

[< Vissza](#)

RÖVID KOMMUNIKÁCIÓ

 Hozzáférésű

Varicella-zoster vírus vakcinák attenuációjának értékelése genomi összehasonlítás alapján

Jae Yun Moon, Jina Seo, Jaewoo Lee , Daechan Park 

Először megjelent: 2023. február 18

<https://doi.org/10.1002/jmv.28590>

Idézetek: 1

Absztrakt

Élő, legyengített varicella-zoster vírus (VZV) vakcinákat alkalmaznak a bárányhimlő és az övsömör megelőzésére. Az egynukleotidos polimorfizmusok (SNP-k), amelyek a szülői törzsek gyengülése során fordulnak elő, a vakcina biztonságosságának kritikus mutatói. A kereskedelmi forgalomban kapható VZV-vakcinák gyengülésének felmérése érdekében a genetikai változatokat átfogóan megvizsgálták négy VZV-vakcinából (Barycela, VarilRix, VariVax és SKY Varicella) izolált vírus-DNS nagy áteresztőképességű szekvenálásával. A négy vakcina teljes genomjának összehasonlítása a vad típusú törzssel (Dumas) feltárta, hogy a szekvenciák genomszintű skálán erősen konzerváltak. A négy vakcina 196 gyakori változata közül 195 már jelen volt a szülői törzs (pOka) genomjában, ami azt jelzi, hogy a variánsok a Dumas törzsből származó szülői törzs előállításán fordultak elő. A pOka genommal összehasonlítva a vakcinák eltérő variánsgyakoriságot mutattak az egész genomra kiterjedően és az attenuációval kapcsolatos nyitott leolvasási kereten belül. A gyengítéshez kapcsolódó 42 SNP különösen azt mutatta, hogy a Barycela, VarilRix, VariVax és SKY Varicella növekvő sorrendben vannak a pOka-szerű genotípusokkal való hasonlóság tekintetében, ami viszont genomikai bizonyítékot szolgáltat az attenuáció szintjére. Végül a filogenetikai hálózatelemzés kimutatta, hogy a szülői törzstől való genetikai távolságok korrelálnak a vakcinák attenuációs szintjével.

1. BEMUTATKOZÁS

A Varicella-zoster vírus (VZV) egy humán herpeszvírus, amely bárányhimlőt (varicella) okoz, amelyet láz és általános bőrkiütés jellemez. Az elsődleges fertőzést követően a VZV élethosszig tartó látenciát tud kialakítani a szenzoros ganglionokban, és reaktiválódása

[< Vissza](#)

csecsemőknél és immunhiányos betegeknél.³ Az élő attenuált VZV vakcinák beadásával hatékonyan megelőzhető mind a varicella, mind a zoster. A legtöbb VZV-vakcina a szülői Oka-ból (pOka), egy klinikai izolátumból származik, miután idegen gazdaszervezetben sorozatos passzálásokkal gyengítették.⁴ A kapott legyengített törzseket élő, legyengített VZV vakcinák előállítására használják, mivel csökkentett patogenitással képesek immunválaszt indukálni a gazdaszervezetben,⁵ de a törzsek továbbra is képesek varicella- és zoster-szerű kiütéseket okozni. Az attenuált törzsek, mint például a vOka és a MAV/06, genom-összehasonlítása pOka-val azonosította azokat a feltételezett genomi régiókat, amelyek felelősek lehetnek a virulenciáért és immunogenitásáért.^{6,7} A 62-es nyílt leolvasási keretről (ORF) ismeretes, hogy elengedhetetlen a vírus replikációjához és terjedéséhez.⁸ Mivel a genetikai variánsok felhalmozódnak az ORF 62-ben az attenuáció során, a régió belüli egynukleotidos polimorfizmusok (SNP-k) fontos indikátorok a VZV vakcinák attenuációs szintjének meghatározásához.^{6,9}

Ebben a vizsgálatban a kereskedelmi forgalomban lévő VZV vakcinák (Barycela, Varilrix, VariVax és SKY Varicella) teljes genomját elemezték a vad típusú (WT) Dumas és a pOka törzséhez képest, hogy a szekvencia alapján következtessenek az attenuáció szintjére. hasonlóság. A Barycela és a SKY Varicella új VZV vakcinák, amelyek gyengülési szintje ismeretlen. Az új vakcinák biztonságosságát úgy lehet értékelni, hogy összehasonlítják a széles körben használt varicella vakcinákkal, mint például a VariVax és a Varilrix, amelyek ismert gyengítési szintjei és immunogenitása, így kiválasztható a négy vakcina ebben a vizsgálatban.¹⁰ Négy vakcina legyengített törzsét klinikai izolátumokból fejlesztették ki humán és tengerimalac sejtvonalakon végzett sorozatos passzálás útján.¹¹⁻¹³ Az átoltások száma azonban különbözik a vakcinatörzsek között, és az átoltási szintek rejtettek,¹⁴ ami azt jelzi, hogy a genomiális összehasonlítás hatékony módszer a vakcina vírus gyengülésének értékelésére. E négy vakcina immunogenitását illetően a SKY Varicella magasabb szerokonverziós arányt mutatott, mint a VariVax,¹⁵ a Barycela és a Varilrix pedig kevésbé volt immunogén, mint a VariVax.^{10,16} Az immunogenitás relatív mértéke valószínűleg nem korrelál az attenuáció szintjével a genomikai összehasonlítás alapján ebben a vizsgálatban.

Átfogó genomikai elemzések genomiális különbségeket tártak fel a négy VZV-vakcina között, és genomikai bizonyítékot szolgáltatottak az attenuációra a variánsok gyakorisága (VF) szerint genomszintű skálán, valamint az attenuációhoz kapcsolódó specifikus genetikai pozíciókon belül. A jelenlegi jelentés hasznos lehet a fokozott biztonságú és immunogenitású VZV-vakcinák megfelelő használatában.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1 A vírus DNS tisztítása és mennyiségi meghatározása

[< Vissza](#)

vásároltak. A Barycela a MAV/06 vakcinából, míg a többi a vOka-ból származik. A vírus DNS-t a liofilizált VZV vakcinákból a GeneAll® Exgene™ Viral DNS/RNS prep kit (Gene All Biotechnology) segítségével tisztítottuk a gyártó utasításai szerint. A DNS-koncentrációt DeNovix dsDNA High Sensitivity Evaluation kit és DS-11 FX spektrofotométer (DeNovix Inc.) segítségével mértük. [A DNS-koncentrációkat és a vakcinák egyéb részleteit az S1 táblázat tartalmazza](#) . A vakcina DNS tisztaságát 0,8%-os agaróz gélelektroforézissel ellenőriztük ([S1. ábra](#)).

A VZV DNS és az emberi DNS arányának mérésére kvantitatív valós idejű PCR-t végeztünk a QGreenBlue Master Mix (CellSafe) és a StepOnePlus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) segítségével. A VZV (ORF 4) és a humán (gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz [GAPDH]) DNS-re specifikus primerek a következők voltak: VZV, 5'-ATGTCGGTACAACATCAACT-3' (előre); 5'-CGATTTTCCAAGAGAGACGC-3' (fordított); GAPDH, 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3' (előre); 5'-CATGAGTCCTCCACGATACCAA-3' (fordított).

2.2 Teljes genom szekvenálás

A következő generációs szekvenáló (NGS) könyvtárat a vakcina DNS teljes genomjának szekvenálására a Nextera XT DNS Library Preparation Kit (Illumina) segítségével állítottuk elő, majd az Illumina NovaSeq 6000 platformon szekvenáltuk. A könyvtárépítést és a teljes genom szekvenálást a MacroGen végezte, és mintánként átlagosan 7,1 gigabázis páros végű szekvenálási adatokat generáltunk.

2.3 Összehasonlító genomikai elemzés

Először a leolvasásokat a humán referencia genomhoz (hg38) igazítottuk BWA (v0.7.17) ¹⁷ segítségével , és a leképezetlen leolvasásokat SAMtools (v1.16.1) segítségével szűrtük. ¹⁸ nem humán leolvasást vetettünk alá, hogy a VZV referenciagenomokhoz igazodjanak: Dumas (NC_001348), pOka (AB097933), vOka (AB097932) és MAV/06 (JF306641). A SAMtools segítségével létrehozták a SAM/BAM fájlokat és a halomfájlokat. Az eredményül kapott pileup fájlokat a VF-ek megszámlálására használták egy egyedi Python-szkript segítségével ([S2](#) és [S3](#) táblázatok). A VZV genomokra leképezett leolvasások közül csak megfelelően párosított leolvasásokat használtak a variánsok hívására. Az egyes vakcináknál a variánshívást a bcftools v1.16 ¹⁹ segítségével végeztük el a következő paraméterekkel: alapminőség ≥ 30 és maximális leolvasási mélység = 20 000. A változatokat az SnpEff v4.3, ²⁰ használatával annotáltuk , és a négy vakcina gyakori mutációit azonosítottuk. bedtools v2.30. ²¹ A pOka genomon lévő SNP-k megjelenítéséhez a genomot átfogóan annotáltuk egy nemrégiben megjelent Dumas-annotációnak megfelelően, beleértve az ismétlődő régiókat, a replikációs origót és a látenciával összefüggő transzkriptumot (VLT). ²² A Dumas-ból pOka-ba való koordinátakonverziót a LiftOver eszközzel érte el. ²³

