

Molekularne značajke i zoonotski potencijal rotavirusa

Ivana Šimić¹, Alen Kovačević¹, Nina Krešić¹, Ines Škoko², Vlatka Konjik³,
Jelena Jukić Guć⁴, Vjekoslav Krželj⁵, Goran Tešović^{6,7}, Dragan Brnić^{1*}

Rotavirusi su jedni od najvažnijih uzročnika akutnog gastroenteritisa kod ljudi i životinja, a između devet prepoznatih vrsta rotavirusa A se posebno ističe zbog velike proširenosti i patogenosti. I danas, uz visoki pobol i hospitalizaciju oboljele djece u zemljama s visokim higijenskim standardom, u zemljama u razvoju uzrokuju značajnu smrtnost. Takav je učinak posebno vidljiv kada dostupna cjepiva nisu dio nacionalnog imunizacijskog programa. Zbog prirode svoga genoma rotavirusi izrazito brzo evoluiraju, prvenstveno zahvaćujući učestaloj pojavi točkastih mutacija i genomskog preslagivanja. Stoga nije iznenađujuća visoka genetska heterogenost, pa tako danas poznajemo ukupno 36 genotipova G i 51 genotip P rotavirusa A. Kada izravno prijeđu vrsnu barijeru, rotavirusi uglavnom nisu sposobni učinkovito inficirati ili se širiti u novom domaćinu. No baš pojava genomskog preslagivanja omogućuje nastanak novih, potencijalno emergentnih humano-animálnih reasortanata. Stoga je potreban stalni nadzor životinjskih sojeva rotavirusa kako bi se dobila točna slika o životinjskim rezervoarima koji u budućnosti mogu biti odgovorni za unos novih rotavirusa u ljudsku populaciju ili rotavirusnih gena u genetsku osnovu humanih sojeva. Sustavno praćenje molekularnih značajki rotavirusa koji cirkuliraju u određenom području od posebne je važnosti prije uvođenja nacionalnog imunizacijskog programa, ali i dok je aktivna imunizacija u tijeku. Opsežnije istraživanje rotavirusa A u ekosustavu Republike Hrvatske je u tijeku, a omogućit će otkrivanje životinjskih rezervoara te pridonijeti boljem razumijevanju zoonotskog potencijala ovih virusa.

Ključne riječi: ROTAVIRUS; GENOTIP; ZOONOZE; HRVATSKA

UVOD

Rotavirusi (RV) pripadaju skupini dvolančanih RNA (dsRNA) virusa i jedna su od najvažnijih skupina enteričnih virusa uzročnika akutnog gastroenteritisa kod različitih vrsta sisavaca i ptica (1). Rotavirus A (RVA) smatra se najvažnijom vrstom zbog visoke prevalencije i patogenosti u ljudi i različitih vrsta životinja (2). Kod djece u dobi do pet godina rotavirusi su primarni uzročnik akutnog proljeva te se procjenjuje da uzrokuju gotovo 215 000 smrtnih slučajeva na godinu, većinom (više od 90%) u zemljama u razvoju (3). No rotavirusi uzrokuju znatan pobol i čestu hospitalizaciju oboljelih i u zemljama s visokim higijenskim standardima (4). Životinje, posebno one mlađih dobnih kategorija, također često oboljevaju zbog posljedica infekcije rotavirusima, posebice teklad i prasad (5), koja zajedno s kućnim ljubimcima (psima i mačkama) imaju ulogu rezervoara potencijalno zoonotskih sojeva RV-a (6).

¹ Hrvatski veterinarski institut, Odjel za virologiju, Savska cesta 143, 10000 Zagreb

² Hrvatski veterinarski institut, Veterinarski zavod Split, Poljička cesta 33, 21000 Split

³ Klinički bolnički centar Osijek, Klinika za pedijatriju, Odjel za dječju gastroenterologiju, hepatologiju, pulmologiju, alergologiju i imunologiju, Ulica Josipa Huttlera 4, 31000, Osijek

⁴ Klinički bolnički centar Split, Klinika za dječje bolesti, Spinčićeva 1, 21000 Split

⁵ Medicinski Fakultet, Sveučilište u Splitu, Šoltanska ulica 2, 21000 Split

⁶ Klinika za infektivne bolesti „Dr. Fran Mihaljević“, Zavod za infektivne bolesti djece, Mirogojska 8, 10000 Zagreb

⁷ Medicinski fakultet, Sveučilište u Zagrebu, Šalata 3, 10000 Zagreb

Zahvala

Istraživanje literature i priprema rada je ostvarena u okviru provedbe Uspostavnog istraživačkog projekta Hrvatske zaklade za znanost HRZZ-UIP-2017-05-8580 „Rotavirusi u ekosustavu Republike Hrvatske: molekularna epidemiologija i zoonotski potencijal“.

Adresa za dopisivanje:

dr. sc. Dragan Brnić, Hrvatski veterinarski institut, Odjel za virologiju, Savska cesta 143, 10000 Zagreb, e-mail: brnic@veinst.hr

Primljeno/Received: 26. 03. 2019., Prihvaćeno/Accepted: 29. 06. 2019.

Osim klasične kliničke slike, kojoj su glavne značajke vrućica, proljev i povraćanje, po čemu su rotavirusne infekcije i najpoznatije, sve je više dokaza da je riječ o sistemskoj bolesti zbog povezanosti infekcije rotavirusima i pojavnosti neuroloških simptoma te moguće uloge rotavirusa kao okidača pojedinih autoimunih bolesti (celijakija, dijabetes tip 1) (7). Štoviše, smatra se da je patogeni učinak rotavirusa podcijenjen s obzirom na to da su dokazane antigenemija i viremija i uz odsutnost proljeva (7).

