million in 2019 and 3,8 million in 2022 (WHO; ECDC, 2022).

Many factors collectively influence the spread of mosquito-derived arboviruses. The vector competence of a mosquito is a crucial factor in transmitting a given virus since different mosquito species vary in their blood-feeding behaviour and host preference. Furthermore, arboviruses must cross specific barriers within the mosquito host for successful transmission, and they require active virus replication in both the arthropod vector and the vertebrate host (Rückert and Ebel, 2018). Of the major barriers that viruses must cross, the first is the midgut infection barrier, which means viruses must successfully infect and replicate within the midgut epithelial cells (midgut infection barrier). After that, viruses must cross the basal lamina enclosing the midgut epithelium (midgut escape barrier). Before the viruses enter the next barrier (salivary gland infection barrier) and infect the salivary gland, they replicate in different mosquito tissues such as the fat body, haemocytes, nerve and muscle tissues. Upon salivary gland infection, mosquitoes can inoculate the virus into the host during a blood meal (salivary gland escape barrier) (Rückert and Ebel, 2018; Franz et al., 2015).

The increasing global trade and travel, urbanization, and climate change significantly contribute to the exchange of pathogens and susceptible vectors across continents (Conway et al., 2014; Rückert and Ebel, 2018). The latter factors allow the expansion of previously non-endemic viruses and provide novel opportunities for establishing new host-virus relationships. For example, the emergence of West Nile virus (WNV), Chikungunya virus (CHIKV), and Zika virus (ZIKV) in new territories during the last decades. Since WNV had been introduced into Europe by migratory birds from Sub-Saharan Africa in the 1900s, the virus emerged through human activity in the United States in 1999 and rapidly spread throughout the country and in the Americas via migratory birds (Gould et al., 2017; Rückert and Ebel, 2018). The maintenance

of WNV in nature is linked to an enzootic transmission cycle between *Culex* spp. and birds. In general, *Culex* spp. obtain their blood meal from birds; however, humans and horses can serve as incidental hosts, which makes *Culex* spp. efficient vectors to transmit WNV and other zoonotic arboviruses (Rückert and Ebel, 2018). The Chikungunya virus was originally endemic in Sub-Saharan Africa. In the middle 2000s, the virus spread globally from Africa into Asia, islands of the Indian Ocean, and temperate areas in Europe. The virus has now become endemic in the Americas (Rückert and Ebel, 2018; Mayer et al., 2017). In the case of CHIKV, *Aedes aegypti* mosquito species were counted as the primary vector. However, due to a mutation in the CHIKV genome, *Aedes albopictus* had become capable of successfully transmitting the virus, which largely contributed to the dispersion of the virus into urban regions where *Ae. aegypti* is not abundant. Furthermore, the domestic form of *Ae. aegypti* had been accidentally shipped across the Atlantic and/or Pacific Ocean (Gould et al., 2017; Mayer et al., 2017). Zika virus has emerged from Africa and has become a global pathogen through travel and the introduction of the infected mosquitoes into naïve places where the presence of competent vectors (*Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*) further facilitated the virus emergence (Mayer et al., 2017).

Unfortunately, there are any or just limited specific treatments and prophylaxis for diseases caused by arboviruses. The prevention of contact between the vector and host using repellents, pesticides, physical barriers, and traps against vector species is the most effective way to prohibit infection and arbovirus emergence (Rückert and Ebel, 2018; Conway et al., 2014).

## **2. Aims of the study**

- Understanding the genetic diversity of mosquito-derived viruses on the vector-pathogen interaction level. It can ultimately lead to novel solutions and a better understanding of arbovirus interactions and emergence worldwide.
- The main goal of this thesis is the establishment a European virus isolate collection with *in vitro* virus isolation experiments and describe this collection with the extensive evolutionary and genomic characterization of these mosquito-derived viruses.
- To evaluate a proof-of-concept study, where we combine traditional virological methods with modern genomic sequencing and establish a local virus isolate bank to aid future competence, interaction, and transmission studies.

## **Materials and methods**

### ***3.1 Sample origins***

Mosquitoes were collected with EVS CO<sub>2</sub> Mosquito Trap baited with dry ice and white light from mosquito breeding areas near Pécs and Debrecen in Hungary from May to September 2013. Large-scale mosquito surveillance was conducted in the Vojvodina province of Serbia in 2013 and 2014. Mosquitoes were trapped with CDC light traps baited with dry ice in multiple sampling events during the breeding season from May to September. Each specimen was determined by species according to their taxonomic keys (Becker et al., 2003). Samples were grouped by species, collection site and date and pools were created consisting of a maximum of 50 individuals per pool. All collected mosquitoes were transported to the laboratory on dry ice and kept frozen at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further processing.

Further WNV-positive samples and sample data were retrieved in a country-wide collaborative effort from multiple institutions. Human sample data was generously provided by the National Public Health Center, horse serologic data were obtained from the University of Veterinary Medicine Budapest, and animal-derived WNV sequences were provided by the University of Veterinary Medicine, the National Food Chain Safety Office, and PROPHYL Ltd. Mohács, Hungary. Passive surveillance regarding wild bird mortality cases was performed at the Veterinary Diagnostic Directorate of the National Food Chain Safety Office. Bird carcasses examined in the avian influenza monitoring scheme were also tested for flavivirus infection, as previously described (Weidinger et al., 2019). Pathology, histology, and polymerase chain reaction (PCR) were performed, and partial WNV sequences were obtained from positive cases.