< Vissza

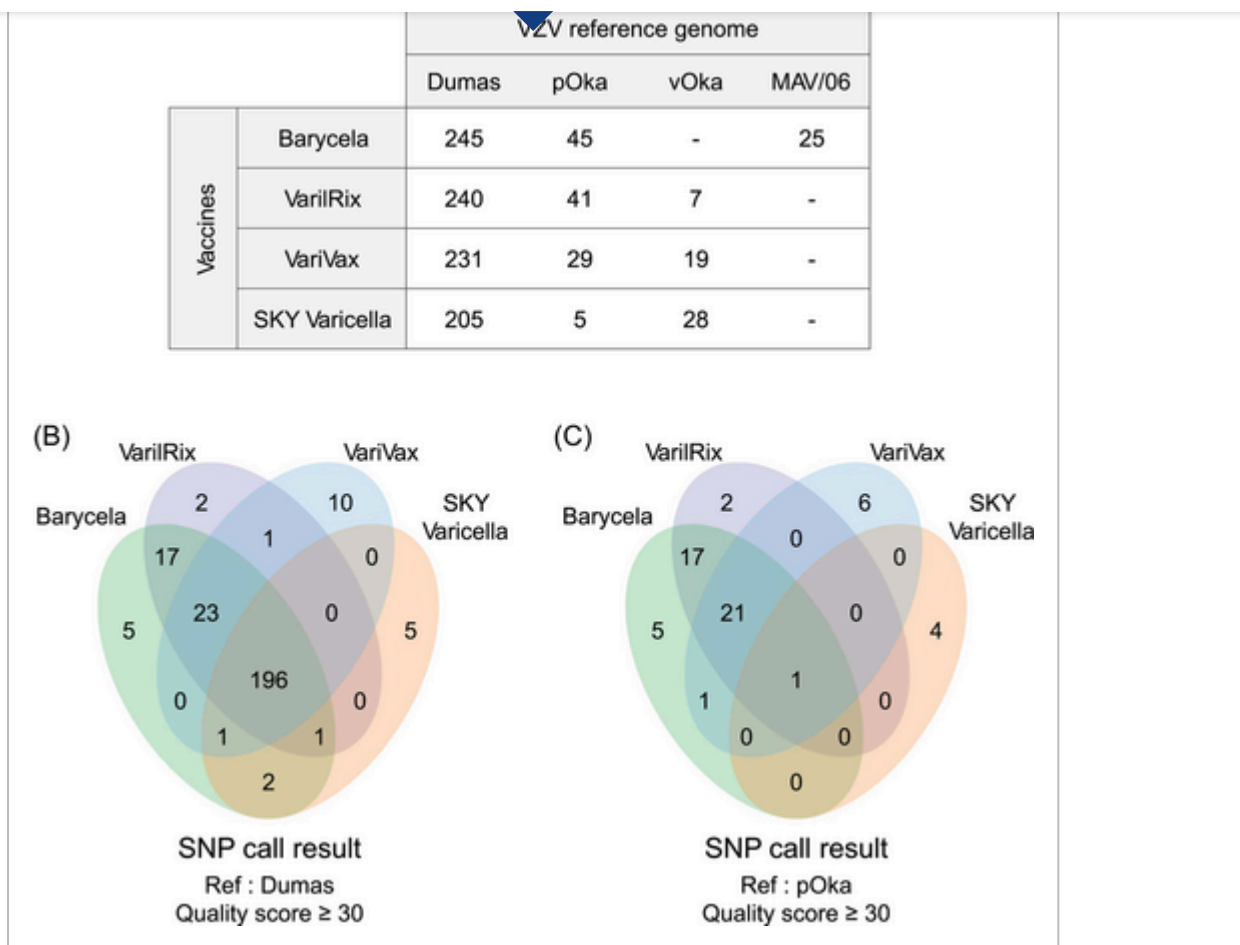
Minden vakcinához konszenzus genom szekvenciákat állítottunk elő FASTA formátumban bcftools segítségével. A MAFFT (v7.511) ^{24-et} a VZV-törzsek és vakcinák teljes genomjának többszörös szekvencia-illesztésére használták. A filogenetikai fát a Neighbor-Net módszerrel állítottuk össze a SplitsTree-ben (v4.18.3). ²⁵

3 EREDMÉNY

Mivel a VZV vakcinákat humán sejtvonalakból állítják elő, az emberi genom szennyeződése elkerülhetetlen a megtisztított vakcina DNS-ben. A vírus-DNS szekvencia-lefedettségének növelése érdekében a vakcina DNS-ét mélyen szekvenálták, ami a teljes VZV genom 4000-13 000-szeres lefedettségét eredményezte (**S4** táblázat). Ezen túlmenően, amikor a vírus DNS-ének relatív mennyiségét az emberi DNS-hez viszonyítottuk kvantitatív PCR és NGS-térképezési sebesség segítségével, mindkét technika erősen korrelált eredményeket mutatott (**S2** ábra). Összességében jó minőségű adatokat állítottunk elő a következő kvantifikáció és a VZV genom átfogó vizsgálatának magas lefedettsége tekintetében.

Az SNP-k NGS-leolvasásokból történő azonosításához a WT (Dumas) genomot referenciaként használva variánshívást végeztünk, és vakcinánként kevesebb mint 250 SNP-t azonosítottunk (**1A.** ábra). Figyelembe véve a VZV genom méretét (körülbelül 125 kb) és a replikációs ciklusokat a termelésig, a DNS-szekvenciák nagyon konzerváltak voltak a vakcinatörzsekben, genom-széles skálán. A Dumas genommal szembeni SNP-k átfedési elemzése feltárta, hogy 196 SNP-t osztottak meg a négy vakcinában (**1B.** ábra). Közülük 195 már jelen volt a pOka genomban (**1C.** ábra és **S5.** táblázat), ami azt jelzi, hogy a variánsok a Dumas-ból származó szülői törzsek létrejötté során keletkeztek, függetlenül az attenuációtól. Az attenuáció során bekövetkező genomiális változások pontos vizsgálata érdekében a vakcina genomjait újra elemeztük, összehasonlítva azokat a szülői (pOka) és az attenuált (vOka, MAV/06) törzsekkel. Ezt követően a variánsok többsége mind a négy vakcinában eltűnt, amikor az attenuált törzsek ellen variánsokat hívtak, ami megerősítette, hogy a vakcinák kronológiailag és genomiálisan proximálisak voltak az attenuált törzsekhez, és távolabbiak Dumas-tól. Nevezetesen, a SKY Varicella-nak kevesebb genetikai változata volt, mint a pOka-nak, míg a többi vakcinának kevesebb genetikai változata volt, ha egy megfelelő legyengített törzset használtak referenciaként (**1A.** ábra). Az eredmények arra utaltak, hogy a variánsok száma alapján a SKY Varicella rendelkezik a legtöbb pOka-szerű genotípussal.

< Vissza



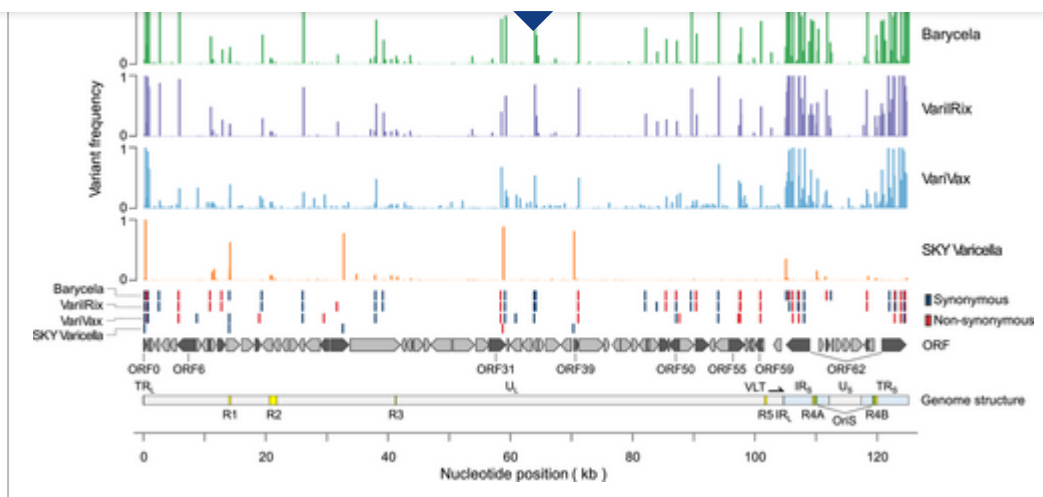
1.ábra

[Megnyitás az ábranézegetőben](#) | [PowerPoint](#)

Statistikailag szignifikáns SNP-k azonosítása és összehasonlítása a négy vakcinában. (A) Az SNP-k száma a VZV törzsek referencia (Ref) genomjához viszonyítva. (B) Venn diagramok, amelyek a megosztott SNP-ket mutatják a vakcinák között a WT (Dumas) és a szülői (pOka) törzsekhez képest. SNP, egy nukleotid polimorfizmus.

Ezt követően a VF-eket kiszámítottuk a vakcinák genomjának minden bázispozíciójában, hogy megjelenítsük a változatok tájképét a pOka-val összehasonlítva. A VF-et a nem referenciabázisok arányaként határoztuk meg egy pozícióban, és a reprezentáció pontosabb és átfogóbb volt, mint a statisztikai variánshívás, mivel a hívott változatokat bináris módon (ref/alt) számoltuk tetszőleges küszöbértékkel. Amikor a vakcina genomjait a pOka genomhoz igazították, a Barycela, VarilRix és VariVax magas VF-jei nyilvánvalóak voltak a SKY Varicella-hoz viszonyított genomskálán (2. ábra). Ezenkívül a magas VF-ek a csillapítással összefüggő ORF-eken belül koncentráálódtak, mint például a 0, 31 és 62 ORF, a Barycela, VarilRix és VariVax esetében. A variánshívás-analízis eredményeivel összhangban a SKY Varicella tartalmazta a legalacsonyabb VF-eket globálisan és SNP-ket, különösen az ORF 62-n belül, így genetikai hasonlóságot jelent a pOka-val.

