



Artikel

Evaluierung der qPCR zum selektiven Nachweis von enterischen Adenovirus, gefolgt von sequenzbasierter genetischer Charakterisierung der in Brasilien zirkulierenden F-Stämme

Lilian Gonçalves do Nascimento und
Tulio Machado Fumian *

[†] , Sylvia Kahwage Sarmiento

[†] , Reinaldo Röpke Junior

Labor für vergleichende und Umweltvirologie, Oswaldo Cruz Institute, Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz), Av. Brasil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brasilien;

liliang.nascimento@gmail.com (LGdN); syl_kahwage@yahoo.com.br (SKS); reiopke@hotmail.com (RRJ)

* Korrespondenz: fumiantm@gmail.com oder tuliomf@ioc.fiocruz.br

[†] Diese Autoren haben in gleichem Maße zu dieser Arbeit beigetragen und teilen sich die Erstautorenschaft.

Zusammenfassung: Das humane Adenovirus (HAdV) F40/41 ist ein wichtiger Erreger bei akuter Gastroenteritis bei Kindern. Die Vielfalt der Studiendesigns und Diagnosemethoden führt jedoch häufig zu Fehlinterpretationen ihrer Auswirkungen. Unsere Studie untersuchte die genetische Vielfalt von HAdV-F40/41 in Brasilien mithilfe eines spezifischen qPCR-Tests für HAdV-Spezies F, kombiniert mit einer phylogenetischen Analyse der partiellen Hexon- und Faser gene. Unsere Ergebnisse zeigten, dass HAdV-F41-Stämme vorherrschten und eine höhere Vielfalt aufwiesen als HAdV-F40-Stämme. Basierend auf dem Hexon-Gen wurden brasilianische HAdV-F41-Stämme in zwei Genomtyp-Cluster (GTC) gruppiert, die weiter in Untercluster unterteilt wurden, wobei sich die meisten Stämme zu GTC2 gruppierten. Der partielle Schaftbereich des Fasergens war unter HAdV-F41 stärker konserviert. Der spezifische qPCR-Test für HAdV-Spezies F identifizierte HAdV-F in weiteren 31,5 % (34/108) der zuvor nicht charakterisierten HAdV-positiven Proben, die mit einem unspezifischen HAdV- qPCR-Test nachgewiesen wurden. Beide Tests korrelierten stark beim Nachweis von HAdV-F, und der spezifische qPCR-Test für enterische Typen kann die HAdV-Überwachung verbessern, insbesondere wenn eine Sequenzierung nicht möglich ist. Unsere Studie liefert neue Erkenntnisse zur genetischen Vielfalt der HAdV-F-Spezies in Brasilien.

Schlüsselwörter: akute Gastroenteritis; enterische HAdVs; genetische Vielfalt; phylogenetische Analyse; qPCR; Brasilien



Zitat: Nascimento, LGd;

Sarmiento, SK; Röpke Junior, R.; Fumian,

TM Evaluation von qPCR für
der selektive Nachweis von enterischen

Adenovirus Gefolgt von

Sequenzbasierte Genetik

Charakterisierung von F-Stämmen

Im Umlauf in Brasilien. Appl. Microbiol. 2024,

4, 1016–1029. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030069>

applmicrobiol4030069

Wissenschaftlicher Redakteur: Ian Connerton

Empfangen: 31. Mai 2024

Überarbeitet: 24. Juni 2024

Akzeptiert: 24. Juni 2024

Veröffentlicht: 27. Juni 2024



Copyright: © 2024 bei den Autoren.

Lizenznehmer MDPI, Basel, Schweiz.

Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel

vertrieben unter den Bedingungen und

Bedingungen der Creative Commons

Namensnennungslizenz (CC BY)

(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Einleitung

Akute Gastroenteritis (AGE) ist eine der häufigsten Ursachen für Morbidität und Mortalität bei Kindern unter fünf Jahren, insbesondere in Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen (LMICs), in denen der Zugang zu Gesundheitsversorgung, Hygiene und Bildung oft eingeschränkt ist [1,2]. In LMICs durchgeführte Studien zum Screening auf mehrere Enteropathogene haben Rotavirus, Norovirus und humanes Adenovirus (HAdV) F40/41 als die primären enterischen Pathogene bei pädiatrischen Patienten mit AGE nachgewiesen [3–6].

HAdV, Mitglieder der Familie Adenoviridae (Gattung Mastadenovirus), sind unbehüllte, lineare dsDNA-Viren mit einem Genom von ~35 kbp [7]. Basierend auf genomischen und bioinformatischen Analysen wird HAdV derzeit in sieben Arten unterteilt, wobei über 100 Typen charakterisiert sind (hadvwg.gmu.edu/, abgerufen am 16. November 2023) [8]. Verschiedene HAdV-Typen weisen unterschiedliche Gewebetropismen auf, was zu einem vielfältigen Spektrum klinischer Symptome führt. Bei immunkompetenten Personen sind die Symptome typischerweise mild und führen zu selbstlimitierenden Infektionen der Atemwege, des Magen-Darm-Trakts und der Bindehaut. Eine schwere Erkrankung betrifft normalerweise immungeschwächte Personen und führt zu anhaltenden und weit verbreiteten Infektionen, die auch den Urogenitaltrakt, die Leber, das zentrale Nervensystem und das Herz-Kreislauf-System betreffen können.

Spezies F umfasst zwei gut etablierte Typen (HAdV-40 und -41), die aufgrund ihres Tropismus für den Gastrointestinaltrakt und ihrer Assoziation mit AGE als enterisches HAdV bekannt sind. Die Bedeutung von HAdV bei pädiatrischen AGE wurde viele Jahre lang unterschätzt.

Der Einsatz molekularer Nachweistechiken als Diagnosemethode hat jedoch gezeigt, dass diese Techniken erheblich zur globalen Belastung durch AGE bei Kindern beitragen [12]. In einer aktuellen Studie in LMICs hat das Global Pediatric Diarrhea Surveillance Network HAdV-F40/41 als zweithäufigsten Erreger bei Kindern unter fünf Jahren mit AGE identifiziert, nach dem Rotavirus [3]. Da in Stuhlproben unterschiedliche HAdV-Typen nachgewiesen werden können, haben regionale Studien weltweit eine große Bandbreite an HAdV-Positivitätsraten (enterische und nicht-enterische Typen) berichtet, wobei die Raten von 1,6 % bis 39,1 % reichen [13–16]. Die große Bandbreite der HAdV-Positivitätsraten ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen, darunter Studiendesign, Umfang, Diagnosemethoden, regionale und zeitliche Unterschiede sowie die Einführung der Rotavirus-Immunisierung [5,6].

Bis Anfang 2022 war HAdV-F ein wichtiger pädiatrischer Erreger bei AGE-Fällen, seine genomische Vielfalt war jedoch noch wenig erforscht. Im März desselben Jahres wurden bei immunkompetenten Kindern mehrere Fälle schwerer Hepatitis unbekannter Ursache festgestellt. Weitere Untersuchungen ergaben mehrere Fälle, die bis in den Oktober 2021 zurückreichen und in über 40 Ländern auftraten [17,18]. Die hohe Nachweisrate von HAdV-F41 und die Möglichkeit eines klinischen Zusammenhangs zwischen F41 und schwerer Hepatitis unbekannter Ursache erhöhten die Dringlichkeit umfassenderer molekularer Phylogenie-Studien, um die Evolution der Spezies F besser zu verstehen, neu auftretende Stämme zu identifizieren und mehr Daten für die Impfstoffentwicklung zu erhalten [19].

Das Wissen über die genomische Vielfalt von HAdV-F40/41 und ihren tatsächlichen Beitrag zu AGE-Fällen, insbesondere in Brasilien, ist nach wie vor begrenzt. Um diese Forschungslücke zu schließen, zielte unsere Studie darauf ab, die Wirksamkeit eines für die Spezies F spezifischen Protokolls zur quantitativen Polymerase-Kettenreaktion (qPCR) bei der Ermittlung der tatsächlichen Auswirkungen von enterischem HAdV in AGE-Fällen zu bewerten. Darüber hinaus führten wir eine Sequenzierung und molekulare phylogenetische Analyse von sechs hypervariablen Regionen des Hexon-Gens sowie eine Teilsequenzierung der Schaftregion des Fasergens von HAdV-F40/41-Stämmen durch, die bei AGE-Patienten nachgewiesen wurden, um Einblicke in die genetische Vielfalt der Spezies F in Brasilien zu erhalten.

2. Materialien und Methoden

2.1. Stuhlprobenentnahme und Ethikerklärung

Diese Studie umfasste HAdV-positive Stuhlproben, die zwischen Januar 2018 und Dezember 2020 von stationären und ambulanten Patienten (Kinder und Erwachsene) mit AGE-Symptomen, wie zuvor beschrieben, gesammelt wurden [15]. AGE wurde als plötzlich auftretender Durchfall (≥ drei flüssige oder halbflüssige Stuhlgänge innerhalb von 24 Stunden) definiert, der von Fieber, Übelkeit, Erbrechen oder Bauchschmerzen begleitet sein kann. Stuhlproben wurden systematisch über Sentinel-Stellen in den Zentrallabors der Bundesstaaten an das Regionale Rotavirus-Referenzlabor – Labor für Vergleichende und Umweltvirologie (RRRL–LVCA) geschickt. Das RRRL–LVCA ist Teil des nationalen Netzwerks zur Rotavirus-Überwachung, das von der Generalkoordination der Labore für öffentliche Gesundheit im brasilianischen Gesundheitsministerium (MoH) beaufsichtigt wird.