Kako bi se djeca zaštitila od pojave teškog oblika akutnog gastroenteritisa, preporučuje se primjena jednog od dvaju živih atenuiranih oralnih cjepiva: monovalentnog Rotarix® (GlaxoSmithKline) i pentavalentnog RotaTeq® (Merck) (8). Osim izravne koristi za zdravlje, cijepljenje pridonosi i značajnom smanjenju hospitalizacija oboljele djece, što je vidljivo na primjeru zemalja koje su ova cjepiva uvele u svoje nacionalne imunizacijske programe (NIP) (9). Aktivna imunizacija protiv RVA u Hrvatskoj je uvedena 2011. godine, ali samo za rizičnu skupinu djece (10) te se smatra da je opća procijepljenost populacije i dalje niska (11).

Rotavirusi su iznimno kontagiozni, zrele virusne čestice nemaju ovojnici pa su rezistentne na otapala lipida, stabilne su pri širokom rasponu pH te se luče u golemim količinama u fecesu, što sve zajedno pridonosi povećanju transmisivnog potencijala (1). Ovisno o primijenjenom testu (ELISA ili RT-PCR) utvrđeno je da se rotavirusi izlučuju četiri do 57 dana, a izlučivanje može biti i dulje u teško imunokompromitirane djece (1). Sukladno navedenom, iznimno su stabilni u okolišu (12), a baš ta postojanost može imati znatne reperkusije za okolišnu sigurnost cjepiva (13).

S obzirom na to da je i s medicinskog i s veterinarskog stajališta RVA najvažnija vrsta rotavirusa, ovaj pregledni rad će primarno istaknuti molekularno-epidemiološke osobitosti RVA prisutnih kod ljudi i životinja te uputiti na čimbenike i mehanizme zbog kojih se ova vrsta u skupini enteričnih virusa opravdano smatra potencijalno zoonotskim patogenom.

GRAĐA, KLASIFIKACIJA I EVOLUCIJA ROTAVIRUSA

Reoviridae je jedna od najkompleksnijih virusnih porodica pripadnici koje inficiraju sisavce, ptice, gmazove, vodozemce, ribe, mekušce, rakove, kukce, biljke i gljive. Naziv porodice potječe od akronima koji označava "respiratory enteric orphan" (engl.), a nastao je jer su prvi članovi porodice utvrđeni u dišnom i probavnom sustavu životinja i ljudi kao "siročad" odnosno nisu bili povezani s bolešću. Ti su virusi danas članovi roda *Orthoreovirus* (14).

Unutar porodice *Reoviridae* razlikujemo dvije potporodice: *Sedoreovirinae* (obuhvaća šest rodova) i *Spinareovirinae* (obuhvaća devet rodova). Rod *Rotavirus* se nalazi unutar

potporodice *Sedoreovirinae* i obuhvaća devet vrsta (*Rotavirus A* do *Rotavirus I*) (15) te dodatno moguće novu vrstu *Rotavirus J* (16), koja je u postupku ishođenja statusa. *Rotavirus A* (RVA), *Rotavirus B* (RVB) i *Rotavirus C* (RVC) prepoznati su patogeni kod ljudi i životinja, a ostale vrste su do sada dokazane samo kod životinja (1, 17). Ime roda dolazi od latinskog *rota* zbog izgleda virusne čestice nalik kotaču kada se ona promatra pod elektronskim mikroskopom (6).

Za bolje razumijevanje klasifikacije i zoonotskog potencijala rotavirusa potrebno je pobliže upoznati građu virusne čestice. Rotavirusne čestice su veličine 70-75 nm u promjeru, ikozaedralnog su oblika i nemaju lipidnu ovojnicu. Genom rotavirusa se sastoji od 11 segmenata dsRNA koja kodira šest strukturnih virusnih proteina (VP) (VP1-VP4, VP6, VP7) i šest nestrukturnih proteina (NSP) (NSP1-NSP6) (1). Ukupna veličina genoma kreće se od 16 do 21 kbp, a svaki genomski segment je zastupljen u jednakom udjelu u virionu. Genomski segmenti su monocistranski, osim segmenta 11 koji kodira dva proteina (NSP5 i NSP6) (14). Genom je obavijen s tri omotača koji čine troslojnu kapsidu virusa, od kojih je svaki izgrađen od strukturnih virusnih proteina: unutarnji se sastoji od VP2, srednji od VP6, a vanjski omotač od VP7 i VP4 (18).

Virusni protein VP6 je bio prvi rotavirusni protein koji se primjenjivao za klasifikaciju i na temelju njega se određuje pripadnost vrsti (RVA do RVI) (1). Godine 1989. uspostavljen je binarni sustav klasifikacije rotavirusa temeljen na dva vanjska proteina, VP7 (genotip G; ime dolazi od engleske riječi „Glycosylated“) i VP4 (genotip P, ime dolazi od engleskih riječi „Protease sensitive“) koji neovisno izazivaju stvaranje neutralizacijskih protutijela. Početno se klasifikacija temeljila na serotipizaciji gdje je do sada prepoznato 14 serotipova G i 14 serotipova P. Kako je serotipizacija zahtjevnija i neprimjenjiva u svim laboratorijima, a uz široko dostupne molekularne metode, nadopunjena je i zamijenjena genotipizacijom (1, 15, 18). Za razliku od klasifikacije serotipova/genotipova G, za serotip/genotip P usvojeno je dvojno nazivlje. Kada je serotip P poznat, označava se arapskim brojevima iza kojih katkad slijedi veliko slovo, a genotip P se označava arapskim brojem u uglatim zagradama odmah nakon oznake serotipa (1, 18) (primjerice u cjepivu RotaTeq se nalazi P1A[8]). Do sada je prepoznato ukupno 36 genotipova G i 51 genotip P rotavirusa A (19).

