



Статья

Оценка количественной ПЦР для селективного обнаружения кишечных Аденовирус с последующей генетикой на основе последовательностей Характеристика штаммов F, циркулирующих в Бразилии

Лилян Гонсалвеш ду Насименту и Тулио[†] , Сильвия Кавале Сарменто[†], Рейнальдо Рёнке Джуниор[†]
Машадо Фумиан *

Лаборатория сравнительной и экологической вирусологии, Институт Освальдо Круза, Фонд Освальдо Круза (Фиокрус), Ав. Бразилиа 4365, Рио-де-Жанейро 21040-360, RJ, Бразилия; liliang.nascimento@gmail.com (LGdN); syl_kahwage@yahoo.com.br (SKS); reiropoke@hotmail.com (RRJ)
* Переписка: fumiantm@gmail.com или tuliomf@ioc.fiocruz.br.

[†] Эти авторы внесли равный вклад в эту работу и имеют первое авторство.

Резюме: Аденовирус человека (HAdV) F40/41 является важным возбудителем острых гастроэнтеритов у детей. Однако разнообразие дизайнов исследований и методов диагностики часто приводит к неправильной интерпретации их воздействия. В нашем исследовании изучалось генетическое разнообразие HAdV-F40/41 в Бразилии с использованием специфического анализа qPCR для HAdV вида F в сочетании с филогенетическим анализом генов частичных гексонов и волокон. Наши результаты показали, что штаммы HAdV-F41 преобладали и демонстрировали большее разнообразие, чем штаммы HAdV-F40. На основании гена гексона бразильские штаммы HAdV-F41 были сгруппированы в два кластера геномных типов (GTC), которые далее разделены на субкластеры, при этом большинство штаммов группируются в GTC2. Частичная область стержня гена волокна продемонстрировала более высокую консервативность среди HAdV-F41. Специфический анализ qPCR для HAdV вида F выявил HAdV-F еще в 31,5% (34/108) ранее не охарактеризованных HAdV-положительных образцов, обнаруженных с помощью неспецифического анализа qPCR HAdV. Оба анализа тесно коррелируют при обнаружении HAdV-F, а специальный анализ qPCR для кишечных типов может улучшить эпиднадзор за HAdV, особенно когда секвенирование невозможно. Наше исследование дает новую информацию о генетическом разнообразии

Ключевые слова: острый гастроэнтерит; кишечные HAdV; генетическое разнообразие; филогенетический анализ; кПЦР; Бразилия



Цитирование: Насименто, LGd;

Сарменто, СК; Рёнке-младший, Р.;

Фумиан, Т.М. Оценка количественной ПЦР для
Селективное обнаружение кишечных

Аденовирус

Генетика, основанная на последовательностях

Характеристика штаммов F

Обращение в Бразилии. Прил. Микробиол.

2024, 4, 1016–1029. <https://doi.org/10.3390/applmicrobiol4030069>

Академический редактор: Ян Коннертон

Поступила: 31 мая 2024 г.

Пересмотрено: 24 июня 2024 г.

Принято: 24 июня 2024 г.

Опубликовано: 27 июня 2024 г.



Копирайт: © 2024 авторов.

Лицензиат MDPI, Базель, Швейцария.

Эта статья находится в открытом доступе.
распространяется на условиях и

условия Creative Commons

Лицензия с указанием авторства (CC BY)

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

1. Введение

Острый гастроэнтерит (AGE) является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности детей в возрасте до пяти лет, особенно в странах с низким и средним уровнем дохода (LMIC), где надлежащий доступ к медицинскому обслуживанию, гигиене и образованию часто ограничен [1,2]. Исследования, проведенные в странах с низким и средним уровнем дохода по скринингу на множественные энтеропатогены, выявили ротавирус, норовирус и аденовирус человека (HAdV) F40/41 в качестве основных кишечных патогенов, выявляемых у педиатрических пациентов с возрастным возрастом [3–6].

HAdV, члены семейства Adenoviridae (род Mastadenovirus), представляют собой безоболочечные линейные вирусы с дцДНК с геномом ~35 т.п.н. [7]. На основании геномного и биоинформационного анализа HAdV в настоящее время разделен на семь видов, охарактеризовано более 100 типов (hadwg.gmu.edu/, по состоянию на 16 ноября 2023 г.) [8]. Различные типы HAdV обладают разным тканевым тропизмом, что приводит к разнообразию клинических симптомов. У иммунокомпетентных лиц симптомы обычно выражены слабо и приводят к самокупирующимся респираторным, желудочно-кишечным и конъюнктивальным инфекциям. Тяжелое заболевание обычно поражает лиц с ослабленным иммунитетом, что приводит к стойким и широко распространенным инфекциям, которые также могут поражать мочеполовые пути, печень, центральную нервную систему и сердечно-сосудистую систему.

Вид F включает два хорошо известных типа (HAdV-40 и -41), которые известны как кишечные HAdV из-за их тропизма к желудочно-кишечному тракту и связи с ВОЗРАСТОМ. Важность HAdV в педиатрическом возрасте недооценивалась в течение многих лет.

Однако использование методов молекулярного обнаружения в качестве метода диагностики выявило их существенный вклад в глобальное бремя детского возраста [12]. В недавнем исследовании, проведенном в странах с низким и средним уровнем дохода, Глобальная сеть по надзору за детской диареей определила HAdV-F40/41 как второй по частоте патоген, выявляемый у детей в возрасте до пяти лет с возрастом, после ротавируса [3]. Поскольку в образцах стула могут быть обнаружены различные типы HAdV, региональные исследования по всему миру сообщили о широком диапазоне показателей положительности HAdV (кишечных и некишечных типов), причем показатели варьируются от 1,6% до 39,1% [13–16]. Широкий диапазон показателей положительности HAdV обусловлен множеством факторов, включая дизайн исследования, масштаб, методы диагностики, региональные и временные вариации, а также введение иммунизации против ротавируса [5,6].

До начала 2022 года HAdV-F был основным педиатрическим патогеном в случаях КППГ, однако его геномное разнообразие оставалось плохо изученным. В марте того же года у иммунокомпетентных детей были выявлены множественные случаи тяжелого гепатита неясного генеза. Дальнейшее расследование выявило несколько случаев, датированных октябрём 2021 года, в более чем 40 странах [17,18]. Высокая частота выявления HAdV-F41 и возможность клинической ассоциации F41 с тяжелым гепатитом неизвестного происхождения повысили актуальность более комплексных исследований молекулярной филогении, чтобы лучше понять эволюцию вида F, идентифицировать новые возникающие штаммы и получить больше данных для разработки вакцины [19].

Знания о геномном разнообразии HAdV-F40/41 и его фактическом вкладе в случаи AGE, особенно в Бразилии, остаются ограниченными. Чтобы восполнить этот пробел в исследованиях, наше исследование было направлено на оценку эффективности протокола количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) для вида F в определении истинного воздействия кишечного HAdV в случаях AGE. Кроме того, мы провели секвенирование и молекулярно-филогенетический анализ шести гипервариабельных областей гена гексона, а также частичное секвенирование области стержня гена волокна из штаммов HAdV-F40/41, обнаруженных у пациентов с AGE, чтобы получить представление о генетическом разнообразии вида F в Бразилии.