Diese Studie wurde vom Ethikkomitee der Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz) genehmigt (Genehmigungsnummer CAAE: 94144918.3.0000.5248). Die Überwachung erfolgte über ein hierarchisches Netzwerk, in dem Proben auf medizinische Anfrage in Krankenhäusern und Gesundheitszentren bereitgestellt wurden, die vom brasilianischen Einheitlichen Gesundheitssystem (SUS) überwacht wurden. Diese Studie wurde im Rahmen des RRRL/MoH als Teil einer föderalen Gesundheitspolitik zur Überwachung viraler AGE in Brasilien durchgeführt. Das Ethikkomitee von Fiocruz verzichtete auf die Einwilligung des Patienten nach Aufklärung und die Patientendaten wurden anonym und sicher aufbewahrt.

2.2. Extraktion viraler DNA

Die Nukleinsäureextraktionen wurden aus 140 µl geklärter Stuhlsuspension (10 % w/v) mit dem QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) auf der automatisierten QIAcube-Plattform gemäß den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die extrahierten viralen Nukleinsäuren wurden in 60 µl des Elutionspuffers AVE eluiert und bis zur molekularen Analyse sofort bei –80 °C gelagert. RNase/DNase-freies Wasser wurde in jedem Extraktionsprotokoll als Negativkontrolle verwendet.

2.3. HAdV-F-Nachweis und Quantifizierung

Ein spezifischer qPCR-Test für HAdV-F [20] wurde verwendet, um die enterischen Typen F40 und F41 in Proben zu erkennen, die zuvor positiv auf HAdV getestet worden waren. Hierzu wurde ein degenerierter Satz von Primern und eine Sonde verwendet, die auf einen konservierten Bereich des ersten Teils des Adenovirus-Hexon-Gens abzielt [21]. Detaillierte Informationen zu den ersten Methoden zur Erkennung und Quantifizierung von HAdV wurden bereits zuvor beschrieben [15].

Der spezifische qPCR-Test zum Nachweis von enterischem HAdV [20], der auf eine konservierte 118-bp-Sequenz des HAdV-F-Fasergens abzielt, wurde unter Verwendung des Vorwärtsprimers (5-AACTTCTCTCTTAATAGACGCC-3), des Rückwärtsprimers (5-AGGGGGCTAGAAAACAAAA-3) und der Sonde (5-CTGACACGGGCACTCT-3) durchgeführt. Kurz gesagt wurden HAdV-F-qPCR-Reaktionen mit 5 µl der extrahierten DNA in einem Endvolumen von 20 µl durchgeführt, das 10 µl des 2x QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, Valencia, CA, USA) sowie Primer und Sonde mit Endkonzentrationen von 0,5 µM bzw. 0,25 µM enthält. Die Reaktionen wurden im Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) unter den folgenden thermischen Zyklusbedingungen durchgeführt: 2 min bei 50 °C, 15 min bei 95 °C, 40 Zyklen von 15 s bei 95 °C und 1 min bei 60 °C. Proben, die eine charakteristische Sigmoidkurve aufwiesen und die Schwellenlinie mit einem Zyklusschwellenwert (Ct) < 40 überschritten, wurden als positiv betrachtet. Alle Läufe umfassten negative und positive Kontrollen (Stuhlprobe) sowie eine Nicht-Vorlagenkontrolle.

2.4. Genetische Vielfalt und Nukleotidsequenzierung von HAdV-F Um

die genetische Vielfalt der in Brasilien zirkulierenden HAdV-F-Stämme zu bewerten, wurden positive Proben, die ursprünglich als Typen F40 und F41 [22] charakterisiert wurden, erneut sequenziert. Wir zielten mit den Primern S29 und S52 auf die sechs hypervariablen Regionen (HVR1–HVR6) des Hexon-Gens [23] und mit den Primern AdF1 und AdF2 auf die partielle Schaftregion des Langfaser-Gens [24]. PCR-Reaktionen wurden unter Verwendung des Enzyms Platinum Taq DNA-Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit 5 µl extrahierter DNA in einem endgültigen Reaktionsvolumen von 25 µl durchgeführt. Die erwarteten Amplicons von 640 und 664 nt für das Hexon-Gen und 508 und 530 nt für das Fiber-Gen für die Typen F40 und F41 wurden mit dem QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) gemäß den Anweisungen des Herstellers gereinigt. Sequenzierungsreaktionen der gereinigten Amplicons wurden mit dem Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit auf einem ABI Prism 3730 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) auf der Fiocruz Institutional Genomic Platform for DNA sequencing (PDTIS) durchgeführt.

2.5. Phylogenetische und Mutationsanalyse von F40/41

Chromatogrammanalyse und Konsensussequenzen wurden mit der Software Geneious Prime 2021.1.1 (Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland) durchgeführt. Die Hexon- und Fiber-nt-Sequenzen der Typen F40 und F41 wurden auf ihre größte Übereinstimmung mit Sequenzen analysiert, die in der GenBank-Datenbank verfügbar sind. Dazu wurde das Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet, abgerufen am 5. Mai 2023). Die Sequenzen wurden mit ClustalW [25] ausgerichtet, und die Maximum-Likelihood-Methode (ML) wurde für die phylogenetische Analyse unter Verwendung des randomisierten Accelerated Maximum Likelihood-Programms (RAxML) [26] mit dem allgemeinen zeitreversiblen (GTR) Modell mit einer gamma-verteilten Heterogenitätsrate über alle Standorte und 1000 Bootstrap-Iterationen für Hexon- und Fasergene verwendet, zugänglich über das CIPRES Science Gateway [27]. Die Ausgabe der RAxML-Läufe wurde in MEGA11 v11.0.13 [28] verwendet, um die phylogenetischen Bäume zu visualisieren und zu konstruieren. Referenzsequenzen wurden aus der GenBank-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) bezogen.

Um außerdem die genetische Vielfalt der brasilianischen HAdV-F-Stämme zu untersuchen, wurden synonyme und nicht synonyme Mutationen in den sequenzierten Teilen der Hexon- und Fasergene mit Prototypstämmen aus der GenBank-Datenbank verglichen.

Die in dieser Studie erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden in der GenBank-Datenbank mit den folgenden Zugangsnummern hinterlegt: OQ442226–OQ442299.

2.6. Statistische Analyse

Statistische Analysen wurden mit der Software GraphPad Prism Version 9.0.0 durchgeführt. (GraphPad Software, San Diego, CA, USA; www.graphpad.com, abgerufen am 15. Oktober 2023). Der Mann-Whitney-U-Test wurde verwendet, um signifikante Unterschiede zwischen qPCR Protokolle. Chi-Quadrat- oder Fisher's exakte Tests wurden zur Analyse kategorialer Merkmale in Kontingenztabellen und die Korrelation von Ct-Werten zwischen qPCR für HAdV (alle Typen) und qPCR spezifisch für HAdV-F wurden mithilfe der Pearson-Korrelation bewertet Koeffizient. Für alle Analysen wurde ein p-Wert < 0,05 als statistisch signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Nachweis von HAdV-F40/41 mittels spezifischem qPCR-Test

In unserer vorherigen Studie, die an Proben durchgeführt wurde, die zwischen Januar 2018 und Im Dezember 2020 haben wir die Rolle von HAdV bei Patienten mit AGE in Brasilien untersucht. Zunächst verwendeten wir einen degenerierten qPCR-Primersatz, der auf eine konservierte Region des Hexon-Gen (qPCR_HAdV), um insgesamt 1235 Stuhlproben auf das Vorhandensein von HAdV zu testen. Positive Proben mit niedrigen Ct-Werten wurden sequenziert, um die HAdV-Arten weiter zu charakterisieren und Typen, wobei 39 % (123/315) der HAdV-positiven Proben erfolgreich sequenziert wurden [15].

In der vorliegenden Studie verwendeten wir ein qPCR-Protokoll mit HAdV-F40/41 spezifischen Primern (qPCR_HAdV-F) in 91% der zuvor sequenzierten Proben (112/123). Mit dem qPCR_HAdV-F Protokoll, F-Spezies wurden in 93,5% (43/46) der sequenzierten Proben nachgewiesen, die zuvor als enterische Typen F40 und F41 identifiziert wurden, und in 4,5% (3/66) der zuvor identifizierten Proben als nicht-enterische HAdVs. Drei Proben, die ursprünglich als zur Spezies C gehörig charakterisiert wurden wurde positiv auf die Art F getestet, während drei Proben, die als zur Art F gehörig charakterisiert wurden, Der Test mit qPCR_HAdV-F war negativ (Tabelle 1).

Tabelle 1. Vergleich zwischen HAdV-degenerierten und F-spezifischen qPCR-Tests.

HAdV-Klassifikation	HAdV Degenerierte qPCR	HAdV-F qPCR		Positivität (%)
	Anzahl der HAdV-positiven getesteten Proben	Positiv	Negativ	
Enterische Typen	46	43	3	93,5
Nicht-enterische Typen	66	3	63	4,5
Nicht sequenziertes HAdV	108	34	74	31,5
Gesamt	220	80	140	36,4

¹ Für den qPCR-Protokollvergleich zeigt die Tabelle die ursprünglichen HAdV-Charakterisierungsergebnisse für die ausgewählten Proben, wie bereits veröffentlicht [15].