Danas se teži uporabi klasifikacijskog sustava koji obuhvaća svih 11 segmenata, kako bi se dobio uvid u to koji geni utječu na raspon domaćina, replikaciju i virulenciju te uvid u evoluciju i epidemiologiju rotavirusa. U toj proširenoj shemi klasifikacije, oznake Gx-P[x]-Ix-Rx-Cx-Mx-Ax-Nx-Tx-Ex-Hx (x = arapski brojevi počevši od 1) genomski su segmenti VP7-VP4-VP6-VP1-VP2-VP3-NSP1-NSP2-NSP3-NSP4-NSP5 (Tablica 1) (18, 20).

TABLICA 1. Postotci podudarnosti nukleotidnog slijeda pojedinih genomskih segmenata RVA koji određuju pripadnost pojedinom genotipu (18).

Virusni proteini	Prag nukleotidne sličnosti; cutoff (%)	Genotipovi*	Ime genotipa
VP7	80	36 G	Glycosylated
VP4	80	51 P	Protease sensitive
VP6	85	20 I	Inner capsid
VP1	83	22 R	RNA dependent RNA polymerase
VP2	84	20 C	Core protein
VP3	81	20 M	Methyltransferase
NSP1	79	31 A	Interferon Antagonist
NSP2	85	22 N	NTPase
NSP3	85	22 T	Translation enhancer
NSP4	85	27 E	Enterotoxin
NSP5	91	22 H	pHosphoprotein

*broj pojedinih genotipova prema RCWG (Rotavirus Classification Working Group) od 29. svibnja 2018. godine (19).

Evolucija rotavirusa je vrlo dinamična, a popratni mehanizmi obuhvaćaju česte mutacije i rekombinacije, preslagivanja i preraspodjelu genoma. Smatra se da najveći doprinos daju točkaste mutacije zbog djelovanja pogreškama sklone rotavirusne RNA polimeraze (RdRp) te genomsko preslagivanje koje pridonosi zoonotskom potencijalu rotavirusa (12).

ROTAVIRUSI U LJUDI

Epidemiološka istraživanja diljem svijeta pokazuju da su rotavirusi jedan od najvažnijih uzročnika proljeva u novorođenčadi i djece te su utvrđeni u 50-60% djece hospitalizirane sa simptomima akutnog gastroenteritisa svake godine (6). Istaknuta je sezonska pojavnost u zemljama umjerenog klimatskog pojasa tijekom hladnijih mjeseci, dok se u zemljama tropskog i subtropskog pojasa ta sezonalnost gubi (17). Više od 90% smrtnih slučajeva od 215.000 na godinu odnosi se na zemlje u razvoju (3), u kojima loša higijena, neishranjenost te visoka incidencija infekcija utječu na imunosni sustav i pridonose fatalnom ishodu rotavirusnih infekcija (6). O proširenosti rotavirusa govori i podatak da je do pete godine života većina djece seropozitivna na RVA, bez obzira na regiju u kojoj žive (17). Iako su ljudi svih dobi prijemljivi za infekciju RVA, u djece u dobi između četiri mjeseca i tri godine veća je vjerojatnost razvoja teže kliničke slike (17). Rotavirusni gastroenteritis u odraslih je opisan u bolničkog osoblja, u putnika (putnički proljev) te u ljudi podvrgnutih transplantaciji i kemoterapiji. Nozokomijalne infekcije rotavirusima često se javljaju pa je prema nekim istraživanjima otprilike jedna od pet infekcija stečena u bolnici (1). U neo-

natalnoj dobi infekcije RVA su najčešće asimptomatske, iako su opisani i teži oblici kliničke slike s pojavom nekrotizirajućeg enterokolitisa (21).

Prema do sada objavljenim rezultatima molekularno-epidemioloških istraživanja, genotipovi G1 do G4 uzrokuju 97,5% svih rotavirusnih infekcija u Aziji, Sjevernoj Americi i Europi te nešto manje (83,5% do 90,4%) u Južnoj Americi, Africi i Australiji. Genotip G1 je najučestaliji na svim kontinentima, dok genotipovi G5, G8, G9 i G12 imaju lokalno značenje u pojedinim dijelovima svijeta. Kada promatramo genotipove temeljene na VP4, genotip P[8] najučestaliji je u ljudi, a slijedi ga genotip P[4]. Takvo što je i očekivano, jer je genotip P[8] gotovo uvijek nađen zajedno s genotipovima G1, G3, G4 i G9, dok P[4] dolazi karakteristično u kombinaciji s G2 (1). Pregled najznačajnijih genotipova i genotipskih kombinacija RVA kod ljudi prikazan je u Tablici 2. Preslagivanje između najučestalijih genotipova G i P, koji stalno kruže na nekom području, dovodi do pojave neuobičajenih kombinacija. Primjerice, sojevi G1P[4] i G2P[8] često kruže zajedno sa sojevima G1P[8] i G2P[4] (17).