2. Материалы и методы

2.1. Сбор стула и заявление об этике

В это исследование были включены HAdV-положительные образцы стула, собранные в период с января 2018 г. по декабрь 2020 г. у стационарных и амбулаторных пациентов (детей и взрослых) с симптомами AGE, как описано ранее [15]. ВОЗРАСТ определялся как внезапное начало диареи (трех выделений жидкости или полужидкости в течение 24 часов), которая может сопровождаться лихорадкой, тошнотой, рвотой или болью в животе. Образцы стула систематически отправлялись в Региональную справочную лабораторию по ротавирусам — Лабораторию сравнительной и экологической вирусологии (RRRL-LVCA) через дозорные участки в центральных лабораториях штатов. RRRL-LVCA является частью национальной сети эпиднадзора за ротавирусной инфекцией, контролируемой Главным управлением лабораторий общественного здравоохранения Министерства здравоохранения.

Это исследование было одобрено Комитетом по этике Фонда Освальдо Круза (Fiocruz) (номер утверждения CAAE: 94144918.3.0000.5248). Наблюдение осуществлялось через иерархическую сеть, в которой образцы предоставлялись по медицинским запросам в больницах и медицинских центрах под контролем Единой системы здравоохранения Бразилии (SUS). Это исследование было проведено в рамках RRRL/M3 в рамках федеральной политики общественного здравоохранения по эпиднадзору за вирусным возрастным заболеванием в Бразилии. Этический комитет Fiocruz отменил информированное согласие пациента, и данные пациентов хранились анонимно и надежно.

2.2. Экстракция вирусной ДНК

Экстракцию нуклеиновых кислот проводили из 140 мкл осветленной суспензии стула (10% мас./об.) с помощью набора QIAamp Viral Mini (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США) на автоматизированной платформе QIAcube в соответствии с инструкциями производителя. Выделенные вирусные нуклеиновые кислоты элюировали 60 мкл элюирующего буфера AVE и сразу хранили при -80 °C до проведения молекулярного анализа. В качестве отрицательного контроля в каждом протоколе экстракции использовали воду, не содержащую РНКазы/ДНКазы.

2.3. Обнаружение и количественная оценка HAdV-F

Специфический анализ qPCR для HAdV-F [20] был использован для обнаружения кишечных типов F40 и F41 в образцах, которые ранее дали положительный результат на HAdV, с использованием вырожденного набора праймеров и зонда, нацеленного на консервативную область первой части гексона аденовируса. ген [21]. Подробная информация о методах первоначального обнаружения и количественного определения HAdV была описана ранее [15].

Специфический анализ qPCR для обнаружения кишечного HAdV [20], нацеленный на консервативную последовательность гена волокна HAdV-F длиной 118 п.н., был проведен с использованием прямого праймера (5-AACCTTCTCTCTTAATAGACGCC-3); обратный праймер (5-AGGGGGCTAGAAAACAAAA-3) и зонд (5-CTGACACGGGCACTCT-3). Вкратце, реакции qPCR HAdV-F выполнялись с использованием 5 мкл экстрагированной ДНК в конечном объеме 20 мкл, содержащего 10 мкл 2х набора QuantiTect Probe PCR Kit (Qiagen, Валенсия, Калифорния, США), а также праймеры и зонд с конечными концентрациями 0,5 мкМ и 0,25 мкМ соответственно. Реакции проводили в системе ПЦР в реальном времени Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) при следующих условиях термоциклирования: 2 минуты при 50 °C, 15 минут при 95 °C, 40 циклов по 15 с. при 95 °C и 1 мин при 60 °C. Образцы, которые имели характерную сигмовидную кривую и пересекали пороговую линию со значением порога цикла (Ct) <40, считались положительными. Все серии включали отрицательный и положительный контроль (образец стула), а также контроль без шаблона.

2.4. Генетическое разнообразие HAdV-F и нуклеотидное секвенирование.

Для оценки генетического разнообразия штаммов HAdV-F, циркулирующих в Бразилии, положительные образцы, первоначально охарактеризованные как типы F40 и F41 [22], были повторно секвенированы. Мы нацеливались на шесть гипервариабельных областей (HVR1–HVR6) гена гексона, используя праймеры S29 и S52 [23], а также на частичную область стержня гена длинных волокон, используя праймеры AdF1 и AdF2 [24]. ПЦР-реакции проводили с использованием фермента ДНК-полимеразы Platinum Taq (Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США) с 5 мкл экстрагированной ДНК в конечном реакционном объеме 25 мкл. Ожидаемые ампликоны длиной 640 и 664 нт для гена гексона и 508 и 530 нт для гена волокна для типов F40 и F41 соответственно были очищены с использованием набора QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Реакции секвенирования очищенных ампликонов проводили с использованием готового к циклическому секвенированию набора Big Dye Terminator v. 3.1 на генетическом анализаторе ABI Prism 3730 xl (Applied Biosystems, Фостер-Сити, Калифорния, США) на Институциональной геномной платформе FioCruz для секвенирования ДНК (ПДТИС).

2.5. Филогенетический и мутационный анализ F40/41

Анализ хроматограмм и консенсусные последовательности были получены с использованием программного обеспечения Geneious Prime 2021.1.1 (Biomatters Ltd., Окленд, Новая Зеландия). Последовательности гексонов и волокон типов F40 и F41 были проанализированы на предмет наиболее близкой идентичности с последовательностями, доступными в базе данных GenBank, с использованием инструмента базового поиска локального выравнивания (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, доступ 5 мая 2023 г.). Последовательности выравнивали с помощью ClustalW [25], а для филогенетического анализа использовали метод максимального правдоподобия (ML) с использованием рандомизированной программы Accelerated Maximum Likelihood (RAxML) [26] с общей обратимой во времени (GTR) моделью с гамма-распределенной моделью. уровень гетерогенности между сайтами и 1000 итераций начальной загрузки для генов гексонов и волокон, доступных на научном портале CIPRES [27]. Результаты прогонов RAxML использовались в MEGA11 v11.0.13 [28] для визуализации и построения филогенетических деревьев. Эталонные последовательности были получены из базы данных GenBank Национального центра биотехнологических ресурсов. Кроме того, для изучения генетического разнообразия бразильских штаммов HAdV-F синонимичные и несинонимичные мутации в секвенированных участках генов гексонов и волокон сравнивали со штаммами-прототипами, полученными из базы данных GenBank.

Нуклеотидные последовательности, полученные в данном исследовании, были депонированы в базе данных GenBank под следующими номерами доступа: OQ442226–OQ442299.

2.6. Статистический анализ

Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPad Prism версии 9.0.0. (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США; www.graphpad.com, доступ 15 октября 2023). U-тест Манна-Уитни использовался для оценки существенных различий между qPCR. протоколы. Для анализа категориальных оценок использовались хи-квадрат или точные критерии Фишера. характеристики в таблицах сопряженности и корреляция значений Ct между qPCR для HAdV (все типы) и количественная ПЦР, специфичная для HAdV-F, оценивалась с использованием корреляции Пирсона. коэффициент. Для всех анализов значение $p < 0,05$ считалось статистически значимым.