Darüber hinaus verwendeten wir den qPCR_HAdV-F-Test für die Gruppe der HAdV-positiven Proben die aufgrund der geringen Virusnachweisrate nicht sequenziert werden konnten (normalerweise Proben, die mit Ct > 30). Unter den nicht sequenzierten HAdV-positiven Proben, die zuvor mit dem qPCR_HAdV, wir haben HAdV-F in 31,5 % der Proben (34/108) mit dem neuen Protokoll nachgewiesen (Tabelle 1).

Um die Effizienz des qPCR_HAdV-F-Tests zu bewerten, verglichen wir die Ct-Werte erhalten durch Verwendung beider Tests für jede Probe in der HAdV-F-positiven Gruppe (n = 80). Streuung Für jede Probe wurden Diagramme und Regressionsanalysen durchgeführt, um die Korrelation zwischen den Ct-Werten für die beiden Tests zu bestimmen. Ein Pearson-Korrelationskoeffizient von 0,96 (p < 0,0001) weist auf eine starke Korrelation (r-Wert $\hat{y} = 1$) zwischen der geschätzten Viruslast aus dem qPCR_HAdV-F-Test und dem qPCR_HAdV-Test hin (Abbildung 1a). Für jeden Primer 66,3 % der getesteten Proben (53/80) zeigten ähnliche PCR-Amplifikationseffizienzen (Ct 2,5 Zyklen) (Abbildung 1b). Die geschätzten PCR-Effizienzen entsprachen im Durchschnitt 1,75 Ct-Werte zwischen den $\hat{y}$ Cts der Proben, die zwischen 0,04 und 8,09 lagen. Nur drei Proben zeigten einen $\hat{y}$ Ct-Wert von über 5,0 Ct. Um die Leistung des HAdV-F-spezifischen Primer-Sets zu bewerten, verglichen wir die Ct-Werte, die durch qPCR_HAdV-F und qPCR_HAdV erhalten wurden. Tests auf jeder HAdV-F-positiven Probe. In 48,75 % (39/80) der getesteten Proben waren die Ct-Werte für die Spezies F-spezifische Primer waren niedriger, was darauf schließen lässt, dass HAdV-F spezifische Primer

cies (Ct 2,5 Zyklen) (Abbildung 1b). Die geschätzten PCR-Effizienzen entsprachen einem Durchschnitt von 1,75 Ct-Werten zwischen den Δ Ct-Werten der Proben, die zwischen 0,04 und 8,09 lagen. Nur drei Proben zeigten einen Δ Ct von über 5,0 Ct. Um die Leistung des HAdV-F-spezifischen Primer-Sets zu bewerten, verglichen wir die Ct-Werte, die durch qPCR_HAdV-F- und qPCR_HAdV-Tests bei jeder HAdV-F-positiven Probe erhalten wurden. Bei 48,75 % (39/80) der getesteten Proben waren die Ct-Werte für die Spezies F-spezifischen Primer niedriger, was darauf hindeutet, dass HAdV-F-spezifische Primer eine höhere Viruslast für dieselbe Probe erkennen (Abbildung 1c). Beim Vergleich der Ct-Werte der HAdV-positiven Proben (Abbildung 1c) mit dem qPCR_HAdV-Test erkannt und nicht sequenziert, wir beobachteten, dass auf dem qPCR_HAdV-Test erkannt und nicht sequenziert, wir beobachteten, dass HAdV-F-positiv erkannte Proben hatten signifikant niedrigere Ct-Werte, die durch qPCR_HAdV-F-Test erkannt wurden als Proben, die durch qPCR_HAdV-Test erkannt wurden. Vergleich des Tests mit nicht-F HAdV-positiven Proben, die durch qPCR_HAdV unter Verwendung von degenerierten Primern erkannt wurden, mit nicht-F HAdV-positiven Proben, die durch qPCR_HAdV unter Verwendung von degenerierten Primern erkannt wurden, ergab eine höhere Viruslast in Stuhlproben von Patienten, bei denen enterische HAdV-Typen nachgewiesen wurden, eine höhere Ausscheidung der Viruslast in Stuhlproben von Patienten, bei denen enterische HAdV-Typen nachgewiesen wurden (Abbildung 1d).

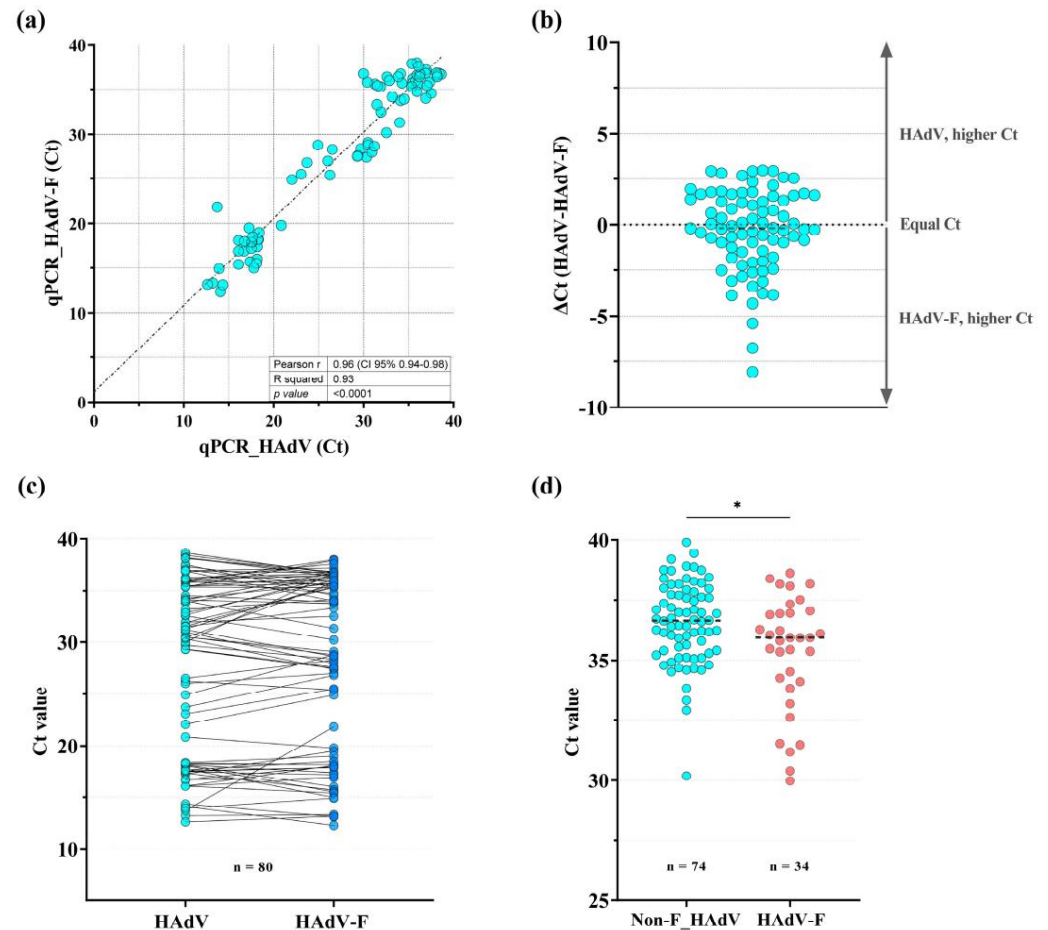


Abbildung 1. (a) Streudiagramm vergleichbarer Ct-Werte, das die Korrelation zwischen den ermittelten Ct-Werten zeigt für die HAdV-F-positiven Proben ($n = 80$) unter Verwendung eines HAdV-degenerierten Primer-Sets (qPCR_HAdV) und eines HAdV-F-spezifischen Primer-Sets (qPCR_HAdV-F) nachgewiesen. Der Korrelationskoeffizient nach Pearson gibt die Stärke der linearen Abhängigkeit zwischen den verschiedenen qPCR-Tests. (b) Δ Ct-Differenz zwischen qPCR_HAdV-F und qPCR_HAdV-Assay Ct-Werte für HAdV-F-positive Proben mit Ct < 40 ($n = 80$). Jeder blaue Punkt stellt eine einzelne Probe dar. Die gestrichelte Linie zeigt den Punkt an, an dem der Unterschied in den Ct-Werten in jedem qPCR-Test gefunden gleich Null (Δ Ct = 0). (c) Paarvergleich der erhaltenen qPCR-Ct-Werte unter Verwendung von qPCR_HAdV und qPCR_HAdV-F für jede HAdV-F-positive Probe (Ct < 40), dargestellt durch hell- bzw. dunkelblaue Punkte. (d) Vergleich der Ct-Werte bei HAdV-F-negativen (blau Punkte) und HAdV-F-positiv (rote Punkte) auf den nicht sequenzierten Proben, die durch die qPCR_HAdV und qPCR_HAdV-F. Die horizontale gestrichelte Linie gibt die mittleren Ct-Werte an. * $p < 0,05$.