### ***3.2 Nucleic acid preparation***

Mosquito samples were homogenized with Minilys® personal homogenizer (Bertin Corp., USA) by adding two pieces of 2,5-2,8 mm diameter glass beads (Kisker Biotech GmbH & CO., Germany) and 500  $\mu\text{l}$  EMEM (Lonza, Switzerland) to each tube and homogenized for 30 sec at maximum speed. After homogenization, samples were centrifuged at 15,000 g for 10 min. For nucleic acid extraction, 200  $\mu\text{l}$  of supernatants were used following the manufacturer's protocol of Geneaid Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid). The extracted nucleic acid was eluted in 50  $\mu\text{l}$  of nuclease-free water and stored at  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  until further laboratory processes.

Total RNA was extracted using the QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany) in the case of virus isolates, northern goshawk, and horse brain tissue samples.

### **3.3 *Polymerase Chain Reactions (PCRs)***

In general, mosquito pools, bird and horse samples were tested with a TaqMan real-time RT-PCR targeting the NS3 region of the WNV genome, using reagents of the OneStep RT-PCR Kit (Qiagen). After that, WNV-positive mosquito, northern goshawk, and horse samples were subjected to a nested reverse transcription-PCR (RT-PCR) system targeting the NS5 gene, as described in (Vázquez et al., 2012) and a reverse transcription-PCR (RT-PCR) system targeting the NS3 gene to amplify a longer genomic region regarding sequencing. To detect additional flaviviruses, mosquito pools were subjected to nested reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) using degenerated primers targeting the conserved NS5 gene of flaviviruses (Kuno et al., 1998; Scaramozzino et al., 2001). For the first round PCRs, OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) was used as suggested by the manufacturer, while the second round PCRs were done with GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Kit (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. To obtain the complete genome of WNV and USUV, long-range PCRs were conducted by Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) resulting four large fragments. In the case of USUV, large amplicons were subjected to nested PCRs using Phusion U Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific) resulting in overlapping fragments of the genome.

### **3.4 *Sanger sequencing***

Amplicons in the case of USUV and flaviviruses amplified by nested PCR system were purified with Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Geneaid Biotech, Taiwan). PCR products were subjected to bidirectional sequencing using the BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) on the ABI Prism 310 genetic analyzer platform (Applied Biosystems).

### **3.5 Next-Generation Sequencing**

#### **3.5.1 Ion Torrent PGM**

Long-range PCR amplicons, obtained in the case of WNV, were subjected to library preparation for Ion Torrent using the NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs, USA) with KAPA Adapter Kit (KAPA Biosystems, UK). The 200 bp sequencing protocol was performed on a 316 chip (Life Technologies, USA) using the Ion Torrent PGM (Life Technologies, USA) semiconductor sequencing equipment. Trimmed sequence reads were used for de novo assembly utilizing the MIRA (version 3.9.17) (Chevreux et al., 1999). Additional bioinformatic analyses and validation with remapping were performed using the CLC Genomics Workbench (version 6.5.1; <http://www.clcbio.com>) and the DNASTar (version 12; <http://www.dnastar.com>).

#### **3.5.2 Oxford Nanopore sequencing**

Mosquito virus isolates from in vitro virus propagation experiments were subjected to Oxford Nanopore sequencing. Nucleic acid was extracted from samples using the QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Samples were then subjected to the Sequence Independent Single Primer Amplification (SISPA) approach (Song et al., 2017). Amplified cDNA was purified by NucleoSpin® Gel and a PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), and quantified using a Qubit dsDNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific). Libraries were prepared using the PCR Barcoding Kit (SQK-PBK004) and protocol by Oxford Nanopore Technologies. R9.4.1 flow cell and MinKNOW v4.5 software were used for sequencing. Base-calling of raw data was done by guppy (ONT guppy v4.4.2.) high accuracy base-calling algorithm (dna\_r9.4.1\_450bps\_hac config file). Demultiplexing and trimming of barcodes were performed with guppy as well, using default parameters of the 'guppy\_barcode' runcode. For long-read metagenomic classification, Centrifuge (Kim et al., 2016) and Kraken 2 (Wood and Salzberg, 2014) metagenomic classification algorithms were applied using the full NCBI NR (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/viral/>) (Accessed on 08.11.2021). Further sequence manipulations were done by Geneious Prime program. Mapping of data packages of each sample to reference sequences was run by using the Minimap2 plugin (Li, 2018) within the Geneious Prime 2022.2.2 (<https://www.geneious.com>) program. Based on metagenomic results, we selected the most fitted reference sequence for

polishing and to create a consensus sequence with the medaka tool. The generated consensus sequences from medaka analyses and from mapping by the Minimap2 were aligned using the MAFFT plugin (Katoh, 2013), and the base-calling errors were manually corrected in Geneious Prime 2022.2.2.

### **3.6 *Phylogenetic analyses***

Basic sequence manipulation and verification were performed using GeneDoc version 2.7 software (Nicholas et al., 1997). Nucleotide sequences were aligned by ClustalX version 2.0 software (Larkin et al., 2007) and MUSCLE Multiple Sequence Alignment online tool (Edgar, 2004), respectively. Phylogenetic trees were constructed with MEGA version 7.0 software (Kumar et al., 2016).

Model selection in reference to accurate phylogenetic analysis was performed using the PhyML 3.0 online tool Substitution model selection section. Phylogenetic tree reconstruction was implemented using the PhyML 3.0 online tool, with the TN93+G+I substitution model performing nonparametric bootstrap analysis with 1000 replicates (Guindon et al., 2010). Trees were edited using the iTol online tool (Letunic and Bork, 2019).