< Vissza



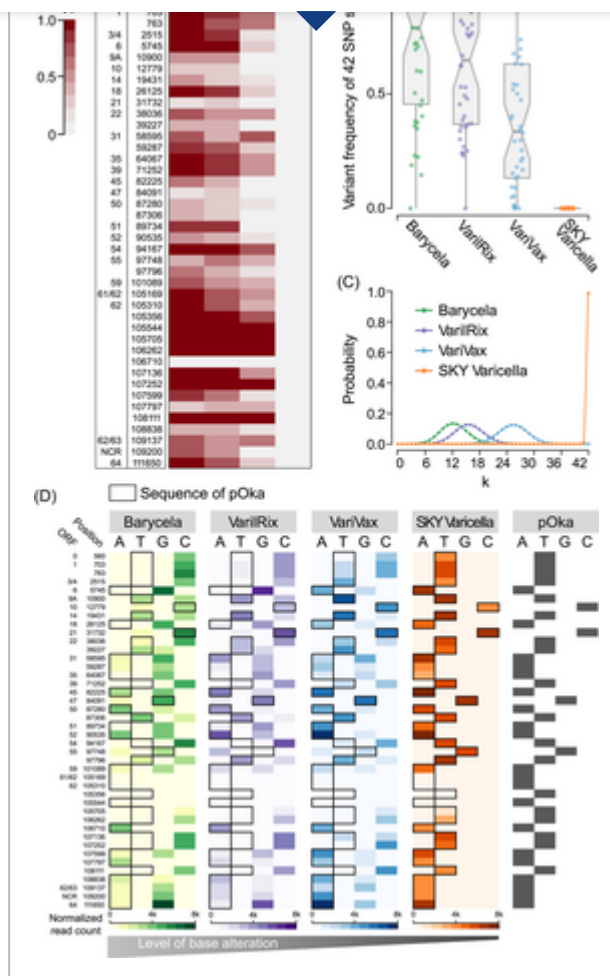
2. ábra

[Megnyitás az ábranézegetőben](#) | [↓ PowerPoint](#)

A variánsok gyakoriságának tájképe a vakcinák genomjában. A vakcina szekvenálási adatait a pOka genomra térképezték fel. A bázisokat minden pozícióban megszámoztuk, és a variánsfrekvenciát (VF) a következő módon számítottuk ki: $VF = (\text{nem referenciabázisú leolvasások száma}) / (\text{az olvasások teljes száma az alaphelyzetben})$. Az X és Y tengely a genomai pozíciót és a VF-et jelenti, és a nem szinonim SNP-eket tartalmazó ORF-ek kiemelve vannak. Rövidítések: Terminál hosszú ismétlés (TR_L); Terminál rövid ismétlés (TR_S); Egyedi hosszú régió (U_L); Egyedi rövid régió (U_S); Belső hosszú ismétlés (IR_L); Belső rövid ismétlés (IR_S); Ismétlési régió (R); A DNS-replikáció eredete (OriS); VZV késleltetéssel összefüggő átírat (VLT).

Az attenuáció-specifikus genotípusokra való további összpontosítás érdekében korábbi tanulmányokat vizsgáltuk meg, és 42 SNP-t választottak ki, amelyek a VZV vakcina gyengülésével kapcsolatosak ([S6](#) táblázat). ^{8, 26} Nevezetesen, négy vakcinának volt külön VF aláírása a 42 vakcina-specifikus SNP-n ([3A](#). ábra). Ezenkívül a VF-ek hőtérképe azt mutatta, hogy a SKY Varicella kivételével az ORF 0 és 62 volt a legtöbb SNP-ben és magas VF-ben a vakcinákban, amint [arról korábban beszámoltunk](#). Ezenkívül a 42 SNP VF-jei konzisztensek voltak a különböző tételszámok között, ami azt mutatja, hogy a tételenkénti eltérés elhanyagolható volt ([S3](#) ábra). A vakcinák közötti VF-ek statisztikai különbségeinek összehasonlításához a VF-ek dobozdiagramjait vizualizáltuk, és a mediánok fokozatosan csökkennek a következő sorrendben: Barycela, VarilRix, VariVax és SKY Varicella ([3B](#). ábra). Az átfogóbb gyengítéssel kapcsolatos SNP-k független megerősítése érdekében az elemzéseket megismételték 137 SNP-vel, amelyekről Depledge et al. ¹⁴ ([S4](#) ábra). A 0,1-nél kisebb VF-ekkel rendelkező SNP-k eltávolítása után mind a négy vakcinában, a fennmaradó 54 SNP elemzése validálta a VF-ek fokozatos csökkenését, a legalacsonyabb VF-értékekkel a SKY Varicella esetében. Mivel 40 SNP volt közös az 54 SNP és az eredeti 42 SNP között, az eredeti 42 SNP-t választottuk ki a vakcina gyengülésének értékelésére a következő elemzésekben.

< Vissza



3. ábra

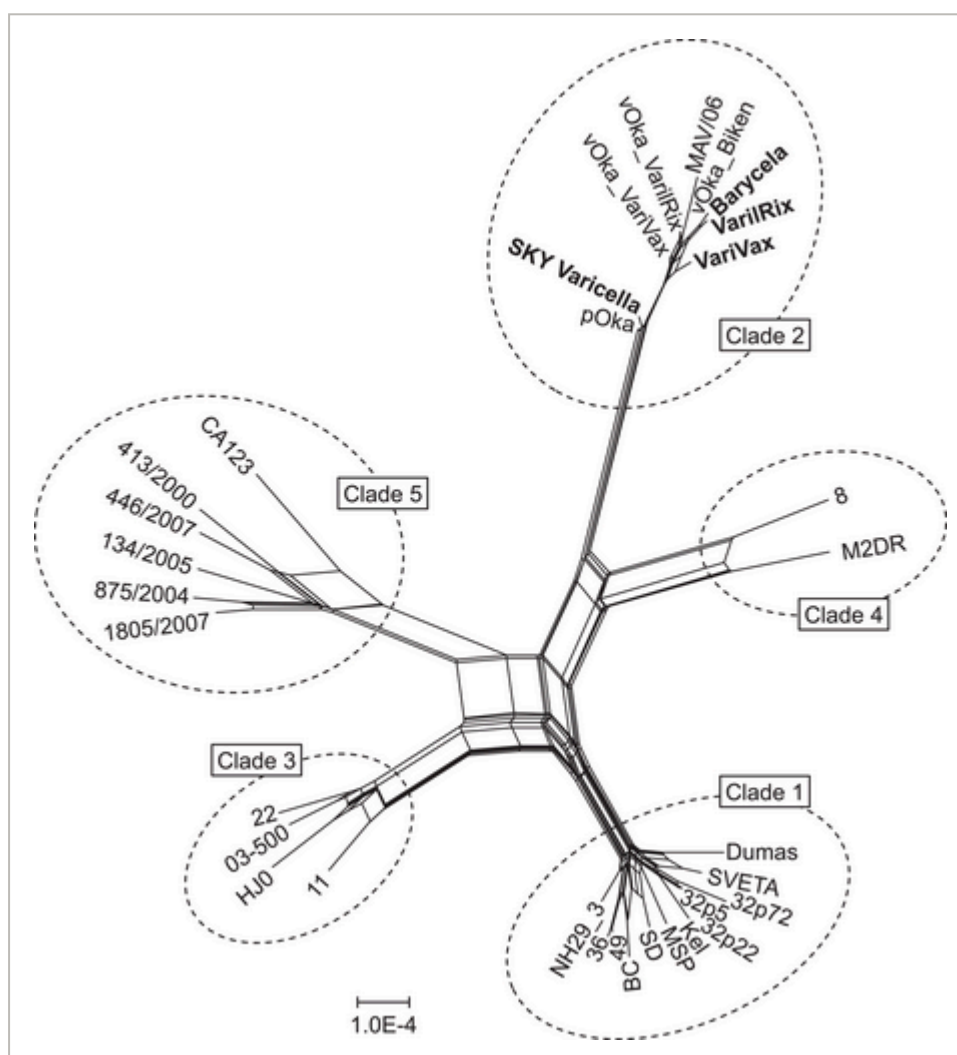
Megnyitás az ábranézegetőben | [PowerPoint](#)

Különleges szintű genetikai variáció 42 SNP-nél a vakcinák között. (A) Hőtérkép, amely 42 attenuációval összefüggő SNP VF-jét mutatja vakcinatörzsekben. (B) Box plot 42 SNP hely VF-jéhez. A pont egy SNP-t jelöl. (C) A k számú szülői szekvencia valószínűségét statisztikailag becsültük binomiális eloszlás segítségével ($k = 0, 1, 2, \dots, 42$). [A szülői szekvenciák arányát 42 SNP-nél az S7 táblázat tartalmazza](#). (D) Az alapösszetétel fokozatos változásainak megjelenítése a pOka genotípus tekintetében. SNP, egyetlen nukleotid polimorfizmus; VF, variáns frekvencia.

A szülői szekvencia 42 SNP-nél fennálló aránya alapján ([S7 táblázat](#)) a binomiális eloszlást használtuk a k számú szülői szekvencia maximális valószínűségének kiszámításához, és a $k_{\text{Barycela}} = 12$ ($p = 13,4\%$), $k_{\text{Varilrix}} = 15$ értéknél figyelték meg. ($p = 12,7\%$), $k_{\text{VariVax}} = 26$ ($p = 12,5\%$) és $k_{\text{SKY Varicella}} = 42$ ($p = 98,9\%$) ([3C. ábra](#)). Az egyértékű VF per SNP-n túl minden bázis összetétel arányát vizualizáltuk, hogy alaposan megvizsgáljuk a 42 SNP szubsztituált bázisait a pOka genotípushoz viszonyítva ([3D. ábra](#)). A jobb szélső pOka genotípus térképét használtuk keretként az attenuáció vizuális kiértékeléséhez a vakcinák egyedi hőtérképeinek átfedésével ([3D. ábra](#)). Összességében a vakcinatörzsek közelsége a pOka-szerű genotípushoz a 42 SNP esetében a SKY Varicella, VariVax, Varilrix és Barycela

< Vissza

A vakcinák és a nyilvánosan elérhető, változatos VZV törzsekkel való filogenetikai rokonság vizsgálatára filogenetikai fát állítottunk fel a vakcinatörzsek teljes genomszekvenciájának felhasználásával (4. ábra). **A vakcinák konszenzus genomjait a pOka-val történő leolvasási illesztés alapján hoztuk létre, amelyben az eredeti szekvenciákat az 1. ábrán látható változatokkal helyettesítették .** A Dumas bekerült az 1. kládba, és a többi törzset a megfelelő kládokhoz rendeltük, amint azt közölték. ²⁷ Ahogy az várható volt , a pOka-ból származó vOka bekerült a 2. kládba, és a MAV / 06, amely genetikailag hasonló az Oka törzshez, szintén a 2. kládba került besorolásra . genomi hasonlóságot mutat az eredeti törzsekkel. Végül, a vakcinatörzsek közötti evolúciós távolságok korrelálnak a genetikai változások mértékével, amelyek növelhetik a gyengülés mértékét.