3.2. Phylogenetische Analyse der HAdV-F-Hexon- und Fiber-Gene

Unter den 43,9 % (54/123) der Proben, die zuvor als HAdV-F charakterisiert wurden, basierend auf einer konservierten Region des Hexon-Gens [15], konnten wir 70% (7/10) der F40-Proben und 68,2 % (30/44) der F41-Proben in dieser Studie für die HVR1-HVR6 der hexon-Gen. Darüber hinaus amplifizierten wir auch die partielle Schaffregion des Langfasergens in 100 % (10/10) der F40-Proben und 61,4 % (27/44) der F41.

3.2.1. Hexon-Gen

Die phylogenetische Analyse der brasilianischen Stämme HVR1-HVR6 ergab, dass die F40-Stämme waren stärker konserviert als F41-Stämme. Die sieben F40-Stämme gruppierten sich zusammen und teilen >99% Nukleotididentität (nt). Zusätzlich sind die HVR1-HVR6-Regionen von F40-Stämme zeigten >99% nt-Identität mit den entsprechenden Regionen des Hexon-Gens des Prototyp-Stammes Dungan (AB330121) und zu Stämmen, die zuvor in Brasilien nachgewiesen wurden (MT791000), Indien (KU884615, MT952448), Finnland (KU162869), Südafrika (MK955319),⁷ und China (MK883611) (Abbildung 2).

Appl. Microbiol. 2024, 4, Downloaded from https://apmic.sagepub.com at University of Twente on 09/11/24



Abbildung 2. Phylogenetischer Baum basierend auf der Nukleotidsequenz der hypervariablen Regionen (HVR1-HVR6) des Hexon-Gens. HAdV-F40- und -F41-Stämme, die in dieser Studie isoliert wurden, sind mit einem orangefarbenen bzw. roten Kreis. Referenzstämme wurden aus dem GenBank-Repository heruntergeladen und mit ihrer Zugangsnummer/HAdV-Typ/Sammeljahr/Isolat-ID/Land beschriftet.

ein orangefarbener bzw. rot ausgefüllter Kreis. Referenzstämme wurden aus dem Gen-Bank-Repository heruntergeladen und mit ihrer Zugangsnummer/HAAdV-Typ/Sammeljahr/Isolat-ID/Land beschriftet. Prototypstämme für die Typen F40 und F41 sind mit einer schwarz ausgefüllten Raute markiert. Der phylogenetische Baum wurde mit der Maximum-Likelihood-Methode unter Verwendung des randomisierten Axelerated Maximum Likelihood (RAxML)-Programms erstellt, mit dem allgemeinen zeitreversiblen (GTR) Modell mit einer gammaverteilten Heterogenitätsrate über alle Standorte und 1000 Bootstrap-Iterationen, und MEGA11 -Software v11.0.13 (Auckland, Neuseeland) wurde verwendet, um den Baum zu konstruieren und zu visualisieren. Die Bootstrap- Prozentwerte von ≥ 70 % werden an jedem Verzweigungspunkt angezeigt. Hexon-Genomtyp-Cluster (H-GTC) und -Subcluster sind für F41-Stämme angegeben.

Die phylogenetische Analyse von HVR1-HVR6 in F41-Stämmen ergab, dass die brasilianischen Sequenzen in zwei unterschiedliche Linien gruppiert waren, H-GTC1 und H-GTC2 (H-GTCs: Genomtyp -Cluster basierend auf dem Hexon-Gen). Davon gruppierten sich 20 % (6/30) der Stämme zu H-GTC1, während 80 % (24/30) zu H-GTC2 gruppierten (Abbildung 2). In Bezug auf die Identität zwischen den brasilianischen Isolaten zeigten H-GTC2-Stämme eine etwas größere Variationsbreite (95,9–100 % nt-Identität) als H-GTC1-Stämme (96,2–100 % nt-Identität). In Bezug auf den Prototyp TAK (DQ315364) wies H-GTC2 (92,4–93,5 % nt-Identität) einen höheren Grad an Divergenz auf als H-GTC1 (96,5–99,8 % nt-Identität).

Weitere Analysen zeigten, dass H-GTC1 in drei Subcluster unterteilt war. H-GTC1.1 mit einem repräsentativen Stamm (LVCA_30376), der mit Stämmen aus Asien (MK342151 und KT210193), Europa (OP174923, ON532825 und MW567963) und Südafrika (MK962806) gruppiert war und eine nt-Identität von >99 % aufwies. Vier Stämme gruppierten sich zu H- GTC1.2 und wiesen die höchste nt-Identität (>99 %) mit Stämmen aus China (HM565136 und MH465394) und Japan (AB103345) auf. H-GTC1.3 hatte einen einzigen repräsentativen Stamm (LVCA_30088), der sich mit Stämmen aus asiatischen Ländern (AB103347, MT952499 und DQ336391) und den Vereinigten Staaten (ON565007) gruppierte und eine nt-Identität von >99 % aufwies.

H-GTC2-Stämme teilten sich in zwei Untercluster auf, wobei H-GTC2.2 die Mehrheit der Sequenzen enthielt. Die gemeinsamen nt-Identitäten lagen zwischen 98,4 % und 100 % bei Stämmen aus China (KY316161), Japan (LC726493), Südafrika (MK962810), Schweden (KX868523) und den Vereinigten Staaten (KF303069). Schließlich gruppierte sich eine Sequenz (LVCA_29342) in H-GTC2.1 und teilte eine maximale nt-Identität (>98 %) mit Stämmen aus asiatischen Ländern (AB610522, AB610527, KT210190 und MT952501) und den Vereinigten Staaten (ON56501).

3.2.2. Fasergen

Der partielle Schafbereich des Fasergens war unter den Sequenzen der Typen F40 und F41 stärker konserviert als das Hexon-Gen. Die zehn brasilianischen F40-Stämme gruppierten sich und zeigten eine nt-Ähnlichkeit von >99 %. Der analysierte Bereich des Fasergens wies eine maximale nt-Sequenzidentität von >98 % mit dem Referenzstamm Dungan (L19443) und mit Stämmen auf, die in Finnland (KU162869), Indien (KU884631 und MT952560) und Südafrika (MK955316) nachgewiesen wurden (Abbildung 3).

Die brasilianischen F41-Stämme wiesen eine nt-Identität von >98 % mit dem TAK-Prototypstamm (DQ315364) auf und gruppierten sich in zwei genetische Cluster (F-GTC: Genomtypcluster basierend auf dem Fasergen). Innerhalb des Clusters F-GTC1 gruppierten sich keine Stämme mit dem Subcluster F-GTC1.1. Ein brasilianischer Stamm (LVCA_29630) gruppierte sich in das Subcluster F-GTC1.2, während sich drei andere Stämme in das Subcluster F-GTC1.3 gruppierten und maximale nt-Identitäten (>99 %) mit Stämmen aus China (KY316160, MT150355 und AB610544) und Japan (AB610540 und AB246870) aufwiesen. Alle anderen brasilianischen F41-Stämme ($n = 23$) wurden in F-GTC2 (Untercluster F-GTC2.1) gruppiert und wiesen im Vergleich zu den anderen Clustern gemeinsame nt-Identitäten von 91,2 % bis 100 % auf. Die höchste nt-Identität (> 99 %) wurde bei Stämmen aus Südafrika (MK962809), dem Vereinigten Königreich (OP174926), dem Irak (MG925782) und Deutschland (ON532825 und KX868523) beobachtet. (Abbildung 3). Interessanterweise wurde kein brasilianischer Stamm dem Subcluster F-GTC2.2 zugeordnet.



Abbildung 3. Phylogenetischer Baum basierend auf der Nukleotidsequenz der partiellen Schaftregion des Fibrogens . HAdV-F40- und -F41-Stämme, die in dieser Studie isoliert wurden, sind mit einem orangefarbenen bzw. rot ausgefüllten Kreis gekennzeichnet. Referenzstämme wurden aus dem GenBank-Repository heruntergeladen und mit ihrer Zugangsnummer/HAdV-Typ/Sammeljahr/Isolat-ID/Land gekennzeichnet. Prototypstämme für die Typen F40 und F41 sind mit einer schwarz ausgefüllten Raute gekennzeichnet. Der phylogenetische Baum wurde mit der Maximum-Likelihood-Methode unter Verwendung des Programms Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RAXML) erstellt , wobei das allgemeine zeitreversible (GTR) Modell mit einer gammaverteilten Heterogenitätsrate über Standorte und 1000 Bootstrap-Iterationen verwendet wurde, und die MEGA11-Software v11.0.13 wurde verwendet, um den Baum zu erstellen und zu visualisieren. Die Bootstrap-Prozentwerte von 70 % werden an jedem Verzweigungspunkt angezeigt. Für F41-Stämme werden Faser genomtyp -Cluster (F-GTC) und -Subcluster angegeben.

3.3. Mutationsanalyse des Hexon- und Fiber-Proteins der in Brasilien zirkulierenden HAdV-F-Stämme 3.3.1. Hexon-Gen

Die nachgewiesenen brasilianischen HAdV-F40-Stämme waren innerhalb von HVR1-HVR6 größtenteils untereinander konserviert . Eine Probe (LVCA_29219) zeigte eine Transversionsmutation (G850T), die zu einem Aminosäurewechsel von Alanin (A) zu Serin (S) führte. Im Vergleich zu den Dungan

Prototyp: Alle brasilianischen Stämme wiesen eine Mutation auf, die zu einer Aminosäureänderung [Serin (S) zu Leucin (L) (C488T)] führte (Abbildung 4).