Bayesian coalescent analyses and time-calibrated phylogeny were used to reconstruct the evolutionary dynamics of WNV. The phylogenetic tree was calibrated by attributing the sampling dates to the tips of the tree and using an uncorrelated relaxed clock with the lognormal distribution. Subsequently, the analyses were performed using Beast v. 1.10 software with TN93+F+G4 substitution model. The Markov chain Monte Carlo (MCMC) analysis was run for 30 million generations and sampled every 30,000 steps. The convergence assessment based on the Effective Sample Size (ESS > 200) was performed in Tracer v1.6.0. Tree Annotator program was used to summarize the trees in a maximum clade credibility (MCC) tree with a 10% burn-in. The resultant tree was visualized in FigTree v1.4.4 program.

### **3.7 *In vitro virus propagation***

C6/36 (*Aedes albopictus*) cells (ATCC® CRL-1660™) were maintained in EMEM (Lonza, Switzerland) supplemented with 10 % Fetal Bovine Serum (Biosera, France) and 1 % Penicillin-Streptomycin (Lonza, Switzerland) at 28 °C until 70 % confluency in a 24-well plate. Before inoculation, 200 µl of supernatant from each mosquito homogenate was treated with an antibiotic cocktail at 37 °C for 1 h containing 1 µl Ampicillin ((stock cc. 100 mg/ml) Duchefa

Biochemie, The Netherlands) 1 µl Gentamicin ((stock cc. 50 mg/ml Lonza, Switzerland)) and 5 µl Penicillin-Streptomycin ((stock cc. 10.000 U/ml Lonza, Switzerland)). After spent media was discarded from C6/36 cell monolayers, cells were incubated with the treated supernatants from mosquito homogenates for 1 h at 37 °C. Thereafter, cells were supplemented with 1 ml of extra fresh medium and were monitored for cytopathogenic effect for 7 days post-infection. After 7 days, cells were frozen at -80 °C and thawed to lyse the cells, and 200 µl of the inoculum was used for each of three additional passages from the previous plates.

### **3. Summary**

During this doctoral thesis work, we identified the NS3249P substitution in Serbian mosquito samples for the first time. Our results could serve as an explanation for the increased number of WNND cases in the country in 2012-2013. Furthermore, phylogenetic analyses of complete coding and partial NS3 regions revealed close relationships with different European strains suggesting multiple introduction events into the country.

Based on our sequence and phylogenetic data, the situation of 2018 was more likely caused by endemic strains rather than recently introduced novel WNV strains. Therefore, we hypothesize that the main trigger factors behind the outstanding case numbers during 2018 were likely the result of favourable environmental conditions for mosquito vectors and the increased contact of these mosquitoes with native animal and human populations.

The results of USUV surveillance represent the first evidence for the geographic expansion of European lineage 1 to southern territories in the Balkanian peninsula and provide the first genetic data of USUV in the region.

In case of *Anopheles flavivirus*, we described a potential novel member within the group of ISFVs. However, the relatively short fragment analysed in this work is not sufficient to make long-term or even final conclusions therefore, further experiments and field screening of *An. hyrcanus* are needed to clarify the presence and exact position of this tentatively novel member within the *Flavivirus* genus.

It is also important to emphasize the limitations of our studies. Many viruses could not be isolated by in vitro methods, so comprehensive functional and genomic studies could not be performed with them. Furthermore, Hungary lacks a comprehensive and multi-level surveillance system that would enable complex investigations and draw reliable conclusions, creating an adequate basis for preparing for future epidemic periods.



Furthermore, we demonstrated the possibility of establishing local mosquito-derived virus collections to facilitate future co-infection and interference studies. Our results provide pillars for more detailed genetic and evolutionary analyses of our insect-specific virus isolates to support further evolutionary, vector competence, vaccine-, and diagnostic platform developments in the future. Regarding the complexity of mosquito-virus interactome, such works will represent the first step for applied arbovirus surveillance studies.

## References

- Becker, Norbert, et al. *Mosquitoes and their control*. Springer Science & Business Media, 2010.
- Bolling, Bethany G., et al. "Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community." *Viruses* 7.9 (2015): 4911-4928.
- Conway, Michael J., Tonya M. Colpitts, and Erol Fikrig. "Role of the vector in arbovirus transmission." *Annual Review of Virology* 1.1 (2014): 71.
- Franz, Alexander WE, et al. "Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes." *Viruses* 7.7 (2015): 3741-3767.
- Gould, Ernest, et al. "Emerging arboviruses: why today?." *One health* 4 (2017): 1-13.
- Guindon, Stéphane, et al. "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." *Systematic biology* 59.3 (2010): 307-321.
- Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability." *Molecular biology and evolution* 30.4 (2013): 772-780.
- Kim, Daehwan, et al. "Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences." *Genome research* 26.12 (2016): 1721-1729.
- Kuno, Goro. "Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses." *Journal of virological methods* 72.1 (1998): 27-41.
- Larkin, Mark A., et al. "Clustal W and Clustal X version 2.0." *bioinformatics* 23.21 (2007): 2947-2948.
- Letunic, Ivica, and Peer Bork. "Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments." *Nucleic acids research* 47.W1 (2019): W256-W259.
- Li, Heng. "Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences." *Bioinformatics* 34.18 (2018): 3094-3100.