4. ábra

Megnyitás az ábranézegetőben | [PowerPoint](#)

Filogenetikai elemzés a WT és a vakcinatörzsek közötti genomikus távolság becslésére. A VZV törzsek teljes genomjának filogenetikai hálózatát, beleértve a vakcinákat is, a Neighbor-Net módszerrel építettük fel a SplitsTree-ben. A skálásáv a

[< Vissza](#)

4. MEGBESZÉLÉS

A vírusgyengülés értékelése elengedhetetlen az élő attenuált vakcinák beadásával kapcsolatos aggodalmak enyhítéséhez. Az attenuációt vizsgáló különféle vizsgálatok közül a teljes genom vagy a gyengítés-specifikus régiók genotipizálása szilárd bizonyítékot szolgáltathat az attenuáció mennyiségi szintjére a vakcinatörzsek azonosításának nyomon követésével.⁹ Ebben a tanulmányban nagy áteresztőképességű szekvenálási technológiát alkalmaztak a VZV genom mély lefedettségének eléréséhez négy kereskedelmi forgalomban lévő vakcinában. A vakcinákban található genetikai variánsokat azonosították és összehasonlították a Dumas, pOka, vOka és MAV/06 referencia genomjaival, lehetővé téve a változatok eredetének nyomon követését. Így a funkcionálisan annotált törzsek és a vakcinatörzsek genomszintű összehasonlítása hatékony módszer lehet a vakcinatörzsek fenotípusára való következtetéshez.

A vírustörzseket az evolúciós szelekciós folyamat gyengíti a törzsek sorozatos passzálása révén bizonyos szelektív nyomások alatt, amelyek a mutációkat előszeretettel halmozzák fel a hotspotokban, például az ORF 62-ben és a jelen VZV-vizsgálat 42 SNP-jében.⁶⁻⁹ A VF-ek kiszámítása ezekben a régiókban segítette a nagyszabású genomikai adatok értelmezését azáltal, hogy leszűkítette a gyengítéssel kapcsolatos genomi pozíciókat. Meglepő módon ezekben a régiókban a SKY Varicella volt a legkevesebb mutáció, és genetikailag hasonló volt a szülői törzshez, ellentétben a többi vakcinával. A szülői szekvenciák nagy aránya a mutációra érzékeny területen a vakcinatörzs gyenge legyengítésére utalhat. Mindazonáltal az attenuáció szintjét a genomi hasonlóság alapján értékelték a vírustörzsek biológiai vagy patológiai vizsgálata nélkül; így a kísérleti bizonyítékok nem voltak elegendőek a klinikai gyengülés meghatározásához ebben a jelentésben. Ezért klinikai értékelésre van szükség a vakcinák genomikai értékelésének validálásához.

A vakcinák eltérő mutációs szintjei eltérő hatékonyságukat és biztonságosságukat jelezhetik. Emiatt óvatosság szükséges a kevésbé legyengített vakcina többadagos beadásakor immunológiailag gyenge egyének számára. Ezért az attenuációs szintek nagy áteresztőképességű szekvenálással történő kvantitatív mérésére lehet szükség az élő attenuált VZV vakcinák biztonságának és hatékonyságának biztosítása érdekében.

SZERZŐI HOZZÁJÁRULÁSOK

Jaewoo Lee : megtervezte a tanulmányt és biztosította a vakcinákat. **Jae Yun Moon** : elvégezte a kísérleteket. **Jae Yun Moon, Jina Seo és Daechan Park** : elemezte és értelmezte az adatokat. **Jae Yun Moon és Daechan Park** : írta a kéziratot. **Daechan Park** : felügyelte a genomi elemzést. Minden szerző átnézte a kéziratot, és beleegyezett a kézirat végleges változatának közzétételébe.

[< Vissza](#)

Ezt a tanulmányt a Koreai Nemzeti Kutatási Alapítvány (NRF) támogatta, amelyet a Tudományos és IKT-minisztérium (MSIT) finanszírozott [NRF-2021R1C1C2093948, NRF-2022M3A9H5070140 és NRF-2020M1A2A2080847], az Oktatási Minisztérium és részben a GC Biopharma is támogatja. Köszönjük Hanbi Parknak, Jeongyun Jeongnak és Hyerim Kimnek a technikai támogatást.

ÖSSZEFÜGGÉSRE VONATKOZÓ NYILATKOZAT

A DP laboratóriuma jelenleg a GC Biopharma támogatásában részesül, és a jelenlegi kutatást részben a GC Biopharma is támogatta. A cég azonban nem járult hozzá a kísérletek elvégzéséhez, az adatok értelmezéséhez vagy a kézirat megírásához.

Nyílt kutatás

AZ ADATOK ELÉRHETŐSÉGÉRE VONATKOZÓ NYILATKOZAT

A nyers szekvenciaadatokat a Koreai Nukleotid Archívumban (csatlakozási azonosító: PRJKA230525) és az NCBI BioProjectben (csatlakozási azonosító: PRJNA921818) helyeztük el. Az adatok nyilvánosak.

segítő információ

Fájl név	Leírás
jmv28590-sup-0001-JMV_supplementary_information_revised_final_edit.docx 3,3 MB	Kiegészítő információk.

Kérjük, vegye figyelembe: A kiadó nem vállal felelősséget a szerzők által biztosított támogató információk tartalmáért vagy működéséért. Minden kérdéssel (a hiányzó tartalom kivételével) a cikk megfelelő szerzőjéhez kell fordulni.

IRODALOM

[< Vissza](#)[1.10010. doi:10.1007/mv.2019.10](#)[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

2 Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2014; 12(3): 197-210. [doi:10.1038/nrmicro3215](#)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

3 Moodley A, Swanson J, Grose C, Bonthius DJ. Severe herpes Zoster following varicella vaccination in immunocompetent young children. *J Child Neurol.* 2019; 34(4): 184-188. [doi:10.1177/0883073818821498](#)

[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

4 Sadaoka T, Mori Y. Vaccine development for varicella-zoster virus. *Adv Exp Med Biol.* 2018; 1045: 123-142. [doi:10.1007/978-981-10-7230-7_7](#)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

5 Wang W, Pan D, Fu W, et al. Development of a skin- and neuro-attenuated live vaccine for varicella. *Nat Commun.* 2022; 13(1): 824. [doi:10.1038/s41467-022-28329-1](#)

[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

6 Wu Q, Rivaller P, Xu S, Xu W. Comparison of the whole-genome sequence of an Oka Varicella Vaccine from China with other Oka vaccine strains reveals sites putatively critical for vaccine efficacy. *J Virol.* 2019; 93(9):e02281-18. [doi:10.1128/jvi.02281-18](#)

[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

7 Jeon JS, Won YH, Kim IK, et al. Analysis of single nucleotide polymorphism among varicella-zoster virus and identification of vaccine-specific sites. *Virology.* 2016; 496: 277-286. [doi:10.1016/j.virol.2016.06.017](#)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

8 Gomi Y, Sunamachi H, Mori Y, Nagaike K, Takahashi M, Yamanishi K. Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol.* 2002; 76(22): 11447-11459. [doi:10.1128/jvi.76.22.11447-11459.2002](#)

[< Vissza](#)

9 Schmid DS, Jumaan AO. Impact of varicella vaccine on varicella-zoster virus dynamics. *Clin Microbiol Rev.* 2010; **23**(1): 202-217. doi:10.1128/cmr.00031-09

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

10 Lau Y-L, Vessey SJR, Chan ISF, et al. A comparison of safety, tolerability and immunogenicity of Oka/Merck varicella vaccine and VARILRIX? in healthy children. *Vaccine.* 2002; **20**(23-24): 2942-2949. doi:10.1016/s0264-410x(02)00245-1

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

11 Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T, Isomura S. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *The Lancet.* 1974; **304**(7892): 1288-1290. doi:10.1016/s0140-6736(74)90144-5

[Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

12 D'hondt E, Berge E, Colinet G, Duchene M, Peetermans J. Production and quality control of the Oka-strain live varicella vaccine. *Postgrad Med J.* 1985; **61 Suppl 4**(Suppl 4): 53-56.

[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

13 Hwang KK, Chun BH, Park HS, Park SY, Kim KH, Moon HM. Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea. Marker Test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea. *J Bacteriol Virol.* 1992; **22**(2): 105-109.

[Google Scholar](#)

14 Depledge DP, Yamanishi K, Gomi Y, Gershon AA, Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella-zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J Virol.* 2016; **90**(19): 8698-8704. doi:10.1128/jvi.00998-16

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

15 Organization WH. Prequalification (<https://extranet.who.int/pqweb/content/skyvaricella-inj>).

[Google Scholar](#)

[< Vissza](#)

active-controlled phase III study. *Vaccine*. 2021; 39(12): 1758-1764.