3. Результаты

3.1. Обнаружение HAdV-F40/41 с помощью специального анализа qPCR

В нашем предыдущем исследовании, проведенном на образцах, собранных в период с января 2018 года по В декабре 2020 года мы исследовали роль HAdV среди пациентов с AGE в Бразилии. Первоначально мы использовали вырожденный набор праймеров для КПЦР, нацеленный на консервативную область ген гексона (qPCR_HAdV) для проверки наличия HAdV в общей сложности в 1235 образцах стула. Положительные образцы с низкими значениями Ct были секвенированы для дальнейшей характеристики видов HAdV. и типы: 39% (123/315) HAdV-положительных образцов были успешно секвенированы [15]. В настоящем исследовании мы использовали протокол qPCR со специфическими праймерами HAdV-F40/41. (qPCR_HAdV-F) в 91% ранее секвенированных образцов (112/123). Использование qPCR_HAdV-F Согласно протоколу, виды F были обнаружены в 93,5% (43/46) секвенированных образцов, ранее идентифицированных как кишечные типы F40 и F41, и в 4,5% (3/66) ранее идентифицированных образцов. как неэнтеральные HAdV. Три образца, первоначально отнесенные к виду С. дал положительный результат на вид F, а три образца охарактеризованы как принадлежащие к виду F. результат теста отрицательный с использованием qPCR_HAdV-F (таблица 1).

Таблица 1. Сравнение анализов qPCR с вырожденным HAdV и F-специфичным анализом.

Классификация HAdV	HAdV-вырожденная qPCR ¹		HAdV-F КПЦР		Позитивность (%)
	N	протестированных образцов с HAdV-положительным результатом	Позитивный	Отрицательный	
Кишечные типы		46	43	3	93,5
Неэнтеральные типы		66	3	63	4,5
Несеквенированный HAdV		108	34	74	31,5
Общий		220	80	140	36,4

¹ Для сравнения протоколов qPCR в таблице отображаются исходные результаты характеристики HAdV для выбранных образцы, как опубликовано ранее [15].

Кроме того, мы использовали анализ qPCR_HAdV-F для группы HAdV-положительных образцов. которые не удалось секвенировать из-за низкого уровня обнаружения вируса (обычно образцы, обнаруженные с помощью $Ct > 30$). Среди несеквенированных HAdV-положительных образцов, ранее обнаруженных с помощью qPCR_HAdV, мы обнаружили HAdV-F в 31,5% образцов (34 из 108) с новым протоколом (Таблица 1).

Чтобы оценить эффективность анализа qPCR_HAdV-F, мы сравнили значения Ct. полученные с использованием обоих анализов для каждого образца в группе с положительным результатом на HAdV-F ($n = 80$). Разброс Для каждого образца были проведены графики и регрессионный анализ, чтобы определить корреляцию между значениями Ct для двух анализов. Коэффициент корреляции Пирсона 0,96. ($p < 0,0001$) указывает на сильную корреляцию (значение $r \sim 1$) между расчетной вирусной нагрузкой, полученной с помощью анализа qPCR_HAdV-F и анализа qPCR_HAdV (рис. 1а). Для каждого праймера набора, 66,3% протестированных образцов (53/80) продемонстрировали одинаковую эффективность ПЦР-амплификации. (Ct 2,5 цикла) (рис. 1б). Расчетная эффективность ПЦР соответствовала в среднем 1,75 Значения Ct между Cts образцов, которые колебались от 0,04 до 8,09. Только три образцы показали Ct выше 5,0 Ct. Чтобы оценить эффективность набора специфических праймеров HAdV-F, мы сравнили значения Ct, полученные с помощью qPCR_HAdV-F и qPCR_HAdV. анализы каждого положительного образца HAdV-F. В 48,75% (39/80) исследованных образцов значения Ct для вида F-специфические праймеры были ниже, что позволяет предположить, что специфичные для HAdV-F праймеры

(циклы Ct 2,5) (рис. 1б). Расчетная эффективность ПЦР соответствовала среднему значению 1,75 Ct между Ct образцов, которые варьировались от 0,04 до 8,09. Только три образца показали Ct выше 5,0 Ct. Чтобы оценить эффективность набора специфических праймеров HAdV-F, мы сравнили значения Ct, полученные с помощью анализов qPCR_HAdV-F и qPCR_HAdV, на каждом положительном образце HAdV-F. В 48,75% (39/80) протестированных образцов значения Ct для видовых F-специфичных праймеров были ниже, что позволяет предположить, что специфичные для HAdV-F праймеры могут выявлять более высокую вирусную нагрузку для того же образца по сравнению с деканом. обнаруживать более высокую вирусную нагрузку для того же образца по сравнению с вырожденными праймерами генерировать праймеры (рис. 1с). При сравнении значений Ct HAdV-положительных образцов (рис. 1в). При сравнении значений Ct ранее HAdV-положительных образцов с помощью qPCR_HAdV и несквенированных образцов, мы наблюдали, что обнаруженные значения Ct для HAdV-F-положительных образцов были ниже, чем для HAdV-F-отрицательных образцов. Это указывает на более высокую вирусность образцов, обнаруженных с помощью анализа qPCR_HAdV-F, по сравнению с анализом qPCR_HAdV. Анализ сравнения значений Ct HAdV-положительных образцов, обнаруженных с помощью qPCR_HAdV-F, с использованием вырожденных праймеров (n = 0,0123; медианные значения Ct 35,9 и 36,6 соответственно). Это указывает на более высокую вирусность образцов, обнаруженных с помощью qPCR_HAdV-F, по сравнению с анализом qPCR_HAdV. Более высокая экскреция вирусной нагрузки в образцах стула пациентов, у которых выявлен кишечный HAdV. Экскреция кишечной нагрузки в образцах стула пациентов, у которых обнаружен кишечный тип HAdV (рис. 1д).