- Mayer, Sandra V., Robert B. Tesh, and Nikos Vasilakis. "The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers." *Acta tropica* 166 (2017): 155-163.
- Mueller, Christopher G., and Van-Mai Cao-Lormeau. "Insect-borne viruses and host skin interface." *Skin and Arthropod Vectors*. Academic Press, 2018. 275-292.
- Nicholas, Karl B. "GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation." *Embnew. news* 4 (1997): 14.
- Rückert, Claudia, and Gregory D. Ebel. "How do virus–mosquito interactions lead to viral emergence?." *Trends in parasitology* 34.4 (2018): 310-321.
- Scaramozzino, Natale, et al. "Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences." *Journal of Clinical microbiology* 39.5 (2001): 1922-1927.
- Song, Dong Hyun, et al. "Sequence-Independent, Single-Primer Amplification Next-Generation Sequencing of Hantaan Virus Cell Culture–Based Isolates." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96.2 (2017): 389.
- Vázquez, Ana, et al. "Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12.3 (2012): 223-229.
- Weidinger, Pia, et al. "Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018." *Transboundary and emerging diseases* 67.1 (2020): 298-307.
- Wood, Derrick E., and Steven L. Salzberg. "Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments." *Genome biology* 15.3 (2014): 1-12.

### **Publications beyond thesis topic:**

- Zana, Brigitta, et al. "Multi-approach investigation regarding the West Nile virus situation in Hungary, 2018." *Viruses* 12.1 (2020): 123.
- Kemenesi, Gábor, et al. "First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014." *Infection, Genetics and Evolution* 63 (2018): 58-61.
- Zana, Brigitta, et al. "Genomic characterization of West Nile virus strains derived from mosquito samples obtained during 2013 Serbian outbreak." *Journal of Vector Borne Diseases* 53.4 (2016): 379.
- Zana, B., et al. "Molecular traces of a putative novel insect flavivirus from *Anopheles hyrcanus* mosquito species in Hungary." *Acta virologica* 61.1 (2017): 127-129.

**Oral and poster presentations beyond thesis topic:**

Zana B., et al. "First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014." 5<sup>th</sup> International Congress on INFECTIOUS DISEASES; Berlin, Germany, March 01-02, 2018 (poster)

Zana B., et al. "In vitro Survey Of Mosquito-related Viruses On C6/36 *Aedes albopictus* Cell Line." International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2018), November 9-12., 2018, Bécs, Ausztria (poster)

**PÉCSI TUDOMÁNYEGYETEM**

Biológiai és Sportbiológiai Doktori Iskola

**Szúnyog által terjesztett vírusok genetikai diverzitásának  
vizsgálata in vitro és molekuláris biológiai módszerekkel a közép-  
európai régióban**

*PhD értekezés*

**Zana Brigitta**

Témavezető:

**Professzor Jakab Ferenc**

**PhD**

**PÉCS, 2023**

## 1. Bevezetés

A patogén vírusok az emberi és állati megbetegedések, valamint halálozások egyik fő okozói. A vírusoknak a természetben való fennmaradásához és kóroki szerepük betöltéséhez a gazdaszervezetek közötti hatékony átvitelre van szükségük. Az ízeltlábúak által terjesztett vírusok (arbovírusok) a vírusos kórokozók egy olyan csoportja, amelyeknek hematofág ízeltlábúak, főként szúnyogok és kullancsok közreműködésére van szükségük, hogy a vírusokat gerinces gazdaszervezetek között továbbítani tudják (Mueller és Cao-Lormeau, 2018). Az arbovírusok tekintetében a szúnyogok számítanak a legfontosabb vektoroknak, bár sokukat kullancsok, lepkeszúnyogok és más ízeltlábúak is terjesztik (Rückert és Ebel, 2018).

Számos tényező együttesen befolyásolja a szúnyog eredetű arbovírusok terjedését. A szúnyog vektorkompetenciája kulcsfontosságú tényező egy adott vírus átvitelében, mivel a különböző szúnyogfajok eltérőek a vérral való táplálkozásuk, valamint a gazdapreferenciájuk terén. Ezenkívül az arbovírusoknak specifikus barrieréken kell átjutniuk a szúnyog szervezetén belül a sikeres átvitelhez, továbbá aktív vírusreplikáció is szükséges mind az ízeltlábú vektorban, mind a gerinces gazdaszervezetben (Rückert és Ebel, 2018). A vírusoknak elsősorban sikeresen meg kell fertőzniük és replikálódniuk kell a bélközéphámsejtekben. Ezt követően a vírusoknak át kell jutniuk a bélközéphámot körülvevő bazális laminán. Mielőtt a vírusok belépnének a következő barrier területére és megfertőznék a nyálmirigyet, különböző szúnyogszövetekben, például zsírtestben, hemocitákban, ideg- és izomszövetekben szaporodnak. Nyálmirigy-fertőzés esetén képesek a szúnyogok a vírust a gazdaszervezetbe juttatni táplálkozás során (Rückert és Ebel, 2018; Franz et al., 2015).

A növekvő globális kereskedelem és utazás, az urbanizáció és a klímaváltozás jelentősen hozzájárul a kórokozók és vektoraik kontinensek közötti cseréjéhez (Conway et al., 2014; Rückert és Ebel, 2018). Ez utóbbi tényezők lehetővé teszik a korábban nem endemikus vírusok terjedését, és új lehetőségeket kínálnak új gazda-vírus kapcsolatok kialakítására. Például a nyugat-nílusi vírus (WNV), a Chikungunya vírus (CHIKV) és a Zika vírus (ZIKV) megjelenése új területeken az elmúlt évtizedekben. Mután a WNV-t az 1900-as években a szubszaharai Afrikából vándorló madarak juttatták be Európába, a vírus 1999-ben emberi tevékenység révén jelent meg az Egyesült Államokban, és a vándormadarak révén gyorsan elterjedt az egész országban és Amerikában (Gould et al., 2017; Rückert és Ebel, 2018). A WNV természetben való fenntartása egy enzootikus átviteli ciklushoz kapcsolódik a *Culex* nemzetségbe tartozó szúnyogfajok és madarak között. A folyamatban az emberek és a lovak járulékos/végleges gazdaként szolgálhatnak és fertőződhetnek meg (Rückert és Ebel, 2018). A