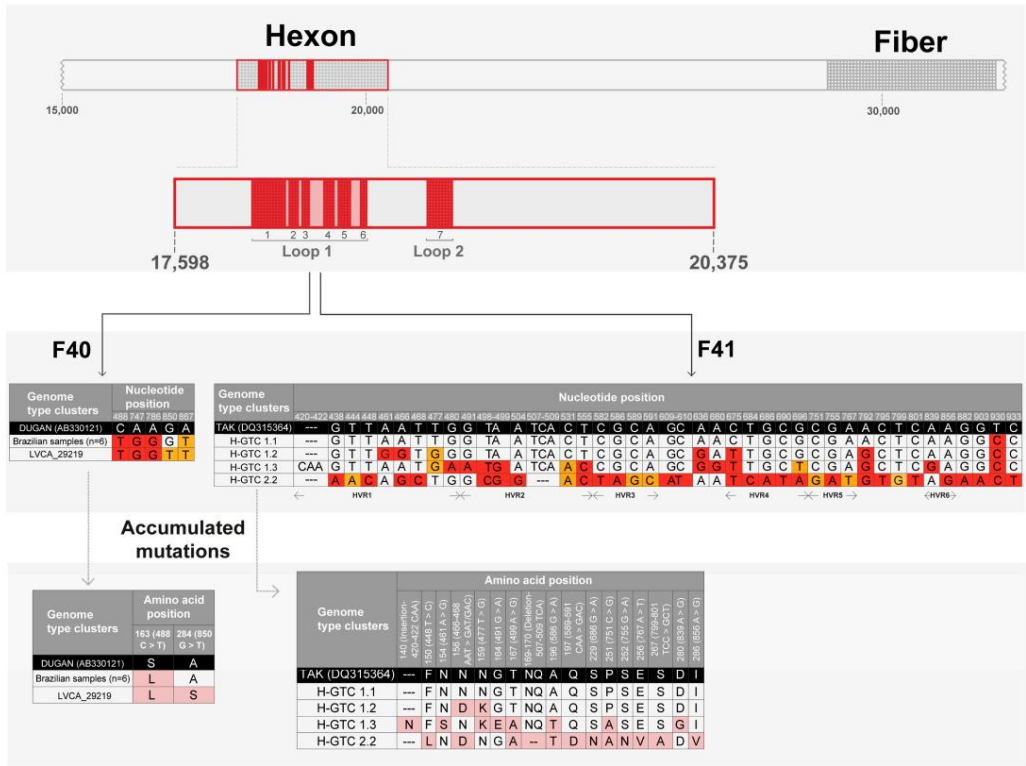


Abbildung 4. HAdV-Genom mit dem repräsentativen Hexon-Protein des F41-Prototyps TAK (DQ315364) in der Größe (2778 nt), das die HVRs anzeigt. Nukleotidpositionen angesammelter synonyme Mutationen mit ihren angesammelten Aminosäuremutationen im HVR1-HVR6 des Hexons im Vergleich mit dem Prototypstamm Dungan (L19443) und TAK (DQ315364) für die Typen F40 bzw. Übergangs- und Transversionsmutationen sind rot bzw. orange hervorgehoben. Aminosäuremutationen sind rosa hervorgehoben. Die in der Abbildung definierte Nukleotidposition bezieht sich auf die Primer- codierende Region innerhalb des HVR1-HVR6 (Position 289–967 nt im Hexon-Gen).

Im Unterschied dazu akkumulierten die F41-Stämme zahlreiche nicht-synonyme und synonyme Mutationen. Nur eine Probe (LVCA_30376) gruppierte sich mit dem Referenzstamm von TAK (H- GTC 1.1) und wies eine Transitionsmutation (T930C) auf, die alle brasilianischen Stämme gemeinsam hatten. Weitere Mutationen in vier brasilianischen Stämmen zeigten ähnliche Eigenschaften wie die H-GTC1.2-Referenzstämme , mit sowohl Transitions- als auch Transversionsmutationen innerhalb des HRV1. Diese Mutationen führten zu Aminosäureveränderungen in A446G [Asparagin (N) zu Asparaginsäure (D)] und T477G [Asparagin (N) zu Lysin (K)]. Eine Probe gruppierte sich in H-GTC 1.3 und trug mehrere H- GTC 1.2-Mutationen sowie weitere nicht-synonyme Mutationen, darunter die Einfügung der Asparagin(N)-Aminosäure (CAA; nt 420–422) (Tabelle 1). Die meisten der nachgewiesenen brasilianischen F41-Stämme (n = 24) gruppierten sich mit H-GTC 2.2 und akkumulierten mehrere Mutationen über die sechs analysierten HVR. Diese Gruppe unterscheidet sich von den anderen durch eine Deletion von drei Nukleotiden (TCA; nt 507–509) und das Vorhandensein synonyme (G438A) und nicht synonyme Mutationen (T448C; CCA589–591GAC; G686A; G755A; A767T; T799G; C801T; A856G) (Abbildung 4).

3.3.2. Fasergen

Bei den brasilianischen F40-Stämmen akkumulierte der partielle Schaffbereich des Fasergens mehr Mutationen als der HVR1-HVR6-Bereich des Hexon-Genes. Alle brasilianischen F40- Proben gruppierten sich und unterschieden sich vom Referenzstamm Dungan mit Mutationen, die zu Aminosäureänderungen an den Positionen G476A [Arginin (R) zu Glutamin (Q)], A914G führten.

[Lysin (K) zu Arginin (R)] und G946A [Alanin (A) zu Threonin (T)]. Drei dieser F40- Stämme wiesen eine zusätzliche Mutation bei G502A [Asparaginsäure (D) zu Asparagin (N)] auf.

Im Gegensatz dazu war bei den brasilianischen F41-Proben der partielle Schaftbereich des Fasergens im Vergleich zum HVR1-HVR6-Bereich des Hexon-Gens stärker konserviert. Obwohl sie weniger Mutationen aufwiesen, wurden die F41-Stämme in zwei große F-GTCs unterteilt. Im Vergleich zum Referenzstamm TAK führten die meisten Mutationen zu synonymen Substitutionen.

Es wurden nur zwei nicht-synonyme Mutationen festgestellt. Die erste wurde in allen brasilianischen F41-Stämmen aus beiden Unterclustern (G596A) gefunden und veränderte die Aminosäure von Serin (S) zu Asparagin (N). Die andere nicht-synonyme Mutation im F41-Fasergen wurde nur in Proben von F-GTC2.2 (G748T) festgestellt und führte zur Veränderung der Aminosäure von Valin (V) zu Phenylalanin (F).

4. Diskussion

Durch enterisches HAdV verursachte AGE stellt eine erhebliche und oft unterschätzte Belastung für pädiatrische Durchfallerkrankungen in LMICs dar [3,12,29]. Das Fehlen einer standardisierten Überwachungsmethodik, einschließlich quantitativer molekularer Nachweismethoden, die spezifisch für HAdV-F40/41 sind, verhindert eine genauere Charakterisierung von enterischem HAdV und seiner Auswirkungen auf Durchfallerkrankungen. Unsere Studie bietet eine vergleichende Analyse der analytischen Leistung von zwei qPCR-Tests, die zum Nachweis von allgemeinem und enterischem HAdV in Stuhlproben verwendet werden, und liefert neue Informationen zur genetischen Vielfalt von HAdV-F40/41- Stämmen, die in AGE-Fällen in Brasilien nachgewiesen wurden.

Mithilfe eines qPCR-Tests, der speziell auf HAdV-F abzielt, konnten wir dessen Sensitivität anhand der Erkennung zuvor sequenzierter HAdV-F-Stuhlproben bestätigen. Darüber hinaus identifizierte der neue Test drei Proben, die zuvor als Spezies C klassifiziert wurden. Dies deutet auf eine mögliche Koinfektion verschiedener HAdV-Spezies innerhalb desselben Patienten hin. Alle drei Proben gehörten zu Patienten unter zwei Jahren, wobei bei einem Patienten zusätzlich gleichzeitig Rotavirus nachgewiesen wurde.

In unserer vorherigen Studie haben wir auch eine gemeinsame Erkennung verschiedener Darmviren beobachtet. Insbesondere wurde HAdV in 30 % der Proben identifiziert, die zuvor positiv auf Norovirus oder Rotavirus getestet worden waren [15]. Unser Forschungsteam berichtete auch über Nachweisraten von 32,1 % für Norovirus [30] und 12 % für Rotavirus [31] in Studien, die in denselben Regionen Brasiliens durchgeführt wurden. Diese Ergebnisse unterstreichen die erhebliche Verbreitung dieser wichtigen Darmviren im Land, insbesondere unter Kindern unter zwei Jahren. Wie erwartet steigt die Wahrscheinlichkeit von Konachweisen mit der Anzahl der untersuchten Erreger. In ähnlicher Weise ergab eine Neuanalyse der Global Enteric Multicenter Study (GEMS) das Vorhandensein von zwei oder mehr mit Durchfall assoziierten Erregern in 38,9 % der Proben [29].