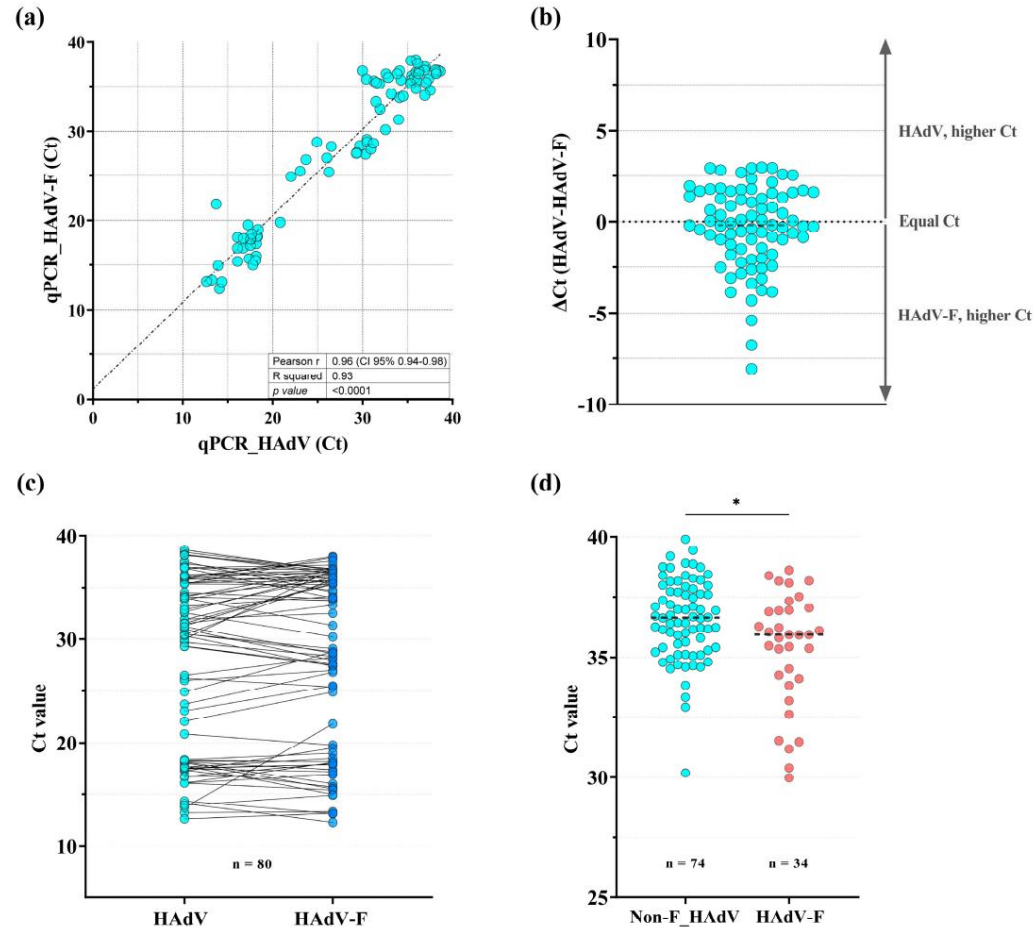


Рисунок 1. (а) Диаграмма разброса сравнительных значений Ct, показывающая корреляцию между обнаруженными значениями Ct. Рисунок 1. (а) Диаграмма разброса сравнительных значений Ct, показывающая корреляцию между значениями Ct для HAdV-F-положительных образцов (n = 80) с использованием набора праймеров, вырожденных по HAdV (qPCR_HAdV) и для HAdV-F-положительных образцов (n = 80) с использованием набора вырожденных HAdV-праймеров (qPCR_HAdV) и набора специфических для HAdV-F праймеров (qPCR_HAdV-F). Коэффициент корреляции Пирсона указывает на силу линейной зависимости между различными анализами qPCR. (б) Разница Ct между qPCR_HAdV-F и значения Ct анализа qPCR_HAdV для HAdV-F-положительных образцов с Ct < 40 (n = 80). Каждая синяя точка представляет собой единый образец. Пунктирная линия указывает точку, в которой разница значений Ct найденное в каждом анализе qPCR, равно нулю (Ct = 0). (в) Парное сравнение полученных значений qPCR Ct. использование qPCR_HAdV и qPCR_HAdV-F для каждого положительного образца HAdV-F (Ct < 40), представленного как светлые и темно-синие точки соответственно. (д) Сравнение значений Ct среди HAdV-F-отрицательных (синий точки) и HAdV-F-положительные (красные точки) в несквенированных образцах, обнаруженных с помощью qPCR_HAdV и qPCR_HAdV-F соответственно. Горизонтальная пунктирная линия указывает медианные значения Ct. * p < 0,05.

3.2. Филогенетический анализ генов гексонов и волокон HAdV-F

Среди 43,9% (54 из 123) образцов, ранее охарактеризованных как HAdV-F, на основании консервативной области гена гексона [15], мы успешно секвенировали 70% (7/10) Образцы F40 и 68,2% (30/44) образцов F41 в этом исследовании для HVR1-HVR6 ген гексона. Кроме того, мы также амплифицировали частичную область стержня гена длинных волокон в 100% (10/10) образцов F40 и 61,4% (27/44) образцов F41.

Рисунок 2. Филогенетическое древо, основанное на нуклеотидной последовательности гипервариабельных областей (HVR1-HVR6) гена гексона. Штаммы HAdV-F40 и -F41, выделенные в этом исследовании, обозначены (HVR1-HVR6) гексонного гена. Штаммы HAdV-F40 и -F41, выделенные в этом исследовании, обозначены красной рамочкой и красной заливкой соответственно. Эталонные штаммы были загружены из репозитория GenBank и помечены их инвентарным номером/типом HAdV/годом сбора/идентификатором изолята/счетом.

кружок с оранжевой и красной заливкой соответственно. Эталонные штаммы были загружены из репозитория Gen-Bank и помечены их инвентарным номером/типом HAdV/годом сбора/идентификатором изолята/страной. Штаммы-прототипы типов F40 и F41 отмечены ромбом черного цвета. Филогенетическое дерево было построено с использованием метода максимального правдоподобия с использованием рандомизированной программы Axelerated Maximum Likelihood (RAxML), с общей обратимой во времени (GTR) моделью с гамма-распределенной степенью гетерогенности по сайтам и 1000 итерациями начальной загрузки и программным обеспечением MEGA11 v11.0.13 (Окленд, Новая Зеландия) использовался для построения и визуализации дерева. В каждой точке ветвления показаны процентные значения бутстрепа 70 %. Кластеры и субкластеры гексонного типа генома (H-GTC) указаны для штаммов F41.

Филогенетический анализ HVR1-HVR6 в штаммах F41 показал, что бразильские последовательности группируются в две разные линии, H-GTC1 и H-GTC2 (H-GTCs: кластер типа генома на основе гена гексона). Среди них 20% (6/30) штаммов группировались в H-GTC1, а 80% (24/30) группировались в H-GTC2 (рис. 2). С точки зрения идентичности бразильских изолятов штаммы H-GTC2 демонстрировали несколько более широкий диапазон вариаций (идентичность нт 95,9–100%) по сравнению со штаммами H-GTC1 (идентичность нт 96,2–100%). Что касается прототипа TAK (DQ315364), H-GTC2 (идентичность 92,4–93,5% нт) демонстрировал более высокую степень дивергенции, чем H-GTC1 (идентичность 96,5–99,8% нт).

Дальнейший анализ показал, что H-GTC1 был разделен на три субкластера. H-GTC1.1 с одним репрезентативным штаммом (LVCA_30376), который группировался со штаммами, обнаруженными в Азии (MK342151 и KT210193), Европе (OP174923, ON532825 и MW567963) и Южной Африке (MK962806), разделяя >99% нт. личность. Четыре штамма сгруппировались в H-GTC1.2 и продемонстрировали максимальную идентичность нт (>99%) со штаммами из Китая (HM565136 и MN465394) и Японии (AB103345). H-GTC1.3 имел единственный репрезентативный штамм (LVCA_30088), который группировался со штаммами из азиатских стран (AB103347, MT952499 и DQ336391) и США (ON565007), демонстрируя >99% идентичности нт.

Штаммы H-GTC2 разделились на два субкластера, причем H-GTC2.2 содержит большую часть последовательностей. Общая идентичность нт варьировалась от 98,4% до 100% для штаммов из Китая (KY316161), Японии (LC726493), Южной Африки (MK962810), Швеции (KX868523) и США (KF303069). Наконец, одна последовательность (LVCA_29342) кластеризовалась в H-GTC2.1, разделяя максимальную идентичность нт (>98%) со штаммами из азиатских стран (AB610522, AB610527, KT210190 и MT952501) и США (ON56501).

3.2.2. Волокно Ген

Частичная область стержня гена волокна была более консервативной, чем ген гексона, среди последовательностей типов F40 и F41. Десять бразильских штаммов F40 сгруппированы вместе, демонстрируя сходство нт >99%. Анализируемый участок гена волокна продемонстрировал максимальную идентичность последовательности нт >98% с эталонным штаммом Dungan (L19443) и со штаммами, обнаруженными в Финляндии (KU162869), Индии (KU884631 и MT952560) и Южной Африке (MK955316). (Рисунок 3).