Chikungunya vírus eredetileg a szubszaharai Afrika endemikus vírusa. A 2000-es évek közepén a vírus világszerte elterjedt Ázsián keresztül, az Indiai-óceán szigeteire és Európa mérsékelt égövi területeire. A vírus mára endémiássá vált Amerikában (Rückert és Ebel, 2018; Mayer et al., 2017). A CHIKV esetében az *Aedes aegypti* szúnyogfajok számítanak elsődleges vektornak. A CHIKV genomjában bekövetkezett mutáció miatt azonban az *Aedes albopictus* képessé vált a vírus sikeres átvitelére, ami nagymértékben hozzájárult a vírus olyan városi régiókban való elterjedéséhez, ahol az *Ae. aegypti* nem vagy kis egyedszámban fordul elő. (Gould et al., 2017; Mayer et al., 2017). A Zika vírust Afrikában írták le először, és globális kórokozóvá vált az utazás és a fertőzött szúnyogok naiv helyekre való behurcolása révén, ahol a kompetens vektorok (*Ae. albopictus* és *Ae. aegypti*) jelenléte elősegítette a vírus megtelepedését és elterjedését (Mayer et al., 2017).

Sajnos az arbovírusok által okozott betegségekre nincs, vagy csak korlátozott specifikus kezelés és profilaxis áll rendelkezésre. A fertőzés és az arbovírus megjelenésének megakadályozásának leghatékonyabb módja a vektor és a gazdaszervezet közötti érintkezés megelőzése riasztószerek, peszticidek, fizikai akadályok és vektor fajok elleni csapdák segítségével lehetséges (Rückert és Ebel, 2018; Conway et al., 2014).

## 2. Célkitűzések

- A szúnyog eredetű vírusok genetikai sokféleségének megértése a vektor-kórokozó kölcsönhatás szintjén, amely végső soron új megoldásokhoz, valamint az arbovírusok kölcsönhatásainak és világszerte való megjelenésének jobb megértéséhez vezethet.
- A disszertáció fő célja egy európai vírusizolátum gyűjtemény létrehozása in vitro vírusizolációs kísérletekkel, valamint ezen szúnyogeredetű vírusok kiterjedt evolúciós és genomikai jellemzése.
- Egy proof-of-concept vizsgálat értékelése, ahol az általános virológiai módszereket kombináljuk a modern genomiális szekvenálással, és helyi vírusizolátumbankot hozunk létre a jövőbeni kompetencia, interakciós és átviteli vizsgálatok elősegítése érdekében.

### **3. Anyag és módszer**

#### **3.1 Mintagyűjtés**

A szúnyogok gyűjtése szárazjéggel és fehér fényel felszerelt EVS CO<sub>2</sub> szúnyogcsapdával történt Pécs és Debrecen melletti területekről 2013 májusától szeptemberig. Továbbá, Szerbia Vajdaság tartományában 2013-ban és 2014-ben nagyszabású szúnyogmonitorozást végeztek, amely során májustól szeptemberig tartó időszakban több mintavételezésre került sor szárazjéggel csalizott CDC fénycsapdák használatával. Az egyes példányok fajok szerint meghatározásra a taxonómiai kulcsaik szerint (Becker et al., 2003). A mintákat fajok, gyűjtési hely és dátum szerint csoportosítottuk, amely során maximum 50 egyedből álló csoportokat hoztunk létre. Az összes összegyűjtött szúnyogot szárazjégen szállítottuk a laboratóriumba, és -80 °C-on tároltuk a további feldolgozásig.

További WNV-pozitív mintákat és minta adatokat több intézmény országos együttműködésével dolgoztunk fel. A humán eredetű minta adatokat az Országos Népegészségügyi Központ biztosította, a lovakat illető szerológiai adatokat a Budapesti Állatorvostudományi Egyetemtől, az állati eredetű WNV-szekvenciákat pedig az Állatorvostudományi Egyetem, a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal és a PROPHYL. Kft. Mohács biztosította. A Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi Diagnosztikai Igazgatóságán a vadon élő madarak elhullásának eseteivel kapcsolatban passzív mintavételezést végeztek. A madárinfluenza-ellenőrzési rendszerben vizsgált madártetemeteket a korábban leírtak szerint flavivírus fertőzésre is tesztelték (Weidinger et al., 2019). Patológiai, szövettani és polimeráz láncreakciós (PCR) vizsgálatokat követően a pozitív esetekből részleges WNV szekvenciákat állítottak elő.

#### **3.2 Nukleinsav kivonás**

A szúnyogmintákat Minilys® homogenizátorral (Bertin Corp., USA) homogenizáltuk két darab 2,5-2,8 mm átmérőjű üvegyöngy (Kisker Biotech GmbH & CO., Németország) és 500 µl EMEM (Lonza, Svájc) hozzáadásával. Homogenizálás után a mintákat 15 000 g-vel centrifugáltuk 10 percig. A nukleinsav extrakcióhoz 200 µl felülúszót használtunk a Geneaid Viral Nucleic Acid Extraction Kit II (Geneaid) gyártói protokollja szerint. Az extrahált nukleinsavat 50 µl nukleázmentes vízben eluáltuk és -80 °C-on tároltuk a további laboratóriumi eljárásokig.

A teljes RNS-t a QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével extraháltuk vírusizolátumok, héja és ló agyszövetminták esetében.