Uspoređujući druge genomске segmente, osim genotipova G i P, u ljudi su prepoznate dvije glavne genotipske konstelacije (genogrupe), Wa-like i DS-1-like (20). Wa-like RVA imaju konstelaciju I1-R1-C1-M1-A1-N1-T1-E1-H1 i dijele zajedničkog pretka sa svinjskim RVA. Ova genotipska konstelacija u kombinaciji s P[8] i različitim genotipovima G je najučestalija konstelacija RVA u posljednja tri desetljeća. Istraživanja su pokazala da sojevi G1P[8], G3P[8], G4P[8], G9P[8] i G12P[8] posjeduju Wa-like genotipsku konstelaciju. Opisan je i manji broj humanih sojeva G5, G8, G10 i G11 u kombinaciji s P[8] i Wa-like genotipskom konstelacijom, ali je njihovo epidemiološko značenje trenutno zanemarivo (22). DS-1-like RVA, s konstelacijom I2-R2-C2-M2-A2-N2-T2-E2-H2, ima nekoliko segmenata koji imaju zajedničko podrijetlo s goveđim RVA. Humani soj G2P[4] obično dolazi u kombinaciji s ovom genotipskom konstelacijom (22). Postoji i treća, najmanje zastupljena genotipska konstelacija, AU-1-like (I3-R3-C3-M3-A3-N3-T3-E3-H3), za koju se smatra da potječe od mačaka ili pasa (20), a kruži u Japanu i Izraelu (22).

ROTAVIRUSI U ŽIVOTINJA

U životinja se rotavirusi smatraju vodećim uzročnicima virusnog proljeva u intenzivnim farmskim uzgojima diljem svijeta (14), gdje uzrokuju znatne ekonomske gubitke zbog uginuća, troškova liječenja i smanjenog prirasta. Infekcije mogu biti asimptomatske ili simptomatske s tim da su potonje češće zabilježene u mladunčadi, obično u dobi od jednog do 12 tjedana (6). I dok je u asimptomatskih goveda utvrđena niža prevalencija rotavirusa u usporedbi sa životi-

TABLICA 2. Pregled najčešćih genotipova G i P te genotipskih kombinacija u ljudi, goveda i svinja. Učestalost najznačajnijih genotipova G i P kod goveda i svinja je izražena u postotku (17).

Vrsta	Genotip G	Genotip P	Prevladavajuće kombinacije
ljudi	G1*	P[1]	
	G2*	P[2]	
	G3*	P[3]	
	G4*	P[4]*	
	G5	P[5]	
	G6	P[6]	
	G8	P[8]*	G1P[8] G2P[4]
	G9	P[9]	G3P[8] G4P[8]
	G10	P[10]	G9P[8]
	G11	P[11]	G12P[8]
	G12	P[13]	
	G20	P[14]	
		P[19]	
		P[25]	
	P[28]		
goveda	G1	P[1] (2%)	
	G2	P[3]	
	G3	P[5] (26%)	
	G5	P[6]	
	G6 (57%)	P[7]	
	G8 (3%)	P[11] (21%)	G6P[5] G6P[11]
	G10 (21%)	P[14]	G10P[11]
	G11	P[17]	
	G15	P[21]	
	G17	P[29]	
G21	P[33]		
G24	/		
svinje	G1	P[5]	
	G2	P[6] (16%)	
	G3 (11%)	P[7] (47%)	
	G4 (10%)	P[8]	
	G5 (46%)	P[11]	
	G6	P[13] (3%)	
	G8	P[14]	G5P[7]
	G9	P[19]	
	G10	P[23]	
	G11	P[26]	
	G12	P[27]	
	G26	P[32]	
	/	P[34]	

* genotipovi G1-G4 te P[8] i P[4] čine više od 90% svih genotipova G i P rotavirusa A u ljudi (1)

njama s proljevom, neka istraživanja provedena na svinjama upućuju na suprotno, odnosno na češće asimptomatske infekcije (5). Za razliku od farmskih životinja, u kućnih ljubimaca, primarno pasa i mačaka, RVA se ne smatraju glavnim crijevnim patogenima i zabilježeni su povremeno u klinički oboljelih i zdravih jedinki (6).

Istraživanja životinjskih sojeva RVA značajno zaostaju; čak je 30 puta manje genotipiziranih sojeva RVA podrijetlom od goveda i 100 puta manje podrijetlom od svinja u usporedbi s humanim RVA (2). Bitno je naglasiti iznimno slabu istraženost rotavirusa u divljih životinja (23), pa bi time njihova epidemiološka uloga mogla biti podcijenjena. U tom kontekstu važno je razmotriti i činjenicu da većina emergentnih zoonoza potječe baš od divljih životinja (24). Značajno veća genotipska raznolikost RVA dokazanih u svinja ogleda se u čak 50-ak genotipskih kombinacija u usporedbi s tek 20-ak dokazanih u goveda (5, 17). Pregled do sada opisanih genotipova i genotipskih kombinacija kod goveda i svinja prikazan je u Tablici 2. Kada govorimo o molekularno-epidemiološkim podacima za RVA kod ostalih domaćih životinja, broj provedenih istraživanja je značajno manji. Među do sada zabilježenim psećim rotavirusima A prevladava genotipska kombinacija G3P[3], a među mačjim G3P[3], G3P[9] ili G6P[9]. Kod konja su najčešće genotipske kombinacije RVA G3P[12] i G14P[12], dok su genotipovi RVA koji cirkuliraju u koza, ovaca i kamelida slični onima prisutnim u populaciji goveda (17). Velika raznolikost genotipova vjerojatno postoji i kod ostalih genomskih segmenata RVA u životinja, ali reprezentativna analiza učestalosti pojedinih genotipskih konstelacija neće moći biti provedena dok se značajnije ne poveća broj sekvenciranih cijelih genoma RVA podrijetlom od različitih životinjskih vrsta.