Бразильские штаммы F41 имели более 98% идентичности нт с прототипным штаммом TAK (DQ315364) и сгруппированы в два генетических кластера (F-GTC: кластер типа генома, основанный на гене волокна). В кластере F-GTC1 не было штаммов, кластеризованных с субкластером F-GTC1.1. Один бразильский штамм (LVCA_29630) сгруппирован в субкластер F-GTC1.2, тогда как три других штамма сгруппированы в субкластер F-GTC1.3, демонстрируя максимальную идентичность нт (>99%) со штаммами из Китая (KY316160, MT150355 и AB610544) и Японии (AB610540 и AB246870). Все остальные бразильские штаммы F41 (n = 23) сгруппированы в F-GTC2 (субкластер F-GTC2.1) и имеют общую идентичность нт в диапазоне от 91,2% до 100% по сравнению с другими кластерами. Максимальная идентичность нт (>99%) наблюдалась у штаммов из Южной Африки (MK962809), Великобритании (OP174926), Ирака (MG925782) и Германии (ON532825 и KX868523). (Рисунок 3). Интересно, что ни один бразильский штамм не сгруппирован с субкластером F-GTC2.2.

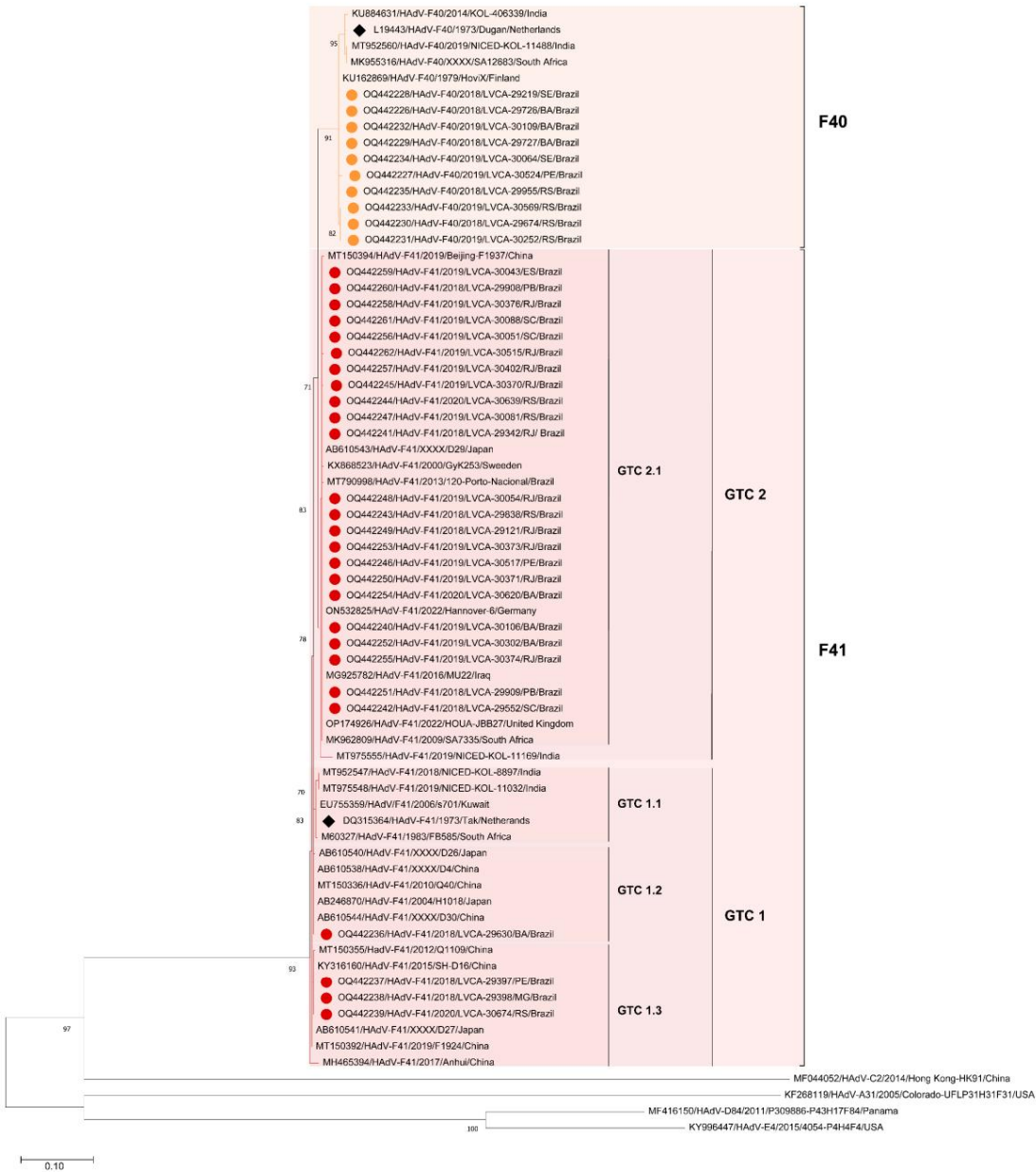


Рисунок 3. Филогенетическое древо, основанное на нуклеотидной последовательности частичного участка стержня гена волокна . Штаммы HAdV-F40 и -F41, выделенные в этом исследовании, обозначены оранжевым и красным кружком соответственно. Эталонные штаммы были загружены из репозитория GenBank и помечены их инвентарным номером/типом HAdV/годом сбора/идентификатором изолята/страной. Штаммы-прототипы типов F40 и F41 отмечены ромбом черного цвета. Филогенетическое древо было построено с использованием метода максимального правдоподобия с использованием программы Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RAxML), с общей обратимой во времени (GTR) моделью с гамма-распределенной степенью гетерогенности по сайтам и 1000 итерациями начальной загрузки и программным обеспечением MEGA11 v11. 0.13 использовался для построения и визуализации дерева. Значения процента начальной загрузки 70% показаны в каждой точке ветвления. Кластеры и субкластеры типа волокнистого генома (F-GTC) указаны для штаммов F41.

3.3. Мутационный анализ гексона и белка-волока штаммов HAdV-F, циркулирующих в Бразилии 3.3.1. Гексон Джин

Выявленные бразильские штаммы HAdV-F40 в основном консервативны между собой в пределах HVR1-HVR6. В одном образце (LVCA_29219) была обнаружена трансверсионная мутация (G850T), которая привела к замене аминокислоты с аланина (A) на серин (S). По сравнению с дунганами

В прототипе все бразильские штаммы содержали одну мутацию, которая привела к замене аминокислоты [серин (S) на лейцин (L) (C488T)] (рис. 4).