[doi:10.1016/j.vaccine.2021.02.013](https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2021.02.013)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

17 Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009; 25(14): 1754-1760. [doi:10.1093/bioinformatics/btp324](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

18 Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009; 25(16): 2078-2079. [doi:10.1093/bioinformatics/btp352](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

19 Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011; 27(21): 2987-2993. [doi:10.1093/bioinformatics/btr509](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr509)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

20 Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012; 6(2): 80-92. [doi:10.4161/fly.19695](https://doi.org/10.4161/fly.19695)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

21 Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010; 26(6): 841-842. [doi:10.1093/bioinformatics/btq033](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033)

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

22 Braspenning SE, Sadaoka T, Breuer J, Verjans GMGM, Ouwendijk WJD, Depledge DP. Decoding the architecture of the varicella-zoster virus transcriptome. *mBio*. 2020; 11(5):e01568-20. [doi:10.1128/mBio.01568-20](https://doi.org/10.1128/mBio.01568-20)

[PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

23 Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ. The UCSC genome browser and associated tools. *Brief Bioinform*. 2013; 14(2): 144-161. [doi:10.1093/bib/bbs038](https://doi.org/10.1093/bib/bbs038)

[< Vissza](#)

24 Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol.* 2013; **30**(4): 772-780. doi:10.1093/molbev/mst010

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

25 Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* 2006; **23**(2): 254-267. doi:10.1093/molbev/msj030

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

26 Loparev VN, Rubtcova E, Seward JF, Levin MJ, Schmid DS. DNA sequence variability in isolates recovered from patients with postvaccination rash or herpes zoster caused by Oka varicella vaccine. *J Infect Dis.* 2007; **195**(4): 502-510. doi:10.1086/510532

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

27 Kim MH, Jeon JS, Kim IK, et al. Characterization and phylogenetic analysis of varicella-zoster virus strains isolated from Korean patients. *J Microbiol.* 2017; **55**(8): 665-672. doi:10.1007/s12275-017-7171-3

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

28 Shin D, Shin Y, Kim E, Nam H, Nan H, Lee J. Immunological characteristics of MAV/06 strain of varicella-zoster virus vaccine in an animal model. *BMC Immunol.* 2022; **23**(1): 27. doi:10.1186/s12865-022-00503-6

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

29 Zell R, Taudien S, Pfaff F, Wutzler P, Platzer M, Sauerbrei A. Sequencing of 21 varicella-zoster virus genomes reveals two novel genotypes and evidence of recombination. *J Virol.* 2012; **86**(3): 1608-1622. doi:10.1128/jvi.06233-11

[CAS](#) | [PubMed](#) | [Web of Science®](#) | [Google Scholar](#)

Irodalomra hivatkozva



PDF letöltése

[< Vissza](#)

A WILEY-ONLINE LIBRARY-RŐL

[Adatvédelmi irányelvek](#)[Használati feltételek](#)[A cookie-król](#)[Cookie-k kezelése](#)[Megközelíthetőség](#)[A Wiley Research DE&I nyilatkozata és közzétételi irányelvei](#)[A világ hozzáféréseinek fejlesztése](#)

SÚGÓ ÉS TÁMOGATÁS

[Lépjen kapcsolatba velünk](#)[Képzés és támogatás](#)[DMCA és a kalózkodás jelentése](#)

LEHETŐSÉGEK

[Előfizetéses ügynökök](#)[Hirdetők és vállalati partnerek](#)

KAPCSOLÓDJ WILEY-VEL

[A Wiley hálózat](#)[Wiley Sajtószoba](#)

Copyright © 1999-2024 John Wiley & Sons, Inc. vagy kapcsolódó vállalatok. Minden jog fenntartva, beleértve a szöveg- és adatbányászati jogait, valamint a mesterséges technológiák vagy hasonló technológiák képzsét.

Assessment of attenuation of varicella-zoster virus vaccines based on genomic comparison

Jae Yun Moon¹ | Jina Seo¹ | Jaewoo Lee² | Daechan Park^{1,3} 

¹Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon, South Korea

²Division of R&D Corporate Development, GC Biopharma, Yongin, South Korea

³Department of Biological Sciences, Ajou University, Suwon, South Korea

Correspondence

Daechan Park, Department of Molecular Science and Technology, Ajou University, Suwon 16499, South Korea.

Email: dpark@ajou.ac.kr

Jaewoo Lee, Division of R&D Corporate Development, GC Biopharma, Yongin 16924, South Korea.

Email: jaewoolee@gccorp.com

Funding information

GC Biopharma; National Research Foundation of Korea

Abstract

Live attenuated varicella-zoster virus (VZV) vaccines are used to prevent chickenpox and shingles. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) that occur during the attenuation of parental strains are critical indicators of vaccine safety. To assess the attenuation of commercial VZV vaccines, genetic variants were comprehensively examined through high-throughput sequencing of viral DNA isolated from four VZV vaccines (Barycela, Varilrix, VariVax, and SKY Varicella). Whole-genome comparison of the four vaccines with the wild-type strain (Dumas) revealed that the sequences are highly conserved on a genome-wide scale. Among the 196 common variants across the four vaccines, 195 were already present in the genome of the parental strain (pOka), indicating that the variants occurred during the generation of the parental strain from the Dumas strain. Compared to the pOka genome, the vaccines exhibited distinct variant frequencies on a genome-wide and within an attenuation-related open reading frame. In particular, attenuation-associated 42 SNPs showed that Barycela, Varilrix, VariVax, and SKY Varicella are in ascending order regarding similarity with pOka-like genotypes, which in turn, might provide genomic evidence for the levels of attenuation. Finally, the phylogenetic network analysis demonstrated that genetic distances from the parental strain correlated with the attenuation levels of the vaccines.

KEYWORDS

attenuation, genomic comparison, single-nucleotide polymorphism, varicella-zoster virus, whole-genome sequencing

1 | INTRODUCTION

Varicella-zoster virus (VZV) is a human herpesvirus that causes chickenpox (varicella), which is characterized by fever and generalized rash. Subsequent to primary infection, VZV can establish lifelong latency in the sensory ganglia, and its reactivation results in shingles (herpes zoster).¹ In general, varicella is a self-limiting disease, although it occasionally develops serious and lethal complications in

infants and immunocompromised patients.¹⁻³ Administration of live-attenuated VZV vaccines can effectively prevent both varicella and zoster. Most VZV vaccines have originated from parental Oka (pOka), a clinical isolate, after attenuation by serial passages in a foreign host.⁴ The resulting attenuated strains are used for producing live-attenuated VZV vaccines because they can induce an immune response in the host with reduced pathogenicity,⁵ but the strains are still able to cause varicella and zoster-like rashes. Genome

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

© 2023 The Authors. *Journal of Medical Virology* published by Wiley Periodicals LLC.

comparison of attenuated strains, such as vOka and MAV/06, with pOka identified the putative genomic regions that might be responsible for its virulence and immunogenicity.^{6,7} Open reading frame (ORF) 62 is known to be essential for viral replication and spreading.⁸ Since genetic variants are accumulated in ORF 62 during attenuation, single nucleotide polymorphisms (SNPs) within the region are important indicators for determining the levels of attenuation of VZV vaccines.^{6,9}

In this study, the whole genomes of commercial VZV vaccines (Barycela, VarilRix, VariVax, and SKY Varicella) were analyzed relative to those of the wild-type (WT) Dumas strain and the pOka strain to infer the levels of attenuation based on sequence similarity. Barycela and SKY Varicella are new VZV vaccines whose attenuation levels have unknown. The safety of new vaccines can be evaluated by comparing to widely used varicella vaccines, such as VariVax and VarilRix, with known attenuation levels and immunogenicity, thereby choosing the four vaccines in this study.¹⁰ The attenuated strains of four vaccines were developed from clinical isolates by serial passaging in human and guinea pig cell lines.^{11–13} However, the numbers of passage differ between vaccine strains, and the passage levels are concealed,¹⁴ indicating that genomic comparison is an effective way to assess the attenuations of vaccine virus. Regarding immunogenicity of these four vaccines, SKY Varicella showed higher seroconversion rate than VariVax,¹⁵ and Barycela and VarilRix were less immunogenic than VariVax.^{10,16} The relative extent of immunogenicity is likely anti-correlated with the levels of attenuation based on genomic comparison in this study.

Comprehensive genomic analyses revealed genomic differences across the four VZV vaccines and provided genomic evidence of attenuation according to variant frequencies (VFs) on a genome-wide scale, as well as within specific genetic positions associated with attenuation. The current report could be useful in the proper use of VZV vaccines with improved safety and immunogenicity.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Purification and quantification of viral DNA

Four commercially available VZV vaccines, namely Barycela (GC Biopharma), VarilRix (GSK), VariVax (MSD), and SKY Varicella (SK Bioscience), were purchased. Barycela originated from the MAV/06 vaccine, while the others originated from vOka. Viral DNA was purified from the lyophilized VZV vaccines using the GeneAid[®] Exgene[™] Viral DNA/RNA prep kit (Gene All Biotechnology), according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was measured using a DeNovix dsDNA High Sensitivity Evaluation kit and a DS-11 FX Spectrophotometer (DeNovix Inc.). The DNA concentrations and other details of the vaccines are presented in Table S1. The purity of the vaccine DNA was verified using 0.8% agarose gel electrophoresis (Figure S1).

To measure the ratio of VZV DNA to human DNA, quantitative real-time PCR was conducted using the QGreenBlue Master Mix (CellSafe)

and StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Primers specific to VZV (ORF 4) and human (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase [GAPDH]) DNA were as follows: VZV, 5'-ATGTCCTGACAACATCAACT-3' (forward); 5'-CGATTTTCCAAGAGACGC-3' (reverse); GAPDH, 5'-CGAGATCCCTCCAAAATCAA-3' (forward); 5'-CATGAGTCCTCCACGATACCAA-3' (reverse).

2.2 | Whole-genome sequencing

A next-generation sequencing (NGS) library for whole-genome sequencing of the vaccine DNA was constructed using the Nextera XT DNA Library Preparation Kit (Illumina) and then sequenced on the Illumina NovaSeq 6000 platform. Library construction and whole-genome sequencing were conducted by Macrogen, and 7.1 gigabase paired-end sequencing data were generated per sample on average.

2.3 | Comparative genomic analysis

First, the reads were aligned onto the human reference genome (hg38) using BWA (v0.7.17),¹⁷ and the unmapped reads were filtered using SAMtools (v1.16.1).¹⁸ Nonhuman reads were then subjected to align onto the VZV reference genomes: Dumas (NC_001348), pOka (AB097933), vOka (AB097932), and MAV/06 (JF306641). SAMtools was used to generate the SAM/BAM files and pileup files. The resulting pileup files were used to count the VFs by a custom Python script (Tables S2 and S3). Among the reads mapped onto VZV genomes, only properly paired reads were used for variant calling. Variant calling for each vaccine was performed using bcftools v1.16¹⁹ with the following parameters: base quality ≥ 30 and maximum read depth = 20 000. Variants were annotated using SnpEff v4.3,²⁰ and common mutations in the four vaccines were identified using bedtools v2.30.²¹ To visualize the SNPs on the pOka genome, the genome was comprehensively annotated according to a recent Dumas annotation, including repeat regions, origin of replication, and latency-associated transcript (VLT).²² The coordinate conversion from Dumas into pOka was achieved by the LiftOver tool.²³

2.4 | Phylogenetic analysis

Consensus genomic sequences were generated for each vaccine in FASTA format using bcftools. MAFFT (v7.511)²⁴ was used for the multiple sequence alignment of complete genomes of VZV strains and vaccines. The phylogenetic tree was constructed using the Neighbor-Net method in SplitsTree (v4.18.3).²⁵

3 | RESULTS

Since VZV vaccines are produced from human cell lines, human genome contamination is inevitable in the purified vaccine DNA. To increase sequence coverage for viral DNA, the vaccine DNA was

deep-sequenced, resulting in 4000–13 000× coverage of the whole VZV genome (Table S4). In addition, when the relative quantity of viral DNA to that of humans was compared using quantitative PCR and NGS mapping rates, both techniques showed highly correlated results (Figure S2). Overall, high-quality data were generated with respect to consistent quantification and high coverage for the comprehensive examination of the VZV genome.