### **3.3 Polimeráz láncreakciók**

A szúnyog eredetű, valamint madár- és lómintákat a WNV genom NS3 régióját célzó TaqMan valós idejű RT-PCR-rel teszteltük a OneStep RT-PCR Kit (Qiagen) reagenseivel. Ezt követően a WNV-pozitív szúnyog-, héja- és lómintákat nested reverz transzkripció-PCR (RT-PCR) rendszernek vetettük alá, amely az NS5 gént célozta meg (Vázquez et al., 2012) valamint az NS3 géntre specifikus reverz transzkripció-PCR rendszert is használtunk, hosszabb genomi régiók felamplifikálása és későbbi szekvenálása céljából. További flavivírusok kimutatására nested reverz transzkripció-PCR vizsgálatokat végeztünk, degenerált primerek alkalmazásával, amelyek a flavivírusok konzervált NS5 génjét célozták meg (Kuno et al., 1998; Scaramozzino et al., 2001). Az első körben végzett PCR-khez OneStep RT-PCR kitet (Qiagen) használtunk a gyártó javaslata szerint, míg a második körben a GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase Kit-tel (Promega, USA) dolgoztunk a gyártó utasításainak megfelelően. A WNV és az USUV teljes genomjának meghatározásához hosszú fragmentek felamplifikálására alkalmas PCR-eket végeztünk Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen) segítségével, amely négy nagy fragmentet eredményezett. Az USUV esetében a nagy ampliconokat nested PCR-knek vetettük alá a Phusion U Hot Start PCR Master Mix (Thermo Scientific) segítségével, ami a teljes genomot lefedő és egymást átfedő genom fragmentumokat eredményezett.

### **3.4 Sanger szekvenálás**

A nested PCR rendszerrel felamplifikált USUV és flavivírusok fragmentjeit Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit-tel (Geneaid Biotech, Tajvan) tisztítottuk. A PCR-termékeket kétirányú szekvenálásnak vetettük alá a BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével az ABI Prism 310 platform használatával (Applied Biosystems).

### **3.5 Következő generációs szekvenálás**

#### **3.5.1 Ion Torrent PGM platform**

A WNV esetében kapott hosszú ampliconokat könyvtár-készítésnek vetettük alá Ion Torrenten való szekvenálás céljából. Az előkészítés során a NEBNext® Fast DNA Fragmentation & Library Prep Set for Ion Torrent (New England Biolabs, USA) és KAPA Adapter Kit (KAPA Biosystems, Egyesült Királyság) reagenseket használtuk. A 200 bp-os szekvenálási protokollt 316 chipen (Life Technologies, USA) végeztük Ion Torrent PGM (Life



Technologies, USA) szekvenáló készülék segítségével. Az előzőekben trimmelt read-ek de novo összeszerelését MIRA (3.9.17-es verzió) program alkalmazásával végeztük (Chevreux et al., 1999). További bioinformatikai elemzéseket és újratérképezéssel történő validálást CLC Genomics Workbench (6.5.1-es verzió; <http://www.clcbio.com>) és a DNASTar (12-es verzió; <http://www.dnastar.com>) segítségével végeztük.

### **3.5.2. Oxford Nanopore szekvenálási platform**

Az in vitro vírus izolálási kísérletekből származó izolátumokat Oxford Nanopore szekvenálási rendszeren vizsgáltuk. A nukleinsavat a mintákból a QIAamp MinElute Virus Spin Kit (Qiagen, Hilden, Németország) segítségével extraháltuk. A mintákat ezután a Sequence Independent Single Primer Amplification (SISPA) reakciónak vetettük alá (Song et al., 2017). Az amplifikált cDNS-t NucleoSpin® Gel és PCR Clean-up kittel (Macherey-Nagel, Düren, Németország) tisztítottuk, és a nukleinsav koncentrációt Qubit dsDNA BR Assay kit (Thermo Fisher Scientific) segítségével határoztuk meg. A könyvtárakat a PCR Barcoding Kit (SQK-PBK004) és az Oxford Nanopore Technologies protokollja segítségével állítottuk elő. A szekvenáláshoz R9.4.1 flow cellt és MinKNOW v4.5 szoftvert használtunk. A nyers adatok base-calling lépése guppy (ONT guppy v4.4.2.) nagy pontosságú base-calling algoritmussal történt (dna\_r9.4.1\_450bps\_hac konfigurációs fájl). A barcode-ok demultiplexelése és vágása is megtörtént a guppy program segítségével a 'guppy\_barcode' futási kód alapértelmezett paramétereivel. A hosszú readek metagenomikai osztályozásához a Centrifuge (Kim et al., 2016) és a Kraken 2 (Wood és Salzberg, 2014) algoritmusokat alkalmaztuk a teljes NCBI NR segítségével (<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/refseq/release/viral/>) (Hozzáférés: 2021.11.08.). A további szekvencia-manipulációkat a Geneious Prime programmal végeztük. Az egyes minták adatsomagjainak referenciaszekvenciákhoz való hozzárendelését a Geneious Prime 2022.2.2 (<https://www.geneious.com>) programon belüli Minimap2 plugin (Li, 2018) segítségével futtattuk. A metagenomikai eredmények alapján kiválasztottuk a legmegfelelőbb referenciaszekvenciát a polishing lépéshöz majd a konszenzus szekvencia létrehozásához a medaka program segítségével. A medaka-elemzésekből és a Minimap2-vel végzett leképezésből generált konszenzusszekvenciákat a MAFFT bővítmény (Katoh, 2013) segítségével összefésültük, és az base-calling során felmerült szekvencia hibákat manuálisan korrigáltuk a Geneious Prime 2022.2.2-ben.