ISTRAŽIVANJA MOLEKULARNIH ZNAČAJKI ROTAVIRUSA U HRVATSKOJ

Istraživanja rotavirusa u Republici Hrvatskoj su do sada bila isključivo usredotočena na humane RVA. Prve spoznaje o zastupljenosti pojedinih genotipskih kombinacija i genotipova odnose se na rotavirusne sezone 2005. i 2006. godine, kada su najčešće genotipske kombinacije bile G1P[8] (21,8%), G2P[4] (19,2%), G4P[8] (12,6%), G8P[8] (6,8%), G3P[8] (5%), G2P[8] (3,7%), G1P[4] (2,4%), G4P[4] (1,7%), G9P[8] (1,3%), G9P[4] (0,2%), G10[6] i miješani G i/ili P genotipovi (8,1%) (25). Ovakav raspored genotipskih kombinacija nije česta pojava, a za istaknuti je značajnu zastupljenost genotipske kombinacije G8P[8] koja se 2006. godine pojavila u iznimno visokom postotku, i to pretežno kod djece mlađe od godine dana (25, 26).

Sljedeće sustavno istraživanje genotipske raznolikosti RVA u pedijatrijskoj populaciji uslijedilo je u razdoblju od srpnja

2012. do srpnja 2014. godine te je tada G1P[8] bio najučestaliji genotip RVA (60,5%), a slijedili su ga G2P[4] (21,2%), G1P[4] (3,3%), G3P[8] (3,3%), G2P[8] (3%) i G9P[8] (2,5%) (27). Dominacija genotipske kombinacije G1P[8] je česta pojava u zemljama gdje rotavirusno cjepivo nije sastavni dio NIP-a, iako treba istaknuti da se zastupljenost određenih genotipskih kombinacija ili genotipova mijenja iz sezone u sezonu uz značajna regionalna odstupanja (28), a razlike postoje i između glavne rotavirusne sezone i izvansezonske pojavnosti RVA (4).

Istraživanja rotavirusa kod životinja i u okolišu (površinskim vodama i školjkašima) u RH se donedavno nisu provodila, ali je u travnju 2018. godine započelo sustavno istraživanje RVA u različitim vrsta, okolišu te nastavak istraživanja genotipske raznolikosti RVA u pedijatrijskoj populaciji u trajanju od pet godina koje će rezultirati novim spoznajama, posebno u kontekstu molekularne epidemiologije i zoonotskog potencijala autohtonih sojeva RVA (29).

MEĐUVRSNI PRIJENOS ROTAVIRUSA

Općenito, rotavirusi su specifični za domaćina, pa je većina životinjskih rotavirusa atenuirana u heterolognom domaćinu (čovjeku) i obrnuto, a ta je činjenica iskorištena i u proizvodnji cjepiva (1, 30). Svojedobno su na tržištu bila dostupna dva cjepiva koja su sadržavala humano-animalne reasortante – RotaShield i RotaTeq. No RotaShield, humano-majmunski reasortant, povučen je s tržišta jer je bio povezan s intususcepcijom crijeva (30, 31), dok je cjepivo RotaTeq i dalje dostupno te je registrirano i na hrvatskom tržištu (9). Postojanje reasortanata, dijeljenje neutralizacijskih antigena i molekularno dokazana srodnost humanih i životinjskih rotavirusa stvorili su hipotezu o zoonotskom potencijalu ovih virusa (32). Da su heterologne rotavirusne infekcije više od hipoteze, zabilježeno je i u prirodnim i u eksperimentalnim uvjetima, i to između različitih vrsta životinja te između životinja i ljudi i obrnuto (32). Svakako je potrebno istaknuti da u zemljama u razvoju postoji veći rizik od rotavirusnih zoonoza zbog oskudnih izvora vode i dijeljenja životnog prostora s domaćim životinjama.

Primjer prijenosa između različitih vrsta životinja je goveđi rotavirus PP-1 koji je iznimno patogen za svinje, a istodobno se slabo umnožavao u eksperimentalno inficiranih goveda. Analiza nukleotidnog slijeda tog rotavirusa genotipa G3 pokazala je da je riječ o goveđe-svinjskom reasortantu (33). Kada gledamo na učestalost humano-animalnih reasortanata, procijenjeno je da 2% od 36 000 genotipiziranih humanih sojeva RVA odgovara zadanim kriterijima (5). Analiza nedavno provedenog cjelogenomskog sekvenciranja otkrila je da su humani sojevi G3P[3] Ro1845 i HCR3A blisko srodni s psećim sojevima CU-1, K9 i A79-10 i mačjim sojem Cat97

u svim genomskim segmentima (34). Postoje i dokazi da se svinjsko-humani reasortanti RVA javljaju i uspješno prenose kroz ljudsku populaciju. Tako je u djece iz Brazila, Argentine i Paragvaja utvrđen neuobičajeni rotavirus G5, a pokazalo se da je riječ o reasortantu između humanog Wa-like i svinjskog RVA (6). Također, za neuobičajene reasortante G9P[8] i G12P[8], koji su postali učestali globalno tijekom kasnih 1990-ih i ranih 2000-tih, pokazalo se da je njihov genomski segment VP7 vjerojatno svinjskog podrijetla, a drugi površinski antigeni i genotipska konstelacija humanog podrijetla (17). U nekoliko navrata i goveđi RVA su bili izvor genomskih segmenata. Reasortant G10P[11] koji se smatra čestim humanim patogenom na indijskom potkontinentu ima segmente NSP1 i NSP3 humanog podrijetla, a druge segmente goveđeg podrijetla (6). Daljnja istraživanja pokazuju da je neuobičajeni humani soj G6P[6] B1711 najvjerojatnije rezultat preslagivanja između humanog DS-1-like i goveđeg rotavirusa (35). U ljudi infekcija humano-animalnim reasortantima može izazvati teže simptome nego klasičnim humanim RVA, što može biti posljedica slabije imunosti na te emergentne sojeve ili veće virulencije zbog genetičkog preslagivanja (32).