To identify SNPs from NGS reads, variant calling was performed using the WT (Dumas) genome as a reference, and fewer than 250 SNPs per vaccine were identified (Figure 1A). Considering the VZV genome size (approximately 125 kb) and replication cycles until production, the DNA sequences were highly conserved across the vaccine strains on a genome-wide scale. Overlap analysis of the SNPs against the Dumas genome revealed that 196 SNPs were shared across the four vaccines (Figure 1B). Among them, 195 were already present in the pOka genome (Figure 1C and Table S5), indicating that the variants occurred during the establishment of the parental strains from Dumas, independent of attenuation. To precisely investigate the genomic changes during attenuation, the vaccine genomes were re-analyzed by comparing them to the parental (pOka) and attenuated (vOka, MAV/06) strains. Subsequently, the majority of

the variants disappeared in all four vaccines when calling variants against the attenuated strains, confirming that the vaccines were chronologically and genomically proximal to the attenuated strains and distal to Dumas. Notably, SKY Varicella had fewer genetic variants than pOka, whereas the other vaccines had fewer genetic variants when a corresponding attenuated strain was used as a reference (Figure 1A). The results suggested that SKY Varicella had the most pOka-like genotype, according to the number of variants.

Next, VFs were calculated at every base position on the genomes of the vaccines to visualize the landscape of variants compared to pOka. VF was defined as the proportion of nonreference bases at a position, and the representation was more precise and comprehensive than statistical variant calling since the variants called were counted in a binary manner (ref/alt) with an arbitrary threshold. When the vaccine genomes were aligned to the pOka genome, high VFs of Barycela, VarilRix, and VariVax were evident on a genome scale relative to SKY Varicella (Figure 2). Moreover, the high VFs were concentrated within the ORFs associated with attenuation, such as ORF 0, 31, and 62, in Barycela, VarilRix, and VariVax. Consistent with the results of the variant calling analysis, SKY Varicella contained the lowest VFs globally and SNPs,

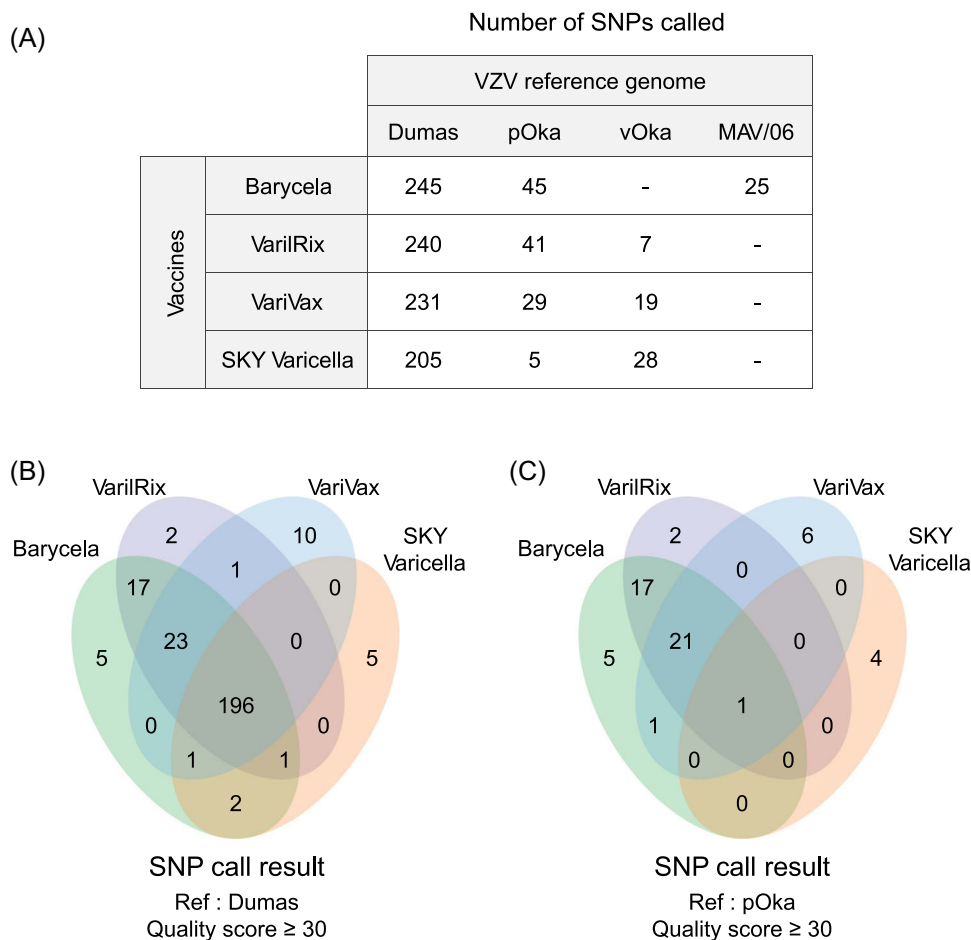


FIGURE 1 Identification and comparison of statistically significant SNPs across the four vaccines. (A) Number of SNPs with respect to the reference (Ref) genome of VZV strains. (B) Venn diagrams showing the shared SNPs among vaccines compared to the WT (Dumas) and parental (pOka) strains, respectively. SNP, single nucleotide polymorphism.

particularly within ORF 62, thus representing genetic similarity with pOka.

To further focus on attenuation-specific genotypes, previous studies were surveyed, and 42 SNPs associated with VZV vaccine attenuation were selected (Table S6).^{8,26} Notably, four vaccines had distinct VF signatures at the 42 vaccine-specific SNPs (Figure 3A). In addition, the heat map of VFs showed that ORF 0 and 62 had the highest number of SNPs and high VFs in the vaccines, as reported previously,⁷ except for SKY Varicella. Furthermore, the VFs of the 42 SNPs were consistent across the different lot numbers, showing that batch-to-batch variation was negligible (Figure S3). To compare the statistical differences in VFs across vaccines, box plots for the VFs were visualized, and medians were found to gradually decrease in the following order: Barycela, VarilRix, VariVax, and SKY Varicella (Figure 3B). For independent confirmation with more comprehensive attenuation-related SNPs, the analyses were repeated with 137 SNPs reported by Depledge et al.¹⁴ (Figure S4). After the removal of the SNPs with VFs less than 0.1 in all four vaccines, analyses of the remaining 54 SNPs validated the gradual decrease in VFs, with the lowest VFs in SKY Varicella. As 40 SNPs were common between the 54 SNPs and the original 42 SNPs, the original 42 SNPs were chosen to evaluate the vaccine attenuation in the subsequent analyses.

Based on the proportions of parental sequence at the 42 SNPs (Table S7), binomial distribution was used to compute the maximum probability of having k number of parental sequences and observed at

$k_{\text{Barycela}} = 12$ ($p = 13.4\%$), $k_{\text{VarilRix}} = 15$ ($p = 12.7\%$), $k_{\text{VariVax}} = 26$ ($p = 12.5\%$), and $k_{\text{SKY Varicella}} = 42$ ($p = 98.9\%$) (Figure 3C). Beyond the single-value VF per SNP, the proportion of every base composition was visualized to closely investigate the substituted bases of the 42 SNPs compared to the pOka genotype (Figure 3D). The right-most pOka's genotype map was used as a frame to visually evaluate the attenuation by overlaying individual heat maps of the vaccines (Figure 3D). Taken together, the proximity of the vaccine strains to the pOka-like genotype for the 42 SNPs was in the order of SKY Varicella, VariVax, VarilRix, and Barycela. Finally, base alterations at the 42 SNPs in the DNA of all four vaccines were successfully validated using Sanger sequencing (Figure S5).

To examine the phylogenetic relationship of the vaccines with publicly available diverse VZV strains, a phylogenetic tree was constructed using the complete genome sequences of the vaccine strains (Figure 4). Consensus genomes of the vaccines were established based on the read alignment with pOka, in which the original sequences were substituted with the variants shown in Figure 1. Dumas was included in Clade 1, and the other strains were assigned to the appropriate Clades, as reported.²⁷ As expected, vOka derived from pOka was included in Clade 2, and MAV/06, which is genetically similar to the Oka strain, was also classified into Clade 2.^{28,29} Vaccine strains were clustered in Clade 2 on the phylogenetic tree, demonstrating genomic similarity with the originated strains. Finally, the evolutionary distances across vaccine strains correlated with the degree of genetic alterations that could increase the levels of attenuation.