Unter den nicht-enterischen HAdV-Typen werden die Arten A, B, C und D weltweit häufig in Stuhlproben nachgewiesen [13,14,32–34]. Während nicht-enterische HAdV-Arten häufig nachgewiesen werden, ist ihre genaue Rolle in Fällen von AGE unklar [12]. Dennoch wurde in einigen Studien über den Nachweis von nicht-enterischem HAdV als einzigem Erreger bei Säuglingen mit AGE berichtet. Bei einem AGE-Ausbruch in Brasilien beispielsweise war HAdV-A12 das einzige enterische Virus, das neben mehreren anderen untersuchten Viren nachgewiesen wurde, wobei in fünf von neun Stuhlproben hohe Viruslasten festgestellt wurden [35]. Eine in China durchgeführte Fall-Kontroll-Studie deutete auf eine starke Korrelation zwischen HAdV-B3 und Durchfall bei Kindern hin [36]. In Italien wurden in einer Studie mit hospitalisierten Kindern mit AGE-Symptomen nur die nicht-enterischen HAdV-C1, -C2 und -B3 nachgewiesen. Unter den HAdV-positiven Proben wurden bei über 75 % der Patienten nicht-enterische Typen als einziger enterischer Erreger nachgewiesen [37]. Diese Studien unterstreichen die Bedeutung der Überwachung und Charakterisierung nicht-enterischer Typen, insbesondere bei AGE-Ausbrüchen.

Die partielle Sequenzierung der enterischen HAdV-Kapsidproteine könnte auch eine effektive Methode für phylogenetische Analysen und die Überwachung neuer entstehender Linien sein, wenn keine vollständige Genomsequenzierung verfügbar ist. Verschiedene Arten weisen unterschiedliche Evolutionsmechanismen auf. So ist beispielsweise die Entstehung neuer Typen in den HAdV-Arten B, C und D mit homologer Rekombination innerhalb der Artentypen verbunden [38–40]. Im Gegensatz dazu gibt es für die Art F keine Hinweise auf eine Rekombination zwischen den Typen F40 und F41, und ihre mol

Die Evolution scheint durch die Anhäufung von Punktmutationen in verschiedenen Genomregionen innerhalb jedes Typs vorangetrieben zu werden. Jüngste Studien, die das gesamte Genom von HAdV-F41 analysierten, haben gezeigt, dass die Hexon- und Fiber-Gene (sowohl kurz als auch lang) zusammen mit den Regionen E3 und E4 die primären Hotspots für Mutationen sind [41–43]. Jüngste phylogenetische Studien des Typs F41 identifizierten drei verschiedene Linien oder genetische Cluster [41]. Um die Phylogenese und genetische Vielfalt des zirkulierenden enterischen HAdV in Brasilien besser aufzuklären, haben wir die HVR1-HVR6 des Hexon-Gens und die partielle Schaftregion des Fiber-Gens aus HAdV- F-positiven Proben sequenziert, die zwischen 2018 und 2020 gesammelt wurden. Außerdem haben wir die brasilianischen F41- Stämme mit den F41-Sequenzen verglichen, die vor und während der schweren Hepatitisfälle erhalten wurden.

In Übereinstimmung mit den in Ostindien erzielten Ergebnissen [44] zeigte unsere Analyse, dass brasilianische HAdV-F40-Stämme weniger vorherrschend und genetisch stärker konserviert waren als HAdV-F41-Stämme. Die brasilianischen F41-Stämme wurden anhand der phylogenetischen Analyse der teilweise sequenzierten Hexon- und Langfasergene in zwei Hauptlinien oder Cluster unterteilt, wobei die Mehrheit der im Land zirkulierenden Stämme mit GTC2 gruppiert ist. Andere Länder haben eine Kozirkulation verschiedener F41-Stämme gemeldet, wobei Linie 2 vorherrschte [41,44].

Die höheren Nachweisraten von F41 im Vergleich zu F40 könnten mit seiner größeren genetischen Vielfalt zusammenhängen, ein Trend, der in Studien in Brasilien und mehreren anderen Ländern [13,14,34,36] festgestellt wurde und einen genetischen Vorteil verschaffen kann. Die phylogenetischen Analysen der Hexon- und Fiber -Gene von F40 und F41 zeigen, dass die im Land zirkulierenden brasilianischen Stämme eine hohe Genomähnlichkeit mit den weltweit zirkulierenden Stämmen aufweisen, ohne dass es Hinweise auf eine neue HAdV-F-Variante gibt.

Ende 2021 und Anfang 2022 wurde in mehreren Ländern weltweit das Auftreten akuter Hepatitisfälle bei Kindern gemeldet. Diese Fälle wurden zunächst mit hohen Nachweisraten von HAdV-F41 in Verbindung gebracht, wobei keine klassischen akuten Hepatitisviren nachgewiesen wurden [45,46]. Diese Beobachtung deutete zunächst auf die Zirkulation eines potenziell virulenten neuen Stamms von HAdV-F41 hin. In unserer Studie entdeckten wir einige Mutationen in den teilweise sequenzierten Hexon- und Langfasergenen von Stämmen des Typs F41, die vor den Fällen schwerer Hepatitis zirkulierten. Darüber hinaus weisen mehrere F41- Stämme, die in Brasilien über zwei Jahre vor dem Auftreten schwerer Hepatitisfälle identifiziert wurden, eine hohe Nukleotididentität mit kürzlich sequenzierten F41-Stämmen auf, die in Proben betroffener Kinder nachgewiesen wurden. Unsere Ergebnisse stimmen mit Studien aus Großbritannien, Deutschland und Kenia überein, in denen die genomische Vielfalt zirkulierender F41-Stämme vor und während des Auftretens schwerer Hepatitisfälle analysiert wurde. Die Mehrheit der Stämme gehörte zur Linie 2, was darauf schließen lässt, dass bei der Entstehung dieser Fälle möglicherweise weitere Faktoren eine Rolle spielen [41,43]. Kürzlich wurde in einer in Großbritannien durchgeführten Studie auch berichtet, dass F41-Linien, die vor und nach COVID entdeckt wurden, bereits in Großbritannien im Umlauf waren [42]. Alle diese Studien entdeckten eine dritte Linie, die eine signifikante Divergenz in der Kurzfaser aufwies, was auf eine neue Rekombinante hindeutet, die in Brasilien noch nicht entdeckt wurde.

Jüngste Erkenntnisse deuten darauf hin, dass eine Koinfektion des Adeno-assoziierten Virus 2 (AAV2) mit anderen Krankheitserregern, einschließlich HAdV-F41, zu Lebererkrankungen führen kann [47,48]. Eine epidemiologische Abwasserstudie aus Irland stellte zudem einen Zusammenhang zwischen der Belastung durch schwere Hepatitisfälle und der täglichen Viruslast von HAdV und AAV2 im Abwasser fest, was darauf hindeutet, dass die Verbreitung dieser Krankheitserreger in der Bevölkerung mit dem Ausbruch in Zusammenhang stehen könnte [49].

Unsere Studie weist Einschränkungen auf. Erstens konnten wir weder bei allen HAdV-positiven Proben einen qPCR-F-Test durchführen, noch konnten wir alle positiven Proben der Typen F40 und F41 sequenzieren. Dies könnte zu einer Fehlinterpretation der im Land zirkulierenden Hauptcluster führen und möglicherweise wichtige Informationen zur Diversität von HAdV-F übersehen. Darüber hinaus basierte unsere Evolutionsanalyse der Spezies F auf Teilsegmenten der Hexon- und Langfasergene und nicht auf dem vollständigen Genom. Andere Gene, wie das Kurzfasergene und die Regionen E3 und E4, sind bekannte Hotspots für Mutationen und ihre Analyse könnte wichtige neue Daten zur HAdV-Evolution liefern [41–43].

5. Schlussfolgerungen

In der vorliegenden Studie untersuchten wir die genetische Vielfalt der HAdV-F40/41-Stämme durch partielle Amplifikation der hypervariablen Regionen der Hexon- und Langfasergene von

Patienten mit AGE. Die phylogenetische Analyse ergab, dass die Mehrheit der brasilianischen F41-Stämme innerhalb der GCT2-Linie gruppiert war. Umgekehrt waren F40-Stämme in beiden analysierten Genen stärker konserviert. Unsere Studie liefert neue Erkenntnisse zur genetischen Vielfalt der HAdV-F-Arten in Brasilien. Darüber hinaus haben wir die Nützlichkeit sowohl enterischer als auch nicht-enterischer HAdV-Nachweis-qPCR-Tests nachgewiesen, die die HAdV-Überwachung erheblich verbessern können, insbesondere in Fällen, in denen eine Sequenzierung nicht möglich ist. Diese Tests sollten für die Implementierung optimierter molekular-diagnostischer Tests in viralen AGE-Überwachungsprogrammen in Betracht gezogen werden. Schließlich bietet unsere Studie umfassende Daten zur genetischen Vielfalt und Evolution von HAdV-F-Stämmen und unterstützt damit zukünftige Impfstoffentwicklung.

Beiträge der Autoren: Konzeptualisierung, LGdN, SKS und TMF; Methodik, LGdN, SKS und TMF; formale Analyse, LGdN, SKS, RRJ und TMF; Untersuchung, LGdN und SKS; Datenkuratierung, LGdN, SKS und RRJ; Schreiben – Vorbereitung des Originalentwurfs, LGdN, SKS und RRJ; Schreiben – Überprüfung und Bearbeitung, TMF; Überwachung, TMF; Projektverwaltung, TMF; Mittelbeschaffung, TMF. Alle Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und stimmen ihr zu.