Primjer sposobnosti humanih rotavirusa da inficiraju životinje je humani G1P[8] Wa-like koji je patogen za svinje (36), a ta se činjenica iskoristila za procjenu učinkovitosti potencijalnih humanih antirotavirusnih cjepiva (32). Vrlo je zanimljiv i nalaz da su najučestalije antigenske kombinacije u svinja i goveda G5P[7] i G6P[11] utvrđene u samo nekoliko humanih slučajeva, dok su G3/G9/G4P[6] svinjskog i G6/G8/G10P[14] goveđeg podrijetla relativno češći u ljudi nego u homologne vrste (17).

Cjelogenomsko sekvenciranje otkrilo je i mogućnost da pojedini segmenti u genomskoj konfiguraciji rotavirusa mogu potjecati od više različitih domaćina (17). Primjerice, mađarski soj G6P[14] utvrđen u djeteta s teškim proljevom ima segmente nalik na bivolji, mačji i goveđi u svojoj genotipskoj konstelaciji (37), a australski soj G3P[14] ima kombinaciju šišmišnjih, mačjih/psećih i goveđih genomskih segmenata (38).

Iz svega navedenog je vidljivo da je istraživanje životinjskih rotavirusa prijeko potrebno kako bi se dobila što točnija slika životinjskih rezervoara radi stjecanja uvida u okolnosti pod kojima dolazi do prelaska virusa na novog domaćina (5, 17).

NAČINI PRIJENOSA ŽIVOTINJSKIH ROTAVIRUSA NA LJUDE

Vrlo malo se zna o načinima međuvrsnog prijenosa rotavirusa. No smatra se da su dva glavna načina prelaska vrsne barijere – izravan međuvrtni prijenos cijelih viriona i genomsko preslagivanje između humanih i animalnih sojeva RVA.

Kada rotavirusi izravno prijeđu vrsnu barijeru, uglavnom nisu sposobni učinkovito inficirati ili se širiti u novom domaćinu (6). Smatra se da je virusni protein VP4, odnosno njegov apikalni dio VP8*, izravno povezan s prijemljivošću na infekciju rotavirusima i vrsnom prilagodboom tako što posreduje u procesu prihvaćanja viriona na stanicu putem glikana specifičnih za domaćina (39). Tako je zamijećeno da većina humano-svinjskih reasortanata posjeduje genotip P[6] te se smatra da taj genotip putem svoje domene VP8 ima mogućnost vezanja na humane i svinjske receptore zbog njihove sličnosti (antigen H tip 1) (40).

Genomsko preslagivanje se može javiti kada dva različita soja rotavirusa (npr. životinjski i humani soj) inficiraju istu stanicu te tijekom umnažanja i sastavljanja razmijene genomske segmente te nastaju kimere (engl. chimeric viruses) koje posjeduju dsRNA segmente obaju roditeljskih virusa (6). Stjecanjem humanih genomskih segmenata životinjski RVA dobivaju priliku učinkovito inficirati i širiti se u populaciji novog domaćina (6). Stoga se genomsko preslagivanje između humanih i životinjskih RVA smatra ključnim za stabilan unos gena životinjskih rotavirusa i učinkovit prijenos humano-animalnih reasortanata sa čovjeka na čovjeka (17). Smatra se da su se mačji i pseći sojevi proširili na ljudsku populaciju kao cijeli virioni, a goveđi preslagivanjem s humanim rotavirusima (32). Prijenos heterolognih sojeva rotavirusa na ljude može se javiti izravno putem bliskog dodira s bolesnom životinjom, ili neizravno preko fecesom kontaminiranih površina, predmeta, hrane i vode, jer životinje inficirane rotavirusima fecesom izlučuju velike količine virusnih čestica (17, 32). Voda koja može biti idealan medij za širenje rotavirusa, istodobno može biti onečišćena fecesom više vrsta i time omogućiti istodobnu infekciju homolognim i heterolognim RVA, stvarajući priliku za genomsko preslagivanje *in vivo* (17). Unos životinjskih RV-a u populaciju ljudi svakako je moguć i putem kontaminirane hrane animalnog podrijetla, koja se jede nedovoljno termički obrađena. Kada promatramo posredno širenje rotavirusa putem kontaminiranih površina i predmeta, važno je istaknuti i ljudski faktor te podatak da rotavirusi mogu zadržati infektivnost na koži nekoliko sati (32). Premda se o respiratornom načinu prijenosa RVA pod prirodnim okolnostima malo zna, u eksperimentalnim uvjetima je takav način prijenosa moguć, pa ga treba imati u vidu prilikom čišćenja površina i objekata. Smatra se da rotavirusi mogu preživjeti u zraku dovoljno dugo da budu rizik za čovjeka ili životinju u istom okruženju (32).

ZAKLJUČAK

Rotavirusi, osobito vrsta rotavirus A, jedni su od najvažnijih uzročnika akutnog gastroenteritisa kod ljudi i životinja s

visokim pobolom u zemljama s visokim higijenskim standardom. To je posebno vidljivo u zemljama koje dostupna cjepiva nisu uključile u svoje nacionalne imunizacijske programe, pa tako i u Hrvatskoj. Zoonotski potencijal nedvojbeno postoji, ponajviše zahvaljujući prirodi rotavirusnog genoma i posljedičnoj brznoj evoluciji zbog pojave točkastih mutacija i genomskog preslagivanja. Iako ta pojava ne treba izazvati visoku zabrinutost, iznimno je važno sustavno pratiti molekularne značajke rotavirusa kod ljudi i životinja, posebno u kontekstu razvoja strategije uvođenja aktivne imunizacije kod ljudi, ali i naknadnog praćenja njezine provedbe.