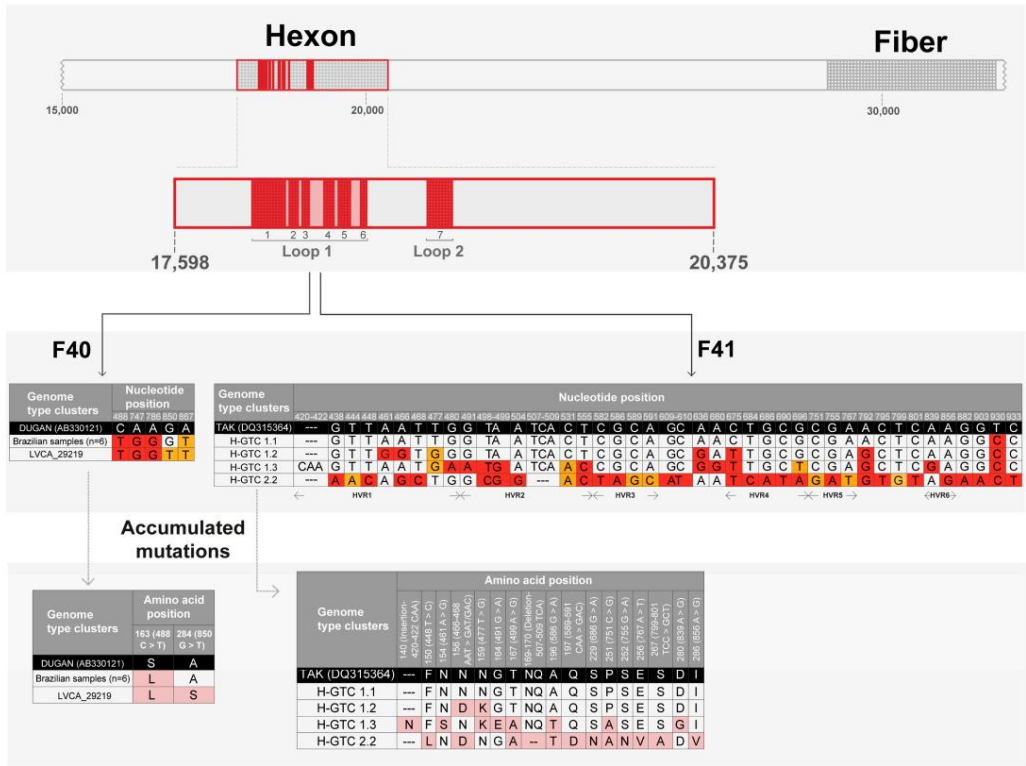


Рисунок 4. Геном HAdV с репрезентативным гексонным белком прототипа F41 TAK (DQ315364) размером (2778 нт), демонстрирующим HVR. Нуклеотидные позиции накопленных синонимичных мутаций с их накопленными аминокислотными мутациями в HVR1-HVR6 гексона в сравнении со штаммом-прототипом Dungan (L19443) и TAK (DQ315364) для типов F40 и F41 соответственно. Мутации перехода и трансверсии выделены красным и оранжевым цветом соответственно. Мутации аминокислот выделены розовым цветом. Положение нуклеотида, определенное на рисунке, относится к кодирующей области праймеров внутри HVR1-HVR6 (положение 289–967 нт в гене гексона).

Напротив, штаммы F41 накопили многочисленные несинонимичные и синонимичные мутации. Только один образец (LVCA_30376) кластеризован с эталонным штаммом TAK (H-GTC 1.1) с переходной мутацией (T930C), общей для всех бразильских штаммов. Дополнительные мутации в четырех бразильских штаммах показали сходные характеристики с эталонными штаммами H-GTC1.2, как с переходными, так и с трансверсионными мутациями внутри HRV1. Эти мутации привели к изменению аминокислот в A446G (аспарагин (N) на аспарагиновую кислоту (D)) и T477G (аспарагин (N) на лизин (K)). Один образец сгруппирован в H-GTC 1.3 и несет несколько мутаций H-GTC 1.2, а также дополнительные несинонимичные мутации, включая вставку аминокислоты аспарагин (N) (CAA; nt 420–422) (таблица 1). Большинство обнаруженных бразильских штаммов F41 (n = 24) кластеризовались с H-GTC 2.2, накапливая несколько мутаций в шести проанализированных HVR. Эта группа отличается от остальных делецией трех нуклеотидов (TCA; nt 507–509) и наличием синонимичных (G438A) и несинонимичных мутаций (T448C; CCA589–591GAC; G686A; G755A; A767T; T799G; C801T). ; A856G) (рис. 4).

3.3.2. Волокно Ген

У бразильских штаммов F40 частичная область стержня гена волокна накопила больше мутаций по сравнению с областью HVR1-HVR6 гена гексона. Все бразильские образцы F40 сгруппированы вместе и отличаются от эталонного штамма Dungan мутациями, приводящими к изменению аминокислот в положениях G476A [аргинин (R) на глутамин (Q)], A914G.

[лизин (K) в аргинин (R)] и G946A [аланин (A) в треонин (T)]. Три из этих штаммов F40 имели дополнительную мутацию в G502A (аспарагиновая кислота (D) на аспарагин (N)).

Напротив, для бразильских образцов F41 частичная область стержня гена волокна была более консервативной по сравнению с областью HVR1-HVR6 гена гексона. Несмотря на меньшее количество мутаций, штаммы F41 были разделены на два основных F-GTC. По сравнению с эталонным штаммом TAK большинство мутаций привели к синонимичным заменам.

Были обнаружены только две несинонимичные мутации. Первый был обнаружен у всех бразильских штаммов F41 обоих субкластеров (G596A), у которых аминокислота была заменена с серина (S) на аспарагин (N). Другая несинонимичная мутация в гене волокна F41 была обнаружена только в образцах F-GTC2.2 (G748T), что привело к замене аминокислоты с валина (V) на фенилаланин (F).

4. Дискуссия

ВОЗРАСТ, вызванный кишечным HAdV, налагает значительное и часто недооцененное бремя на педиатрические диарейные заболевания в странах с низким и средним доходом [3,12,29]. Отсутствие стандартизированной методологии надзора, включая методы количественного молекулярного обнаружения, специфичные для HAdV-F40/41, затрудняет более точную характеристику кишечного HAdV и его влияния на диарейные заболевания. Наше исследование представляет собой сравнительный анализ аналитических характеристик двух анализов qPCR, используемых для обнаружения общего и кишечно-специфического HAdV в образцах стула, и добавляет новую информацию о генетическом разнообразии штаммов HAdV-F40/41, обнаруженных в случаях AGE в Бразилии.

Применив анализ qPCR, специально нацеленный на HAdV-F, мы подтвердили его чувствительность путем обнаружения ранее секвенированных образцов стула HAdV-F. Более того, новый анализ выявил три образца, ранее классифицированные как вид C. Это предполагает потенциальную коинфекцию разных видов HAdV у одного и того же пациента. Все три образца принадлежали пациентам в возрасте до двух лет, причем у одного пациента дополнительно было выявлено одновременное обнаружение ротавируса.

В нашем предыдущем исследовании мы также наблюдали одновременное обнаружение различных кишечных вирусов. В частности, HAdV был идентифицирован в 30% образцов, ранее подтвержденных положительными на норовирус или ротавирус [15]. Наша исследовательская группа также сообщила о показателях обнаружения норовируса 32,1% [30] и 12% ротавируса [31] в исследованиях, проведенных в тех же регионах Бразилии. Эти результаты подчеркивают значительную циркуляцию этих основных кишечных вирусов в стране, особенно среди детей в возрасте до двух лет. Как и ожидалось, вероятность совместного обнаружения увеличивается с увеличением количества проверенных патогенов. В том же духе повторный анализ Глобального многоцентрового исследования кишечных инфекций (GEMS) выявил наличие двух или более патогенов, связанных с диареей, в 38,9% образцов [29].