Finanzierung: Diese Forschung wurde vom brasilianischen Nationalrat für wissenschaftliche und technologische Entwicklung (CNPq), FAPERJ – Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Processo SEI 260003/000530/2023 (Ref. Proc.) unterstützt. N.º 200.171/2023; Jovem Cientista do Nosso Estado, Fumian, TM) und PAEF-3 vom Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz. Weitere Unterstützung kam von CGLab, dem brasilianischen Gesundheitsministerium. Fumian TM ist ein Researcher Productivity Fellowship des brasilianischen CNPq.

Datenverfügbarkeitserklärung: Die während der aktuellen Studie generierten und analysierten Datensätze sind im GenBank-Repository unter den Zugangsnummern OQ442226-OQ442299 verfügbar. Diese Studie ist im brasilianischen Nationalen System für genetisches Erbe und damit verbundenes traditionelles Wissensmanagement (SisGen, Nr. A837EB6) registriert.

Danksagungen: Wir möchten allen Mitarbeitern der LVCA für die technische Unterstützung danken.

Interessenkonflikte: Die Autoren erklären, dass ihnen keine konkurrierenden finanziellen Interessen oder persönlichen Beziehungen bekannt sind, die die in diesem Artikel beschriebene Arbeit beeinflussen haben könnten. Die Autoren haben die veröffentlichte Version des Manuskripts gelesen und stimmen ihr zu.

Verweise

1. GBD 2016 Diarrhoeal Disease Collaborators. Schätzungen der globalen, regionalen und nationalen Morbidität, Mortalität und Ätiologie von Durchfall in 195 Ländern: Eine systematische Analyse für die Global Burden of Disease Study 2016. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 1211–1228. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
2. Wardlaw, T.; Salama, P.; Brocklehurst, C.; Chopra, M.; Mason, E. Durchfall: Warum Kinder immer noch sterben und was getan werden kann. *Lancet* **2010**, *375*, 870–872. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
3. Cohen, AL; Platts-Mills, JA; Nakamura, T.; Operario, DJ; Antoni, S.; Mwenda, JM; Weldegebriel, G.; Rey-Benito, G.; de Oliveira, LH; Ortiz, C.; et al. Ätiologie und Häufigkeit von Durchfall, der einen Krankenhausaufenthalt erfordert, bei Kindern unter 5 Jahren in 28 Ländern mit niedrigem und mittlerem Einkommen: Ergebnisse des globalen Netzwerks zur Überwachung von Durchfall bei Kindern. *BMJ Glob. Gesundheit* **2022**, *7*, e009548. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
4. Kotloff, KL; Nataro, JP; Blackwelder, WC; Nasrin, D.; Farag, TH; Panchalingam, S.; Wu, Y.; Sow, SO; Sur, D.; Breiman, RF; et al. Belastung und Ätiologie von Durchfallerkrankungen bei Säuglingen und Kleinkindern in Entwicklungsländern (The Global Enteric Multicenter Study, GEMS): Eine prospektive Fall-Kontroll-Studie. *Lancet* **2013**, *382*, 209–222. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
5. Operario, DJ; Platts-Mills, JA; Nadan, S.; Page, N.; Seheri, M.; Mphahlele, J.; Praharaj, I.; Kang, G.; Araujo, IT; Leite, JPG; et al. Ätiologie von schwerem akutem wässrigem Durchfall bei Kindern im globalen Rotavirus-Überwachungsnetzwerk unter Verwendung der quantitativen Polymerase-Kettenreaktion. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, 220–227. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
6. Platts-Mills, JA; Liu, J.; Rogawski, ET; Kabir, F.; Lertsethtakarn, P.; Siguas, M.; Khan, SS; Praharaj, I.; Murei, A.; Nshama, R.; et al. Einsatz quantitativer molekular-diagnostischer Methoden zur Beurteilung der Ätiologie, Belastung und klinischen Merkmale von Durchfall bei Kindern in ressourcenarmen Umgebungen: Eine Neuanalyse der MAL-ED-Kohortenstudie. *Lancet Glob. Health* **2018**, *6*, e1309–e1318. [\[Querverweis\]](#) [\[PubMed\]](#)
7. Davison, AJ; Benkő, M.; Harrach, B. Genetischer Inhalt und Evolution von Adenoviren. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2895–2908. [\[Querverweis\]](#) [\[PubMed\]](#)
8. Seto, D.; Chodosh, J.; Brister, JR; Jones, MS; Mitglieder der Adenovirus-Forschungsgemeinschaft. Verwendung der vollständigen Genomsequenz zur Charakterisierung und Benennung menschlicher Adenoviren. *J. Virol.* **2011**, *85*, 5701–5702. [\[CrossRef\]](#)
9. Lion, T. Adenovirusinfektionen bei immunkompetenten und immungeschwächten Patienten. *Clin. Microbiol. Rev.* **2014**, *27*, 441–462. [\[Querverweis\]](#)

10. Lynch, JP; Kajon, AE Adenovirus: Epidemiologie, globale Verbreitung neuer Serotypen und Fortschritte bei Behandlung und Prävention. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2016**, *37*, 586–602. [\[CrossRef\]](#)
11. Shieh, W.-J. Infektionen mit humanen Adenoviren bei Kindern – ein Update zur klinisch-pathologischen Korrelation. *Biomed. J.* **2021**, *45*, 38–49. [\[CrossRef\]](#)
12. Lee, B.; Damon, CF; Platts-Mills, JA Pädiatrische akute Gastroenteritis im Zusammenhang mit Adenovirus 40/41 in einkommensschwachen und Ländern mit mittlerem Einkommen. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2020**, *33*, 398–403. [\[CrossRef\]](#)
13. Afrad, MH; Avzun, T.; Haque, J.; Haque, W.; Hossain, ME; Rahman, AR; Ahmed, S.; Faruque, ASG; Rahman, MZ; Rahman, M. Nachweis von enterischen und nicht-enterischen Adenoviren bei Patienten mit Gastroenteritis, Bangladesch, 2012–2015. *J. Med. Virol.* **2018**, *90*, 677–684. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Kumthip, K.; Khamrin, P.; Ushijima, H.; Maneekarn, N. Enterische und nicht-enterische Adenoviren im Zusammenhang mit akuter Gastroenteritis bei pädiatrischen Patienten in Thailand, 2011 bis 2017. *PLoS ONE* **2019**, *14*, e0220263. [\[CrossRef\]](#)
15. Nascimento, LG; Fialho, AM; Andrade, JdSR; Assis, RMS; Fumian, TM Humanes enterisches Adenovirus F40/41 als Hauptursache für akute Gastroenteritis bei Kindern in Brasilien, 2018 bis 2020. *Sci. Rep.* **2022**, *12*, 11220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zhou, H.-L.; Bessey, T.; Wang, S.-M.; Mo, Z.-J.; Barclay, L.; Wang, J.-X.; Zhang, C.-J.; Ma, J.-C.; Qiu, C.; Zhao, G.; et al. Belastung und Ätiologie von mittelschwerem und schwerem Durchfall bei Kindern unter 5 Jahren im Norden und Süden Chinas: Prospektive, bevölkerungsbasierte Überwachung. *Gut Pathog.* **2021**, *13*, 33. [\[CrossRef\]](#)
17. Marsh, K.; Tayler, R.; Pollock, L.; Roy, K.; Lakha, F.; Ho, A.; Henderson, D.; Divala, T.; Currie, S.; Yirrell, D.; et al. Untersuchung von Fällen von Hepatitis unbekannter Ätiologie bei kleinen Kindern, Schottland, 1. Januar 2022 bis 12. April 2022. *Euro Surveill.* **2022**, *27*, 2200318. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Zhang, L.-Y.; Huang, L.-S.; Yue, Y.-H.; Fawaz, R.; Lim, JK; Fan, J.-G. Akute Hepatitis unbekannter Herkunft bei Kindern: Früh Beobachtungen zum Ausbruch 2022. *J. Clin. Transl. Hepatol.* **2022**, *10*, 522–530. [\[CrossRef\]](#)
19. Grand, RJ Pathogenität und Virulenz des humanen Adenovirus F41: Mögliche Verbindungen zu schwerer Hepatitis bei Kindern. *Virulence* **2023**, *14*, 2242544. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu, J.; Gratz, J.; Amour, C.; Nshama, R.; Walongo, T.; Maro, A.; Mduma, E.; Platts-Mills, J.; Boisen, N.; Nataro, J.; et al. Optimierung quantitativer PCR-Methoden zum Nachweis enterischer Pathogene. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0158199. [\[CrossRef\]](#)
21. Hernroth, BE; Conden-Hansson, A.-C.; Rehnstam-Holm, A.-S.; Girones, R.; Allard, AK Umweltfaktoren, die menschliche virale Krankheitserreger und ihre potenziellen Indikatororganismen in der Miesmuschel *Mytilus Edulis* beeinflussen: Der erste skandinavische Bericht. *Appl. Environ. Microbiol.* **2002**, *68*, 4523–4533. [\[CrossRef\]](#)
22. Allard, A.; Albinsson, B.; Wadell, G. Schnelle Typisierung menschlicher Adenoviren durch eine allgemeine PCR in Kombination mit einer Restriktionsendonukleaseanalyse. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*. [\[CrossRef\]](#)
23. Li, L.; Shimizu, H.; Doan, LTP; Tung, PG; Okitsu, S.; Nishio, O.; Suzuki, E.; Seo, JK; Kim, KS; Müller, WEG; et al. Charakterisierung von Adenovirus Typ 41-Isolaten von Kindern mit akuter Gastroenteritis in Japan, Vietnam und Korea. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4032–4039. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Xu, W.; McDonough, MC; Erdman, DD Speziespezifische Identifizierung menschlicher Adenoviren durch einen Multiplex-PCR-Test. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 4114–4120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Larkin, MA; Blackshields, G.; Brown, NP; Chenna, R.; McGettigan, PA; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, IM; Wilm, A.; Lopez, R.; et al. Clustal W und Clustal X Version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948. [\[CrossRef\]](#)
26. Stamatakis, A. RAXML Version 8: Ein Tool für die phylogenetische Analyse und Nachanalyse großer Phylogenien. *Bioinformatik* **2014**, *30*, 1312–1313. [\[CrossRef\]](#)
27. Miller, MA; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. Erstellen des CIPRES Science Gateway zur Inferenz großer phylogenetischer Bäume. In *Proceedings des 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, New Orleans, LA, USA, 14. November 2010; S. 1–8. [\[CrossRef\]](#)
28. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Mol. Biol. Evol.* **2021**, *38*, 3022–3027. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Liu, J.; Platts-Mills, JA; Juma, J.; Kabir, F.; Nkeze, J.; Okoi, C.; Operario, DJ; Uddin, J.; Ahmed, S.; Alonso, PL; et al. Einsatz quantitativer molekularer Diagnosemethoden zur Ermittlung der Ursachen von Durchfall bei Kindern: Eine Neuanalyse der GEMS-Fallkontrollstudie. *Lancet* **2016**, *388*, 1291–1301. [\[CrossRef\]](#)
30. Sarmento, SK; de Andrade, JdSR; Miagostovich, MP; Fumian, TM Virologische und epidemiologische Merkmale des Norovirus Infektionen in Brasilien, 2017–2018. *Viruses* **2021**, *13*, 1724. [\[CrossRef\]](#)
31. Gutierrez, MB; Fialho, AM; Maranhão, AG; Malta, FC; Andrade, JdSRd; Assis, RMSd; Mouta, SdSe; Miagostovich, Abgeordneter; Leite, JPG; Machado Fumian, T. Rotavirus A in Brasilien: Molekulare Epidemiologie und Überwachung im Zeitraum 2018–2019. *Pathogens* **2020**, *9*, 515. [\[CrossRef\]](#)
32. Gelaw, A.; Pietsch, C.; Liebert, UG Genetische Vielfalt des menschlichen Adenovirus und des menschlichen Astrovirus bei Kindern mit akuter Gastroenteritis im Nordwesten Äthiopiens. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 2985–2993. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Portal, TM; Reymão, TKA; Quinderé Neto, GA; Fiuza, MKDC; Teixeira, DM; Lima, ICG; Sousa Júnior, EC; Bandeira, RDS; De Deus, DR; Justino, MCA; et al. Nachweis und Genotypisierung von Darmviren bei hospitalisierten Kindern mit akuter Gastroenteritis in Belém, Brasilien: Auftreten einer Adenovirus-Virämie durch Spezies F, Typ 40/41. *J. Med. Virol.* **2019**, *91*, 378–384. [\[Querverweis\]](#)