Kratice:

RV – rotavirus
RVA – rotavirus A
RVB – rotavirus B
RVC – rotavirus C

LITERATURA

- Estes MK, Greenberg HB. Rotaviruses. In: Knipe DM, Howley PM, ur. *Fields Virology*, 6. izd., sv. 2. Philadelphia: Wolters Kluwer, Health/Lippincott Williams &Wilkins; 2013:1347-401.
- Papp H, Laszlo B, Jakab F i sur. Review of group A rotavirus strains reported in swine and cattle. *Vet Microbiol*. 2013;165(3-4):190-9. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.020.
- Tate JE, Burton AH, Boschi-Pinto C, Parashar UD. Global, regional, and national estimates of rotavirus mortality in children <5 years of age, 2000-2013. *Clin Infect Dis*. 2016;62 Suppl 2:S96-s105. doi: 10.1093/cid/civ1013.
- Hungerford D, Vivancos R, Read JM i sur. In-season and out-of-season variation of rotavirus genotype distribution and age of infection across 12 European countries before the introduction of routine vaccination, 2007/08 to 2012/13. *Euro Surveill*. 2016;21(2). doi: 10.2807/1560-7917.es.2016.21.2.30106.
- Midgley SE, Banyai K, Buesa J i sur. Diversity and zoonotic potential of rotaviruses in swine and cattle across Europe. *Vet Microbiol*. 2012;156:238-45. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.027.
- Martella V, Banyai K, Matthijnssens J, Buonavoglia C, Ciarlet M. Zoonotic aspects of rotaviruses. *Vet Microbiol*. 2010;140(3-4):246-55. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.028.
- Gómez-Rial J, Sánchez-Batán S, Rivero-Calle I i sur. Rotavirus infection beyond the gut. *Infect Drug Resist*. 2019;12:55-64. doi: 10.2147/IDR.S186404.
- WHO. Rotavirus vaccines. WHO position paper, January 2013. *Wkly Epidemiol Rec*. 2013;88:49-64.
- Vrdoljak M, Tešović G. Rotavirusni gastroenteritis: epidemiologija i cijepljenje. Hrvatska proljetna pedijatrijska škola, XXXV. seminar 2018., Split, 2018:307-16.
- Tešović G. Childhood vaccinations in Croatia. *Period Biol*. 2012;114:149-66.
- Meszner Z, Anca I, Andre F i sur. Rotavirus vaccination in central Europe. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2013;56(6):586-96. doi: 10.1097/MPG.0b013e31828dc35d.
- Desselberger U. Rotaviruses. *Virus Res*. 2014;190:75-96. doi: https://doi.org/10.1016/j.virusres.2014.06.016.
- Moresco V, Damazo NA, Barardi CR. Rotavirus vaccine stability in the aquatic environment. *J Appl Microbiol*. 2016;120:321-8. doi: 10.1111/jam.13021.