Среди неэнтеральных типов HAdV виды A, B, C и D часто выявляются в образцах стула во всем мире [13,14,32–34]. Хотя неэнтеральные виды HAdV выявляются часто, их точная роль в случаях КПК остается неопределенной [12]. Тем не менее, в некоторых исследованиях сообщалось об обнаружении неэнтерального HAdV в качестве единственного возбудителя у младенцев с ВОЗРАСТНЫМ возрастом. Например, во время вспышки AGE в Бразилии HAdV-A12 был единственным обнаруженным кишечным вирусом среди нескольких других, прошедших скрининг, при этом высокие вирусные нагрузки были обнаружены в пяти из девяти образцов стула [35]. Исследование «случай-контроль», проведенное в Китае, показало сильную корреляцию между HAdV-B3 и диареей у детей [36]. В Италии исследование с участием госпитализированных детей с симптомами AGE выявило только неэнтеральные HAdV-C1, -C2 и -B3. Среди HAdV-положительных образцов неэнтеральные типы были обнаружены более чем у 75% пациентов как единственный кишечный возбудитель [37]. Эти исследования подчеркивают важность мониторинга и характеристики неэнтеральных типов, особенно во время вспышек КПК.

Частичное секвенирование кишечных капсидных белков HAdV также может быть эффективным методом филогенетического анализа и мониторинга новых появляющихся линий, когда полное секвенирование генома недоступно. Разные виды демонстрируют разные механизмы эволюции. Например, появление новых типов у HAdV видов B, C и D связано с гомологичной рекомбинацией внутри видовых типов [38–40]. Иными словами, для вида F нет никаких свидетельств рекомбинации между типами F40 и F41, а его молекулярная

эволюция, по-видимому, обусловлена накоплением точечных мутаций в различных областях генома каждого типа. Недавние исследования, анализирующие весь геном HAdV-F41, показали, что гены гексонов и волокон (как коротких, так и длинных), а также области E3 и E4 являются основными очагами мутаций [41–43]. Недавние филогенетические исследования типа F41 выявили три разные линии или генетические кластеры [41]. Чтобы лучше выяснить филогению и генетическое разнообразие циркулирующего кишечного HAdV в Бразилии, мы секвенировали HVR1-HVR6 гена гексона и частичную область стержня гена волокна из положительных образцов HAdV-F, собранных в период с 2018 по 2020 год. Мы также сравнили бразильские штаммы F41 с последовательностями F41, полученными до и во время тяжелых случаев гепатита.

В соответствии с результатами, полученными в восточной Индии [44], наш анализ показал, что бразильские штаммы HAdV-F40 были менее преобладающими и более генетически консервативными, чем штаммы HAdV-F41. Бразильские штаммы F41 были разделены на две основные линии или кластера на основе филогенетического анализа частично секвенированных генов гексонов и длинных волокон, при этом большинство штаммов, циркулирующих в стране, кластеризуются с GTC2. В других странах сообщалось о совместной циркуляции различных штаммов F41 с преобладанием линии 2 [41,44]. Более высокие показатели обнаружения F41 по сравнению с F40 могут быть связаны с его большим генетическим разнообразием, тенденция, отмеченная в исследованиях в Бразилии и ряде других стран [13,14,34,36], что может дать генетическое преимущество. Филогенетический анализ генов гексонов и волокон F40 и F41 показывает, что бразильские штаммы, циркулирующие в стране, имеют большое сходство генома со штаммами, циркулирующими во всем мире, без каких-либо доказательств нового возникшего варианта HAdV-F.

В конце 2021 – начале 2022 года возникновение случаев острого гепатита у детей было зарегистрировано в ряде стран мира. Первоначально эти случаи были связаны с высокими показателями выявления HAdV-F41, при этом вирусы классического острого гепатита не были обнаружены [45,46]. Поначалу это наблюдение предполагало циркуляцию нового потенциально вирулентного штамма HAdV-F41. В нашем исследовании мы обнаружили несколько мутаций в частично секвенированных генах гексонов и длинных волокон штаммов типа F41, циркулирующих до случаев тяжелого гепатита. Кроме того, несколько штаммов F41, идентифицированных в Бразилии за два года до начала тяжелых случаев гепатита, демонстрируют высокую нуклеотидную идентичность с недавно секвенированными штаммами F41, обнаруженными в образцах от больных детей. Наши результаты согласуются с исследованиями, проведенными в Великобритании, Германии и Кении, в которых анализировалось геномное разнообразие циркулирующих штаммов F41 до и во время возникновения тяжелых случаев гепатита. Большинство штаммов принадлежало к линии 2, что означает, что могут существовать дополнительные факторы, участвующие в возникновении этих случаев [41,43]. Совсем недавно исследование, проведенное в Великобритании, также показало, что линии F41, обнаруженные до и после COVID, уже циркулируют в Великобритании [42]. Все эти исследования выявили третью линию, показывающую значительное расхождение в коротких волокнах, что позволяет предположить наличие нового рекомбинанта, который еще не обнаружен.

Недавние данные показали, что совместная инфекция аденоассоциированного вируса 2 (AAV2) с другими патогенами, включая HAdV-F41, может привести к заболеванию печени [47,48]. Эпидемиологическое исследование сточных вод в Ирландии также выявило корреляцию между бременем случаев тяжелого гепатита и ежедневной вирусной нагрузкой HAdV и AAV2 в сточных водах, указывая на то, что циркуляция этих патогенов в сообществе может быть связана со вспышкой [49].

Наше исследование имеет ограничения. Во-первых, мы не смогли провести тестирование qPCR-F на всех HAdV-положительных образцах, а также не смогли секвенировать все положительные образцы типов F40 и F41. Это может привести к неправильной интерпретации основных кластеров, циркулирующих в стране, и потенциально упустить ключевую информацию о разнообразии HAdV-F. Кроме того, наш анализ эволюции вида F был основан на частичных сегментах генов гексонов и длинных волокон, а не на полном геноме. Другие гены, такие как ген коротких волокон и области E3 и E4, являются известными очагами мутаций, и их анализ может предоставить важные новые данные об эволюции HAdV [41–43].

5. Выводы

В настоящем исследовании мы исследовали генетическое разнообразие штаммов HAdV-F40/41 путем частичной амплификации гипервариабельных областей генов гексонов и длинных волокон из

пациенты с ВОЗРАСТОМ. Филогенетический анализ показал, что большинство бразильских штаммов F41 группируются в пределах линии GCT2. И наоборот, штаммы F40 были более консервативны по обоим анализируемым генам. Наше исследование дает новое представление о генетическом разнообразии видов HAdV-F в Бразилии. Кроме того, мы продемонстрировали полезность количественных ПЦР-анализов для выявления как энтерального, так и неэнтерального HAdV, которые могут значительно улучшить эпиднадзор за HAdV, особенно в тех случаях, когда секвенирование невозможно. Эти анализы следует рассматривать для реализации оптимизированных молекулярно-диагностических анализов в программах мониторинга вирусного КПП. Наконец, наше исследование предлагает исчерпывающие данные о генетическом разнообразии и эволюции штаммов HAdV-F, тем самым поддерживая будущие усилия по р

Вклад автора: концептуализация, LGdN, SKS и TMF; методология, ЛГдН, СКК и ТМФ; формальный анализ, LGdN, SKS, RRJ и TMF; исследование, ЛГдН и СКК; курирование данных , LGdN, SKS и RRJ; письменное письмо — подготовка оригинального проекта, LGdN, SKS и RRJ; написание-обзор и редактирование, ТМФ; надзор, ТМФ; администрация проекта, ТМФ; приобретение финансирования , TMF. Все авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Финансирование: Данное исследование было поддержано Бразильским национальным советом по научно-технологическому развитию (CNPq), FAPERJ — Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Processo SEI 260003/000530/2023 (Исх. Proc. . N. 200.171/2023; Jovem Cientista do Nosso Estado, Fumian, TM) и PAEF-3 из Института Освальдо Круза, Фиокрус. Дальнейшую поддержку оказала CGLab, Министерство здравоохранения Бразилии. Fumian TM — это стипендия для исследователей продуктивности бразильской CNPq.