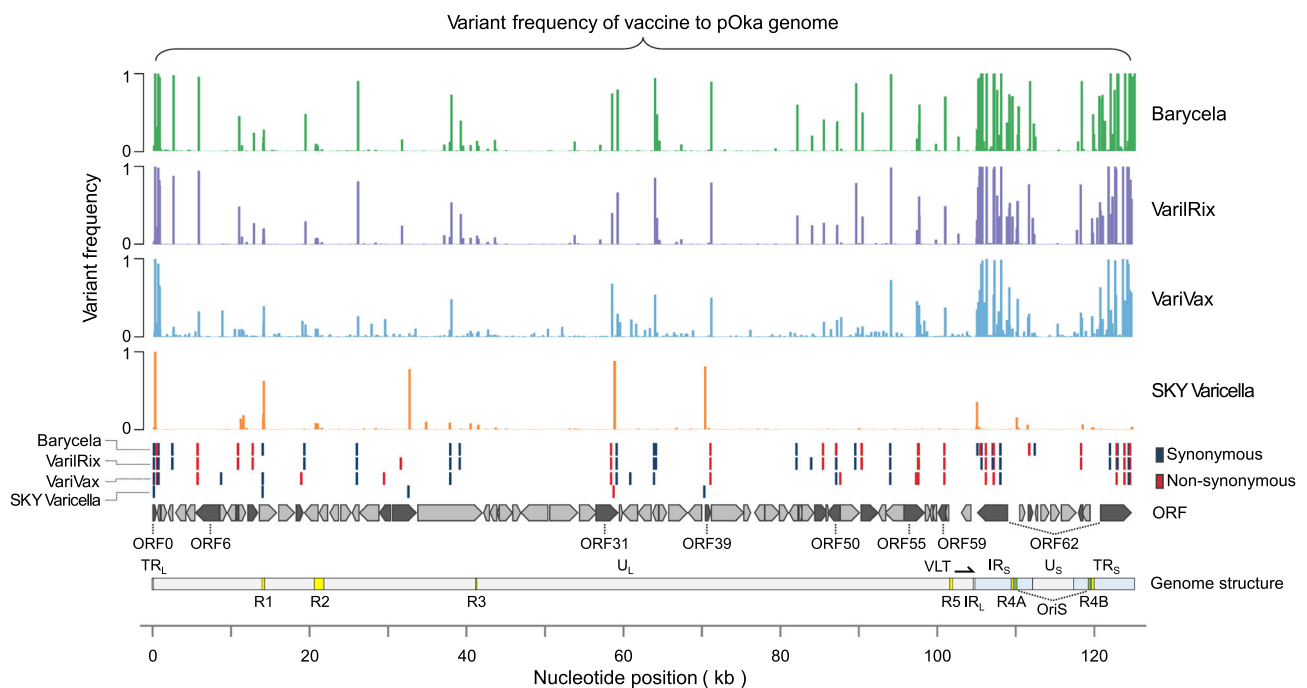


FIGURE 2 Landscape of variant frequencies across the genome of vaccines. Vaccine sequencing data were mapped onto the pOka genome. Bases were counted at every position, and variant frequency (VF) was calculated in the following way: $VF = (\text{the number of reads with nonreference base}) / (\text{the total number of reads at the base position})$. The X and Y axes represent the genomic position and VF, respectively, and ORFs containing the non-synonymous SNPs are highlighted. Abbreviations: Terminal long repeat (TR_L); Terminal short repeat (TR_S); Unique long region (U_L); Unique short region (U_S); Internal long repeat (IR_L); Internal short repeat (IR_S); Reiteration region (R); Origin of DNA replication (OriS); VZV latency-associated transcript (VLT).

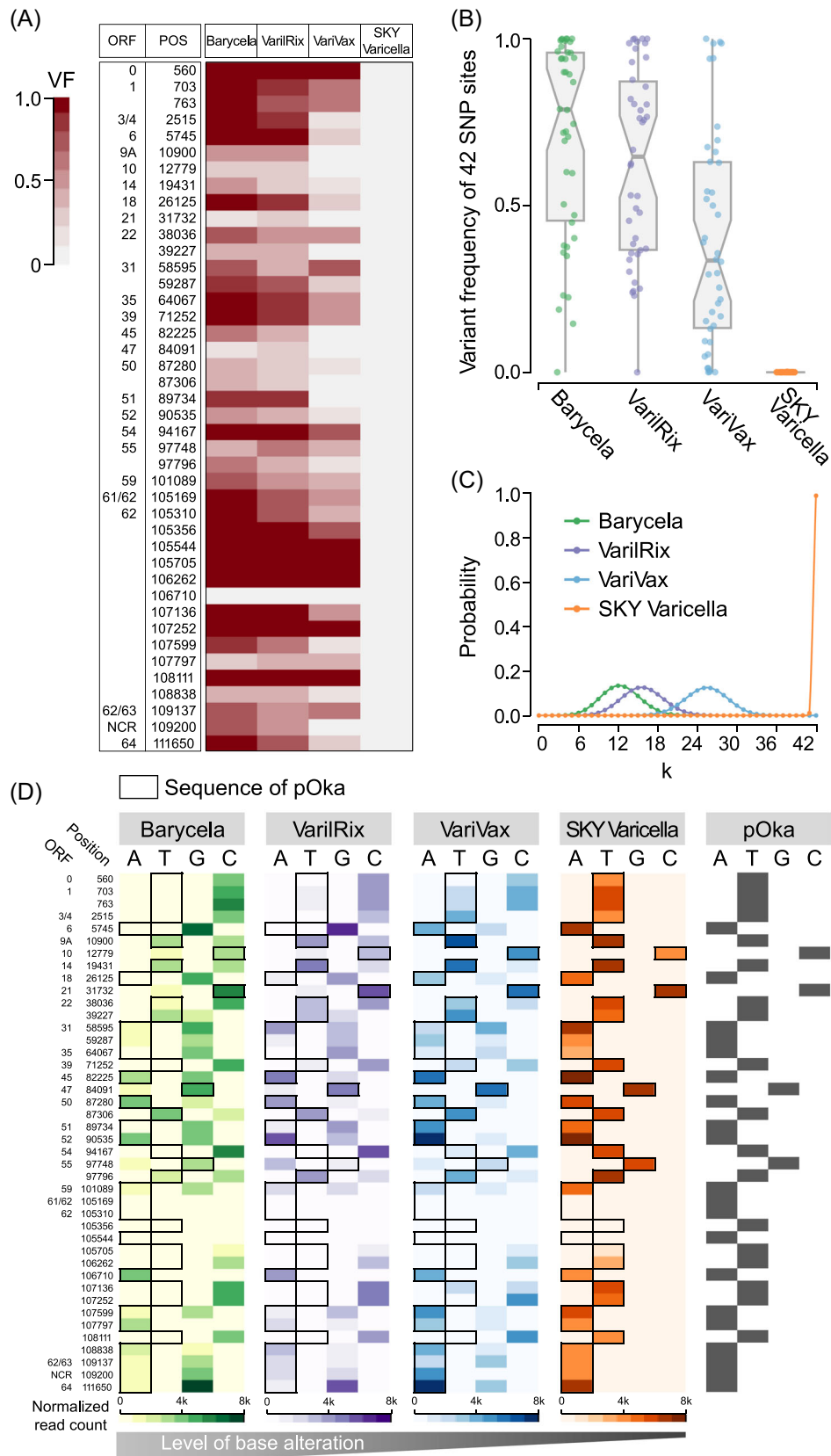


FIGURE 3 Distinct levels of genetic variation at 42 SNPs across vaccines. (A) Heat map showing VFs of 42 attenuation-associated SNPs in vaccine strains. (B) Box plot for VFs of 42 SNP sites. A dot represents an SNP. (C) The probability of having k number of parental sequences was statistically estimated using binomial distribution ($k = 0, 1, 2, \dots, 42$). The proportion of parental sequences at 42 SNPs is listed in Table S7. (D) Visualization of gradual changes in base composition with respect to the pOka genotype. SNP, single nucleotide polymorphism; VF, variant frequency.

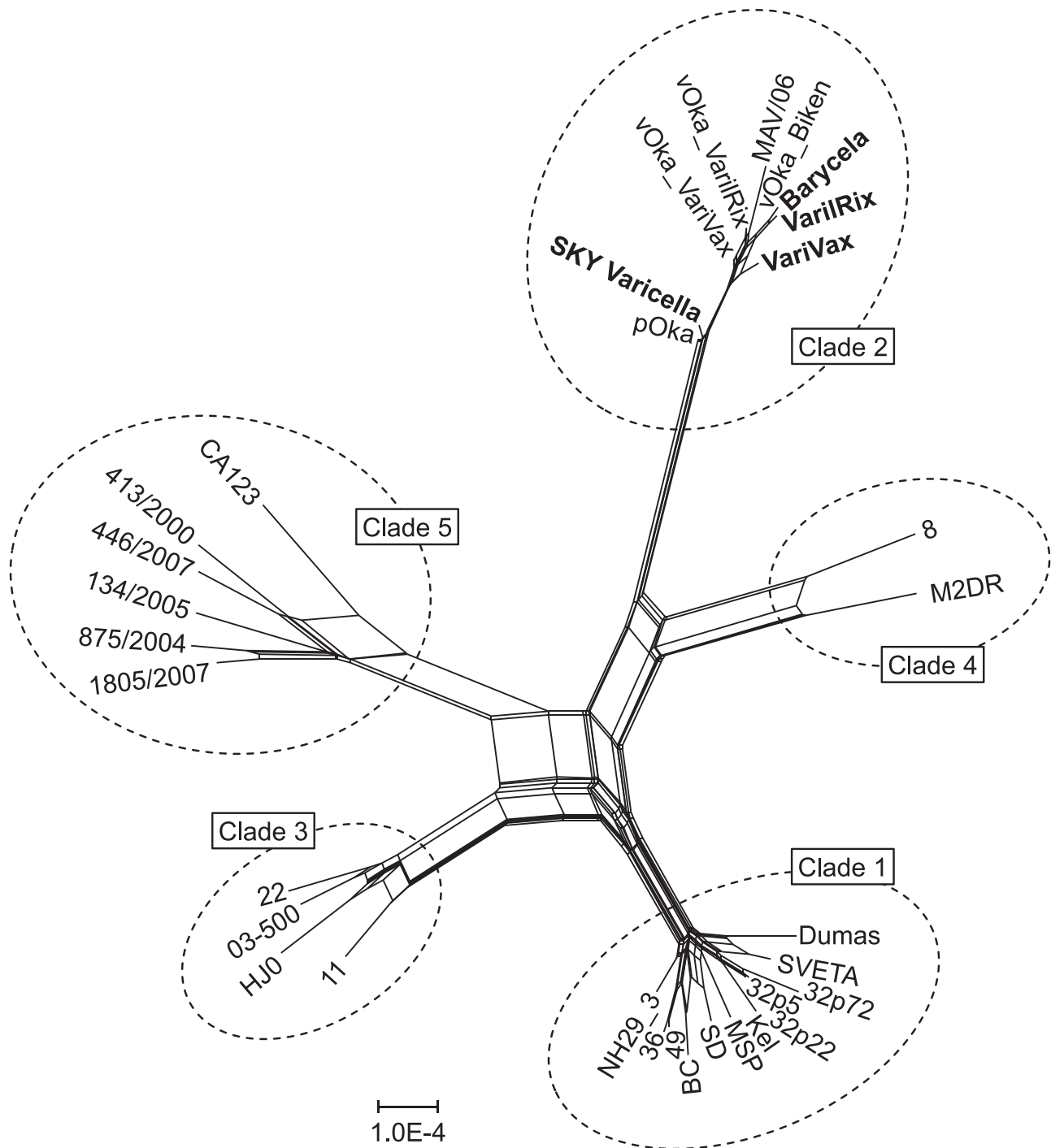


FIGURE 4 Phylogenetic analysis for estimation of the genomic distance between WT and vaccine strains. The phylogenetic network of the complete genomes of VZV strains, including vaccines, was constructed by the Neighbor-Net method in SplitsTree. The scale bar indicates the distance calculated by base substitutions per site. WT, wild-type.