### **3.6 Filogenetikai analízisek**

Az alapvető szekvencia-manipulációt és -verifikációt a GeneDoc 2.7-es verziójú szoftverrel végeztük (Nicholas et al., 1997). A nukleotidszekvenciákat a ClustalX 2.0-s verziójú szoftverrel (Larkin et al., 2007), illetve a MUSCLE Multiple Sequence Alignment online eszközzel (Edgar, 2004) fésültük egymáshoz. A filogenetikai fákat MEGA 7.0-s verziójú szoftverrel állítottuk elő (Kumar et al., 2016).

A pontos filogenetikai analízisre hivatkozó modellválasztást a PhyML 3.0 online eszköz modell szelekció szekciójával végeztük. A filogenetikai fa a PhyML 3.0 online eszköz segítségével került előállításra a TN93+G+I szubsztitúciós modell nemparaméteres bootstrap elemzés lefutásával, amelyet 1000 ismétléssel végeztünk (Guindon et al., 2010). A filogenetikai fákat az iTol online eszközzel szerkesztettük (Letunic és Bork, 2019).

A WNV evolúciós dinamikájának rekonstruálásához Bayes-féle koaleszcencia-analízist és időkalibrált filogenetikai analízist hajtottunk végre. A filogenetikai fát úgy kalibráltuk, hogy a mintavételi dátumokat a fa csúcsaihoz rendeltük, és egy nem korrelált relaxált órát használtunk lognormális eloszlással. Ezt követően az elemzéseket Beast v. 1.10 szoftverrel, TN93+F+G4 szubsztitúciós modellel végeztük. A Markov-chain Monte Carlo (MCMC) elemzését 30 millió ismétléssel végeztük, a mintavételezés 30 000 lépésenként történt. Az effektív mintaméreten (ESS > 200) alapuló konvergenciaértékelés a Tracer v1.6.0-ban történt. A Tree Annotator programot használtuk a fák összegzésére egy maximális klád hitelességi (MCC) fában, 10%-os burnout értékkel. Az eredményül kapott fát a FigTree v1.4.4 programban vizualizáltuk.

### **3.7 In vitro izolációs kísérletek**

A C6/36 (*Aedes albopictus*) sejteket (ATCC® CRL-1660™) EMEM-ben (Lonza, Svájc) tartottuk fenn 10% Fetal Bovine Serum (Biosera, Franciaország) és 1% Penicillin-Streptomycin (Lonza, Svájc) hozzáadásával 28 °C-on. °C 70 %-os kunfluencia szintig egy 24 lyukú lemezen. Az inokuláció előtt minden szúnyog homogenizátumból 200 µl felülűszót 1 µl ampicillint ((stock cc. 100 mg/ml) Duchefa Biochemie, Hollandia) 1 µl Gentamicint ((stock. cc. 50 mg/ml) Lonza, Svájc)) és 5 µl Penicillin-Streptomycint ((készlet kb. 10 000 U/ml) Lonza, Svájc)) tartalmazó antibiotikus koktéllal kezeltünk 37 °C-on 1 órán át. Tápközelet eltávolítását követően a C6/36 sejtréteget a szúnyog homogenizátumok antibiotikummal kezelt felülűszójával inkubáltuk 1 órán át 28 °C-on. Ezt követően a sejteket 1 ml extra friss tápközeggel egészítettük ki, és a fertőzést követő 7 napon keresztül ellenőriztük a citopatogén

hatást. 7 nap elteltével a sejteket  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on lefagyasztottuk, és felolvasztottuk a sejtek líziséhez, és minden esetben  $200\text{ }\mu\text{l}$ -t használtunk fel további passzáláshoz az előző lemezekről.

#### 4. Összefoglaló

Szerbiában elsőként azonosítottuk az NS3 249 H/P mutációval rendelkező WNV törzset. Továbbá, bizonyítani tudtuk, az általunk leírt vírus törzs különböző területekről történő többszöri behurcolását az országba.

A haza retrospektív tanulmányt illetően elmondhatjuk, hogy a 2018-as év során megemelkedett esetszámokért elsősorban a kedvező időjárási tényezők, az ezáltal megnövekedett humán-szúnyog kontaktok száma, valamint két WNV törzs egyidejű cirkulációja a felelős.

Az USUV surveillance eredményeit illetően elmondhatjuk, hogy eredményeink elsőként engednek következtetni az európai 1-es genetikai variáns földrajzi terjeszkedésére a Balkán-félsziget déli területeit illetően, továbbá az USUV első genetikai információt szolgáltatják a régióban.

Az Anopheles flavivirus esetében feltehetően egy potenciális új tagot írtunk le az ISFV-k csoportjában. A jelen munkában elemzett viszonylag rövid töredék szekvencia azonban nem elegendő hosszú távú vagy akár végső következtetések levonásához, ezért további kísérletek és terepi gyűjtések szükségesek ahhoz, hogy tisztázzuk az általunk leírt vírus Flavivirus nemzetségen belül betöltött szerepét és helyzetét.

Fontos kiemelni vizsgálataink limitációit is. Számos vírust nem sikerült in vitro módszerekkel izolálni, így átfogó funkcionális és genomikai vizsgálatokat nem tudtunk velük végezni. Továbbá, mint kulcsfontosságú tényezőt, kiemelném a hazai átfogó és többszintű surveillance rendszer hiányát, amely lehetővé tenné a komplex vizsgálatokat és megbízható következtetéseket, amely megfelelő alapot teremtené a jövőbeli járványos időszakokra való felkészüléshez.

In vitro kísérletsorozat folyamán a gold standard PCR alapú szűrések mellett előtérbe kerültek az azonosított vírusok izolációs kísérletei karöltve a legújabb szekvenálási és metagenomikai módszerekkel. Eredményeinkkel képesek vagyunk átfogó funkcionális és genomikai vizsgálatok elvégzésére, amelyekkel megérthetjük a vírusok egymásra és a vektorra gyakorolt kölcsönhatását, valamint a vírusok átviteli mechanizmusát.