14. Palmarini M. Reoviridae. In: MacLachlan NJ, Dubovi EJ, ur. Fenner's Veterinary Virology, 5. izd. Boston: Academic Press; 2017:299-317.
15. ICTV. Rotavirus Taxonomy. Dostupno na <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>; pristupljeno 15. ožujka 2019.
16. Banyai K, Kemenesi G, Budinski I i sur. Candidate new rotavirus species in Schreiber's bats, Serbia. *Infect Genet Evol.* 2017;48:19-26. doi: 10.1016/j.meegid.2016.12.002.
17. Doro R, Farkas SL, Martella V, Banyai K. Zoonotic transmission of rotavirus: surveillance and control. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2015;13:1337-50. doi: 10.1586/14787210.2015.1089171.
18. Matthijnssens J, Ciarlet M, Rahman M i sur. Recommendations for the classification of group A rotaviruses using all 11 genomic RNA segments. *Arch Virol.* 2008;153:1621-9. doi: 10.1007/s00705-008-0155-1.
19. RCWG. List of accepted genotypes by Rotavirus Classification Working Group. Dostupno na <https://rega.kuleuven.be/cev/viralmetagenomics/virus-classification/rcwg/>; pristupljeno 15. ožujka 2019.
20. Matthijnssens J, Ciarlet M, Heiman E i sur. Full genome-based classification of rotaviruses reveals a common origin between human Wa-Like and porcine rotavirus strains and human DS-1-like and bovine rotavirus strains. *J Virol.* 2008;82:3204-19. doi: 10.1128/jvi.02257-07.
21. Ramani S, Stewart CJ, Laucirica DR, Ajami NJ. Human milk oligosaccharides, milk microbiome and infant gut microbiome modulate neonatal rotavirus infection. *Nat Commun.* 2018;9:5010. doi: 10.1038/s41467-018-07476-4.
22. Matthijnssens J, Van Ranst M. Genotype constellation and evolution of group A rotaviruses infecting humans. *Curr Opin Virol.* 2012;2:426-33. doi: 10.1016/j.coviro.2012.04.007.
23. Ghosh S, Kobayashi N. Exotic rotaviruses in animals and rotaviruses in exotic animals. *Vir Dis.* 2014;25:158-72. doi: 10.1007/s13337-014-0194-z.
24. Preston ND, Daszak P, Colwell RR. The human environment interface: applying ecosystem concepts to health. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;365:83-100. doi: 10.1007/82_2013_317.
25. Tcheremenskaia O, Marucci G, De Petris S i sur. Molecular epidemiology of rotavirus in central and southeastern Europe. *J Clin Microbiol.* 2007;45:2197-204. doi: 10.1128/jcm.00484-07.
26. Delogu R, Lo Presti A, Ruggeri FM i sur. Full-genome characterization of a G8P[8] rotavirus that emerged among children with diarrhea in Croatia in 2006. *J Clin Microbiol.* 2013;51:1583-8. doi: 10.1128/JCM.00396-13.
27. Vrdoljak M, Papić N, Gužvinac M i sur. The burden of acute rotavirus gastroenteritis in Croatian children – a multicenter prospective study on clinical characteristics and molecular epidemiology (2012-2014). 34th Annual Meeting of the ESPID, 2016; Brighton, UK; 2016:835-6.
28. Banyai K, Laszlo B, Duque J i sur. Systematic review of regional and temporal trends in global rotavirus strain diversity in the pre rotavirus vaccine era: insights for understanding the impact of rotavirus vaccination programs. *Vaccine.* 2012;30 Suppl 1:A122-30. doi: 10.1016/j.vaccine.2011.09.111.
29. Brnić D, Šimić I, Krešić N, Škoko I, Lojkić I. Rotaviruses in Croatian ecosystem: molecular epidemiology and zoonotic potential - Reco. *Power of Viruses Book of Abstracts, Poreč, Croatia; 2018:47-47.*
30. Angel J, Franco MA, Greenberg HB. Rotavirus vaccines: recent developments and future considerations. *Nat Rev Microbiol.* 2007;5:529. doi: 10.1038/nrmicro1692.
31. Simonsen L, Viboud C, Elixhauser A, Taylor RJ, Kapikian AZ. More on RotaShield and intussusception: the role of age at the time of vaccination. *J Infect Dis.* 2005;192 Suppl 1:S36-43. doi: 10.1086/431512.
32. Cook N, Bridger J, Kendall K, Gomara MI, El-Attar L, Gray J. The zoonotic potential of rotavirus. *J Infect.* 2004;48(4):289-302. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2004.01.018>.
33. El-Attar L, Dhaliwal W, Howard CR, Bridger JC. Rotavirus cross-species pathogenicity: molecular characterization of a bovine rotavirus pathogenic for pigs. *Virology.* 2001;291:172-82. doi: <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1222>.
34. Tsugawa T, Hoshino Y. Whole genome sequence and phylogenetic analyses reveal human rotavirus G3P[3] strains Ro1845 and HCR3A are examples of direct virion transmission of canine/feline rotaviruses to humans. *Virology.* 2008;380:344-53. doi: <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.07.041>.
35. Matthijnssens J, Rahman M, Van Ranst M. Two out of the 11 genes of an unusual human G6P[6] rotavirus isolate are of bovine origin. *J Gen Virol.* 2008;89:2630-5. doi: 10.1099/vir.0.2008/003780-0.
36. Ward LA, Yuan L, Rosen BI, Tò TL, Saif LJ. Development of mucosal and systemic lymphoproliferative responses and protective immunity to human group A rotaviruses in a gnotobiotic pig model. *Clin Diagn Lab Immunol.* 1996;3:342-50.
37. Bányai K, Martella V, Molnár P, Mihály I, Van Ranst M, Matthijnssens J. Genetic heterogeneity in human G6P[14] rotavirus strains detected in Hungary suggests independent zoonotic origin. *J Infect.* 2009;59:213-5. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2009.06.009>.
38. Donato CM, Manuelpillai NM, Cowley D i sur. Genetic characterization of a novel G3P[14] rotavirus strain causing gastroenteritis in 12 year old Australian child. *Infect Genet Evol.* 2014;25:97-109. doi: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.04.009>.
39. Liu Y, Huang P, Tan M i sur. Rotavirus VP8*: phylogeny, host range, and interaction with histo-blood group antigens. *J Virol.* 2012;86:9899-910. doi: 10.1128/JVI.00979-12.
40. Theuns S, Heylen E, Zeller M i sur. Complete genome characterization of recent and ancient Belgian pig group A rotaviruses and assessment of their evolutionary relationship with human rotaviruses. *J Virol.* 2015;89:1043-57. doi: 10.1128/jvi.02513-14.

SUMMARY

Molecular characteristics and zoonotic potential of rotaviruses

Ivana Šimić, Alen Kovačević, Nina Krešić, Ines Škoko, Vlatka Konjik, Jelena Jukić Guć, Vjekoslav Krželj, Goran Tešović, Dragan Brnić

Rotaviruses are one of the most important pathogens causing acute gastroenteritis in humans and animals. Among nine species, rotavirus A is particularly emphasised considering its prevalence and pathogenicity. Even today, apart from the substantial morbidity and hospitalisation rates in countries with high hygiene standards, it causes considerable mortality in developing countries. Such impact is especially evident if available vaccines are not included in the national immunisation program. Due to the nature of their genome, the evolution of rotaviruses is quite rapid owing to the accumulation of point mutations and genome reassortment. Therefore, the high heterogeneity and the fact that nowadays there are 36 G genotypes and 51 P genotypes of rotavirus A, is not surprising. When direct interspecies transmission occurs, rotaviruses are mostly not able to efficiently infect or transmit in the new host. However, genome reassortment can result in the generation of new, potentially emergent, human-animal reassortants. Thus, it is necessary to continuously monitor the animal rotavirus strains in order to get complete perspective of the potential animal reservoirs that could be responsible for the introduction of novel rotaviruses in human population or rotavirus genes in the genetic backbone of human strains. Systematic investigation of rotavirus molecular characteristics in a certain region is of special importance before the introduction or during the implementation of national immunisation program. Comprehensive research that would evaluate the animal reservoirs and the zoonotic potential of rotavirus A strains in Croatian ecosystem is currently in progress.

Key words: ROTAVIRUS; GENOTYPE; ZOOSES; CROATIA