4 | DISCUSSION

The assessment of viral attenuation is essential to mitigate concerns regarding the administration of live-attenuated vaccines. Out of the various assays to test attenuation, genotyping of the whole genome or the attenuation-specific regions could provide robust evidence of

quantitative levels of attenuation by tracing the identities of vaccine strains.⁹ In this study, a high-throughput sequencing technology was utilized to obtain deep coverage for the VZV genome in four commercial vaccines. Genetic variants in the vaccines were identified and compared to the reference genomes of Dumas, pOka, vOka, and MAV/06, allowing tracing of origin of the variants. Thus, genome-

wide comparison between functionally annotated strains and vaccine strains could be an effective approach to infer the phenotypes of vaccine strains.

Virus strains are attenuated by the evolutionary selection process through serial passaging of strains under certain selective pressures that cause mutations to preferentially accumulate in hotspots, such as ORF 62 and the 42 SNPs of this VZV study.⁶⁻⁹ Calculating the VFs in those regions helped interpret the large-scale genomics data by narrowing down to the attenuation-related genomic positions. Surprisingly, SKY Varicella had the smallest number of mutations in these regions and was genetically similar to the parental strain, unlike the other vaccines. The high proportion of parental sequences in the mutation-susceptible area might suggest poor attenuation of the vaccine strain. However, the levels of attenuation were assessed with respect to genomic similarity without any biological or pathological assay for the virus strains; thus, experimental evidence was insufficient to determine clinical attenuation in this report. Therefore, clinical evaluation is necessary to validate the genomic evaluation of vaccines.

The different mutation levels of the vaccines might indicate their different efficacies and safety. As such, caution is warranted regarding the multi-dose administration of the less attenuated vaccine for immunologically weak individuals. Therefore, quantitative measurement of the attenuation levels by high-throughput sequencing may be required to ensure both the safety and efficacy of live-attenuated VZV vaccines.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Jaewoo Lee: designed the study and provided the vaccines. **Jaeyun Moon:** performed the experiments. **Jaeyun Moon, Jina Seo, and Daechan Park:** analyzed and interpreted the data. **Jaeyun Moon and Daechan Park:** wrote the manuscript. **Daechan Park:** supervised the genomic analysis. All authors reviewed the manuscript and agreed to publish the final version of manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the National Research Foundation (NRF) of Korea funded by the Ministry of Science and ICT (MSIT) [NRF-2021R1C1C2093948, NRF-2022M3A9H5070140, and NRF-2020M1A2A2080847], the Ministry of Education [NRF-2021R1A6A1A10044950], and also supported by GC Biopharma in part. We thank Hanbi Park, Jeongyun Jeong, and Hyerim Kim for their technical support.

CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

DP's laboratory currently receives funding from GC Biopharma, and the current research was also partially supported by GC Biopharma. However, the company made no contribution in performing the experiments, interpreting the data, or writing the manuscript.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw sequence data were deposited in the Korean Nucleotide Archive (accession ID: PRJKA230525) and the NCBI BioProject (accession ID: PRJNA921818). The data are publicly available.

ORCID

Daechan Park  <http://orcid.org/0000-0003-4991-5247>

REFERENCES

- Gershon AA, Breuer J, Cohen JL, et al. Varicella zoster virus infection. *Nat Rev Dis Primers*. 2015;1:15016. doi:10.1038/nrdp.2015.16
- Zerboni L, Sen N, Oliver SL, Arvin AM. Molecular mechanisms of varicella zoster virus pathogenesis. *Nat Rev Microbiol*. 2014;12(3):197-210. doi:10.1038/nrmicro3215
- Moodley A, Swanson J, Grose C, Bonthius DJ. Severe herpes Zoster following varicella vaccination in immunocompetent young children. *J Child Neurol*. 2019;34(4):184-188. doi:10.1177/0883073818821498
- Sadaoka T, Mori Y. Vaccine development for varicella-zoster virus. *Adv Exp Med Biol*. 2018;1045:123-142. doi:10.1007/978-981-10-7230-7_7
- Wang W, Pan D, Fu W, et al. Development of a skin- and neuro-attenuated live vaccine for varicella. *Nat Commun*. 2022;13(1):824. doi:10.1038/s41467-022-28329-1
- Wu Q, Rivaviller P, Xu S, Xu W. Comparison of the whole-genome sequence of an Oka Varicella Vaccine from China with other Oka vaccine strains reveals sites putatively critical for vaccine efficacy. *J Virol*. 2019;93(9):e02281-18. doi:10.1128/jvi.02281-18
- Jeon JS, Won YH, Kim IK, et al. Analysis of single nucleotide polymorphism among varicella-zoster virus and identification of vaccine-specific sites. *Virology*. 2016;496:277-286. doi:10.1016/j.virology.2016.06.017
- Gomi Y, Sunamachi H, Mori Y, Nagaïke K, Takahashi M, Yamanishi K. Comparison of the complete DNA sequences of the Oka varicella vaccine and its parental virus. *J Virol*. 2002;76(22):11447-11459. doi:10.1128/jvi.76.22.11447-11459.2002
- Schmid DS, Jumaan AO. Impact of varicella vaccine on varicella-zoster virus dynamics. *Clin Microbiol Rev*. 2010;23(1):202-217. doi:10.1128/cmr.00031-09
- Lau Y-L, Vessey SJR, Chan ISF, et al. A comparison of safety, tolerability and immunogenicity of Oka/Merck varicella vaccine and VARILRIX? in healthy children. *Vaccine*. 2002;20(23-24):2942-2949. doi:10.1016/s0264-410x(02)00245-1
- Takahashi M, Otsuka T, Okuno Y, Asano Y, Yazaki T, Isomura S. Live vaccine used to prevent the spread of varicella in children in hospital. *The Lancet*. 1974;304(7892):1288-1290. doi:10.1016/s0140-6736(74)90144-5
- D'hondt E, Berge E, Colinet G, Duchene M, Peetermans J. Production and quality control of the Oka-strain live varicella vaccine. *Postgrad Med J*. 1985;61 Suppl 4(Suppl 4):53-56.
- Hwang KK, Chun BH, Park HS, Park SY, Kim KH, Moon HM. Marker test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea. Marker Test for attenuation of varicella-zoster viruses isolated in Korea. *J Bacteriol Virol*. 1992;22(2):105-109.
- Depledge DP, Yamanishi K, Gomi Y, Gershon AA, Breuer J. Deep sequencing of distinct preparations of the live attenuated varicella-zoster virus vaccine reveals a conserved core of attenuating single-nucleotide polymorphisms. *J Virol*. 2016;90(19):8698-8704. doi:10.1128/jvi.00998-16
- Organization WH. Prequalification (<https://extranet.who.int/pqweb/content/skyvaricella-inj>).
- Choi UY, Kim KH, Lee J, et al. Immunogenicity and safety profiles of a new MAV/06 strain varicella vaccine in healthy children: a multinational, multicenter, randomized, double-blinded, active-controlled phase III study. *Vaccine*. 2021;39(12):1758-1764. doi:10.1016/j.vaccine.2021.02.013
- Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009;25(14):1754-1760. doi:10.1093/bioinformatics/btp324

18. Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2009;25(16):2078-2079. doi:10.1093/bioinformatics/btp352
19. Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2011;27(21):2987-2993. doi:10.1093/bioinformatics/btr509
20. Cingolani P, Platts A, Wang LL, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly*. 2012;6(2):80-92. doi:10.4161/fly.19695
21. Quinlan AR, Hall IM. BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*. 2010;26(6):841-842. doi:10.1093/bioinformatics/btq033
22. Braspenning SE, Sadaoka T, Breuer J, Verjans GMGM, Ouwendijk WJD, Depledge DP. Decoding the architecture of the varicella-zoster virus transcriptome. *mBio*. 2020;11(5):e01568-20. doi:10.1128/mBio.01568-20
23. Kuhn RM, Haussler D, Kent WJ. The UCSC genome browser and associated tools. *Brief Bioinform*. 2013;14(2):144-161. doi:10.1093/bib/bbs038
24. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30(4):772-780. doi:10.1093/molbev/mst010
25. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol*. 2006;23(2):254-267. doi:10.1093/molbev/msj030
26. Loparev VN, Rubtcova E, Seward JF, Levin MJ, Schmid DS. DNA sequence variability in isolates recovered from patients with postvaccination rash or herpes zoster caused by Oka varicella vaccine. *J Infect Dis*. 2007;195(4):502-510. doi:10.1086/510532
27. Kim MH, Jeon JS, Kim IK, et al. Characterization and phylogenetic analysis of varicella-zoster virus strains isolated from Korean patients. *J Microbiol*. 2017;55(8):665-672. doi:10.1007/s12275-017-7171-3
28. Shin D, Shin Y, Kim E, Nam H, Nan H, Lee J. Immunological characteristics of MAV/06 strain of varicella-zoster virus vaccine in an animal model. *BMC Immunol*. 2022;23(1):27. doi:10.1186/s12865-022-00503-6
29. Zell R, Taudien S, Pfaff F, Wutzler P, Platzer M, Sauerbrei A. Sequencing of 21 varicella-zoster virus genomes reveals two novel genotypes and evidence of recombination. *J Virol*. 2012;86(3):1608-1622. doi:10.1128/jvi.06233-11

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information can be found online in the Supporting Information section at the end of this article.

How to cite this article: Moon JY, Seo J, Lee J, Park D.

Assessment of attenuation of varicella-zoster virus vaccines based on genomic comparison. *J Med Virol*. 2023;95:e28590. doi:10.1002/jmv.28590