Továbbá bemutattuk annak lehetőségét, hogy helyi szúnyog-eredetű vírusgyűjteményt hozzunk létre, hogy megkönnyítsük a jövőbeli co-infekciós és interferencia vizsgálatok

elvégzését. Eredményeink alapot teremtenek rovarspecifikus vírusizolátumaink részletesebb genetikai és evolúciós elemzéséhez, hogy a jövőben hozzájárulhassanak vírus evolúciós vizsgálatokhoz, továbbá vektorkompetencia-, vakcina- és diagnosztikai platformfejlesztésekhez. A szúnyog-vírus interakció összetettségét tekintve az ilyen munkák jelentik az első lépést az alkalmazott és integrált arbovírus surveillance vizsgálatokhoz.

## **Irodalomjegyzék**

- Becker, Norbert, et al. Mosquitoes and their control. Springer Science & Business Media, 2010.
- Bolling, Bethany G., et al. "Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community." *Viruses* 7.9 (2015): 4911-4928.
- Conway, Michael J., Tonya M. Colpitts, and Erol Fikrig. "Role of the vector in arbovirus transmission." *Annual Review of Virology* 1.1 (2014): 71.
- Franz, Alexander WE, et al. "Tissue barriers to arbovirus infection in mosquitoes." *Viruses* 7.7 (2015): 3741-3767.
- Gould, Ernest, et al. "Emerging arboviruses: why today?." *One health* 4 (2017): 1-13.
- Guindon, Stéphane, et al. "New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0." *Systematic biology* 59.3 (2010): 307-321.
- Katoh, Kazutaka, and Daron M. Standley. "MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability." *Molecular biology and evolution* 30.4 (2013): 772-780.
- Kim, Daehwan, et al. "Centrifuge: rapid and sensitive classification of metagenomic sequences." *Genome research* 26.12 (2016): 1721-1729.
- Kuno, Goro. "Universal diagnostic RT-PCR protocol for arboviruses." *Journal of virological methods* 72.1 (1998): 27-41.
- Larkin, Mark A., et al. "Clustal W and Clustal X version 2.0." *bioinformatics* 23.21 (2007): 2947-2948.
- Letunic, Ivica, and Peer Bork. "Interactive Tree Of Life (iTOL) v4: recent updates and new developments." *Nucleic acids research* 47.W1 (2019): W256-W259.
- Li, Heng. "Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences." *Bioinformatics* 34.18 (2018): 3094-3100.

- Mayer, Sandra V., Robert B. Tesh, and Nikos Vasilakis. "The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers." *Acta tropica* 166 (2017): 155-163.
- Mueller, Christopher G., and Van-Mai Cao-Lormeau. "Insect-borne viruses and host skin interface." *Skin and Arthropod Vectors*. Academic Press, 2018. 275-292.
- Nicholas, Karl B. "GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation." *Embnew. news* 4 (1997): 14.
- Rückert, Claudia, and Gregory D. Ebel. "How do virus–mosquito interactions lead to viral emergence?." *Trends in parasitology* 34.4 (2018): 310-321.
- Scaramozzino, Natale, et al. "Comparison of flavivirus universal primer pairs and development of a rapid, highly sensitive heminested reverse transcription-PCR assay for detection of flaviviruses targeted to a conserved region of the NS5 gene sequences." *Journal of Clinical microbiology* 39.5 (2001): 1922-1927.
- Song, Dong Hyun, et al. "Sequence-Independent, Single-Primer Amplification Next-Generation Sequencing of Hantaan Virus Cell Culture–Based Isolates." *The American journal of tropical medicine and hygiene* 96.2 (2017): 389.
- Vázquez, Ana, et al. "Novel flaviviruses detected in different species of mosquitoes in Spain." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 12.3 (2012): 223-229.
- Weidinger, Pia, et al. "Different dynamics of Usutu virus infections in Austria and Hungary, 2017–2018." *Transboundary and emerging diseases* 67.1 (2020): 298-307.
- Wood, Derrick E., and Steven L. Salzberg. "Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments." *Genome biology* 15.3 (2014): 1-12.

### **Értekezés alapjául szolgáló közlemények:**

- Zana, Brigitta, et al. "Multi-approach investigation regarding the West Nile virus situation in Hungary, 2018." *Viruses* 12.1 (2020): 123.
- Kemenesi, Gábor, et al. "First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014." *Infection, Genetics and Evolution* 63 (2018): 58-61.
- Zana, Brigitta, et al. "Genomic characterization of West Nile virus strains derived from mosquito samples obtained during 2013 Serbian outbreak." *Journal of Vector Borne Diseases* 53.4 (2016): 379.
- Zana, B., et al. "Molecular traces of a putative novel insect flavivirus from *Anopheles hyrcanus* mosquito species in Hungary." *Acta virologica* 61.1 (2017): 127-129.

**Értekezés alapjául szolgáló konferencia szereplések:**

Zana B., et al. "First genetic characterization of Usutu virus from *Culex pipiens* mosquitoes Serbia, 2014." 5<sup>th</sup> International Congress on INFECTIOUS DISEASES; Berlin, Germany, March 01-02, 2018 (poster)

Zana B., et al. "In vitro Survey Of Mosquito-related Viruses On C6/36 *Aedes albopictus* Cell Line." International Meeting on Emerging Diseases and Surveillance (IMED 2018), November 9-12., 2018, Bécs, Ausztria (poster)