34. Primo, D.; Pacheco, GT; Timenetsky, MdCST; Luchs, A. Überwachung und molekulare Charakterisierung des menschlichen Adenovirus bei Patienten mit akuter Gastroenteritis im Zeitalter des Rotavirus-Impfstoffs, Brasilien, 2012–2017. *J. Clin. Virol.* **2018**, *109*, 35–40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Portes, SAR; Volotão, EdM; Rocha, MS; Rebelo, MC; Xavier, MdPTP; Assis, RMD; Rose, TL; Miagostovich, Abgeordneter; Leite, JPG; Carvalho-Costa, FA Ein nicht-enterischer Adenovirus-A12-Gastroenteritis-Ausbruch in Rio de Janeiro, Brasilien. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2016**, *111*, 403–406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Qiu, F.-Z.; Shen, X.-X.; Li, G.-X.; Zhao, L.; Chen, C.; Duan, S.-X.; Guo, J.-Y.; Zhao, M.-C.; Yan, T.-F.; Qi, J.-J.; et al. Adenovirus im Zusammenhang mit akutem Durchfall: Eine Fall-Kontroll-Studie. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 450. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. De Francesco, MA; Lorenzin, G.; Meini, A.; Schumacher, RF; Caruso, A. Nichtenterische Adenoviren im Zusammenhang mit Gastroenterologie teritis bei hospitalisierten Kindern. *Microbiol. Spectr.* **2021**, *9*, e0030021. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Dhingra, A.; Hage, E.; Ganzenmüller, T.; Böttcher, S.; Hofmann, J.; Hamprecht, K.; Obermeier, P.; Rath, B.; Hausmann, F.; Dobner, T.; et al. Molekulare Evolution der Spezies Humanes Adenovirus (HAdV) C. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1039. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Lukashev, AN; Ivanova, OE; Ereemeeva, TP; Iggo, RD Hinweise auf häufige Rekombination bei menschlichen Adenoviren. *J. Gen. Virol.* **2008**, *89*, 380–388. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Robinson, CM; Singh, G.; Lee, JY; Dehghan, S.; Rajaiya, J.; Liu, EB; Yousuf, MA; Betensky, RA; Jones, MS; Dyer, DW; et al. Molekulare Evolution menschlicher Adenoviren. *Sci. Rep.* **2013**, *3*, 1812. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Götting, J.; Cordes, AK; Steinbrück, L.; Heim, A. Molekulare Phylogenie menschlicher Adenovirus-Typ-41-Linien. *Virusentwicklung.* **2022**, *8*, veac098. [\[CrossRef\]](#)
42. Maes, M.; Khokhar, F.; Wilkinson, SAJ; Smith, AD; Kovalenko, G.; Dougan, G.; Quick, J.; Loman, NJ; Baker, S.; Curran, MD; et al. Multiplex-MiniON-Sequenzierung deutet auf eine genetische Vielfalt des enterischen Adenovirus F41 hin, die mit der Zeit vor COVID-19 vergleichbar ist. *Microb. Genomics* **2023**, *9*, mgen000920. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Lambisia, AW; Makori, TO; Mutunga, M.; Cheruiyot, R.; Murunga, N.; Quick, J.; Githinji, G.; Nokes, DJ; Houldcroft, CJ; Agoti, CN Genomische Epidemiologie des menschlichen Adenovirus F40 und F41 an der Küste Kenias: Eine retrospektive krankenhausbasierte Überwachungsstudie (2013–2022). *Virus Evol.* **2023**, *9*, vead023. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Chandra, P.; Lo, M.; Mitra, S.; Banerjee, A.; Saha, P.; Okamoto, K.; Deb, AK; Ghosh, SK; Manna, A.; Dutta, S.; et al. Genetische Charakterisierung und phylogenetische Variationen menschlicher Adenovirus-F-Stämme, die zwischen 2017 und 2020 in Ostindien zirkulierten. *J. Med. Virol.* **2021**, *93*, 6180–6190. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Sanchez, LHG; Shiau, H.; Baker, JM; Saaybi, S.; Buchfellner, M.; Britt, W.; Sanchez, V.; Potter, JL; Ingram, LA; Kelly, D.; et al. Eine Fallserie von Kindern mit akuter Hepatitis und humaner Adenovirusinfektion. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *387*, 620–630. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kelgeri, C.; Couper, M.; Gupte, GL; Brant, A.; Patel, M.; Johansen, L.; Valampampil, J.; Ong, E.; Hartog, H.; Perera, MTPR; et al. Klinisches Spektrum von Kindern mit akuter Hepatitis unbekannter Ursache. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *387*, 611–619. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Morfopoulou, S.; Buddle, S.; Torres Montaguth, OE; Atkinson, L.; Guerra-Assunção, JA; Moradi Marjaneh, M.; Zennetini Chiozzi, R.; Storey, N.; Campos, L.; Hutchinson, JC; et al. Genomische Untersuchungen zur unerklärlichen akuten Hepatitis bei Kindern. *Nature* **2023**, *617*, 564–573. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Phan, J.; Eslick, GD; Elliott, EJ Entmystifizierung des weltweiten Ausbruchs schwerer akuter Hepatitis unbekannter Ätiologie bei Kindern: Eine systematische Übersicht und Metaanalyse. *J. Infect.* **2024**, *88*, 2–14. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Martin, NA; Gonzalez, G.; Reynolds, LJ; Bennett, C.; Campbell, C.; Nolan, TM; Byrne, A.; Fennema, S.; Holohan, N.; Kuntamukkula, SR; et al. Adeno-assoziiertes Virus 2 und humanes Adenovirus F41 im Abwasser während eines Ausbruchs schwerer akuter Hepatitis bei Kindern, Irland. *Emerg. Infect. Dis.* **2023**, *29*, 751–760. [\[CrossRef\]](#)

Haftungsausschluss/Anmerkung des Herausgebers: Die in allen Veröffentlichungen enthaltenen Aussagen, Meinungen und Daten sind ausschließlich die der einzelnen Autoren und Mitwirkenden und nicht die von MDPI und/oder den Herausgebern. MDPI und/oder die Herausgeber lehnen jegliche Verantwortung für Personen- oder Sachschäden ab, die aus den im Inhalt erwähnten Ideen, Methoden, Anweisungen oder Produkten resultieren.