Заявление о доступности данных: Наборы данных, созданные и проанализированные в ходе текущего исследования, доступны в репозитории GenBank под номерами доступа OQ442226-OQ442299. Это исследование зарегистрировано в Национальной системе управления генетическим наследием и связанными с ним традиционными знаниями Бразилии (SisGen, № A837EB6).

Благодарность: Мы хотели бы поблагодарить всех сотрудников LVCA за техническую поддержку.

Конфликты интересов: Авторы заявляют, что у них нет известных конкурирующих финансовых интересов или личных отношений, которые могли бы повлиять на работу, представленную в этой статье. Авторы прочитали и согласились с опубликованной версией рукописи.

Рекомендации

1. Сотрудники ГББ 2016 по диарейным заболеваниям. Оценки глобальной, региональной и национальной заболеваемости, смертности и этиологии диареи в 195 странах: систематический анализ исследования глобального бремени болезней, 2016 г. Lancet Infect. Дис. 2018, 18, 1211–1228. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
2. Вордлоу, Т.; Салама, П.; Броклхерст, К.; Чопра, М.; Мейсон, Э. Диарея: почему дети все еще умирают и что можно сделать. Ланцет 2010, 375, 870–872. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
3. Коэн, Ал.; Платтс-Миллс, Дж.А.; Накамура, Т.; Операрио, диджей; Антони, С.; Мвенда, Дж. М.; Вельдегебриль, Г.; Рей-Бенито, Г.; де Оливейра, ЛХ; Ортис, К.; и другие. Этиология и частота диареи, требующей госпитализации, у детей в возрасте до 5 лет в 28 странах с низким и средним уровнем дохода: данные Глобальной сети эпиднадзора за диареей у детей. БМЖ Глоб. Здоровье 2022, 7, e009548. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
4. Котлофф, КЛ; Натаро, Япония; Блэквелдер, туалет; Насрин, Д.; Фараг, ТН; Панчалингам, С.; Ву, Ю.; Соу, ТАК; Сур, Д.; Брейман, РФ; и другие. Бремя и этиология диарейных заболеваний у младенцев и детей раннего возраста в развивающихся странах (Глобальное многоцентровое исследование кишечных заболеваний, GEMS): проспективное исследование «случай-контроль». Ланцет 2013, 382, 209–222. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
5. Операрио, диджей; Платтс-Миллс, Дж.А.; Надан, С.; Пейдж, Н.; Сехери, М.; Мфэхеле, Дж.; Прахарадж, И.; Канг, Г.; Араужо, ИТ; Лейте, JPG; и другие. Этиология тяжелой острой водянистой диареи у детей в глобальной сети эпиднадзора за ротавирусами с использованием количественной полимеразной цепной реакции. Дж. Заразить. Дис. 2017, 216, 220–227. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
6. Платтс-Миллс, Дж.А.; Лю, Дж.; Рогавский, ЕТ; Кабир, Ф.; Лерцеттакарн, П.; Сигуас, М.; Хан, СС; Прахарадж, И.; Мурей, А.; Ншама, Р.; и другие. Использование методов количественной молекулярной диагностики для оценки этиологии, бремени и клинических характеристик диареи у детей в условиях ограниченных ресурсов: повторный анализ когортного исследования MAL-ED. Ланцет Глоб. Здоровье 2018, 6, e1309–e1318. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
7. Дэвисон, Эй Джей; Бенко, М.; Харрах, Б. Генетический состав и эволюция аденовирусов. Дж. Генерал Вирол. 2003, 84, 2895–2908. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
8. Сето, Д.; Чодош Дж.; Бристер, младший; Джонс, М.С.; Члены исследовательского сообщества аденовирусов. Использование полногеномной последовательности для характеристики и названия аденовирусов человека. Дж. Вирол. 2011, 85, 5701–5702. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
9. Лайон Т. Аденовирусные инфекции у иммунокомпетентных и иммунокомпрометированных пациентов. Клини. Микробиол. Ред. 2014, 27, 441–462. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

10. Линч, Дж. П.; Каджон, А.Е. Аденовирус: эпидемиология, глобальное распространение новых серотипов и достижения в лечении и профилактике. *Семин. Дыхание. Крит. Уход Мед.* 2016, 37, 586–602. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
11. Ши, В.-Ж. Аденовирусные инфекции человека в педиатрической популяции — обновленная информация о клинико-патологической корреляции. *Биомед. Дж.* 2021, 45, 38–49. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
12. Ли, Б.; Дэймон, СФ; Платтс-Миллс, Дж. А. Детский острый гастроэнтерит, связанный с аденовирусом 40/41, в странах с низким доходом и Страны со средним уровнем дохода. *Курс. Мнение. Заразить. Дис.* 2020, 33, 398–403. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
13. Афрад, МХ; Авзун, Т.; Хак, Дж.; Хак, В.; Хоссейн, Мэн; Рахман, Арканзас; Ахмед, С.; Фарук, ПГС; Рахман, МЗ; Рахман, М. Обнаружение кишечных и неэнтеральных аденовирусов у пациентов с гастроэнтеритом, Бангладеш, 2012–2015 гг. *Дж. Мед. Вирол.* 2018, 90, 677–684. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
14. Кумтип, К.; Хамрин, П.; Ушиджима, Х.; Манекарн, Н. Кишечные и неэнтеральные аденовирусы, связанные с острым гастроэнтеритом у педиатрических пациентов в Таиланде, 2011–2017 гг. *PLoS ONE* 2019, 14, e0220263. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
15. Насименто, Л.Г.; Фиалхо, АМ; Андраде, JdSR; Ассис, RMS; Фумиан, Т.М. Кишечный аденовирус человека F40/41 как основная причина острого гастроэнтерита у детей в Бразилии, 2018–2020 гг. *Sci. Отчет* 2022, 12, 11220. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
16. Чжоу, Х.-Л.; Бесси, Т.; Ван, С.-М.; Мо, З.-Ж.; Барклай, Л.; Ван, Ж.-Х.; Чжан, С.-J.; Ма, Ж.-К.; Цю, К.; Чжао, Г.; и другие. Бремя и этиология умеренной и тяжелой диареи у детей в возрасте до 5 лет, живущих на севере и юге Китая: проспективное популяционное наблюдение. *Кишечный Патог.* 2021, 13, 33. [\[CrossRef\]](#)
17. Марш, К.; Тайлер, Р.; Поллок, Л.; Рой, К.; Лаха, Ф.; Хо, А.; Хендерсон, Д.; Дивала, Т.; Карри, С.; Йиррелл, Д.; и другие. Расследование случаев гепатита неизвестной этиологии среди детей раннего возраста, Шотландия, 1 января 2022 г. – 12 апреля 2022 г. *Euro Surveill.* 2022, 27, 2200318. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
18. Чжан Л.-Ю.; Хуанг, Л.-С.; Юэ, Ю.-Х.; Фаваз, Р.; Лим, Дж. К.; Фан, Ж.-Г. Острый гепатит неясного генеза у детей: ранний этап Наблюдения за вспышкой 2022 года. *Дж. Клин. Перевод Гепатол.* 2022, 10, 522–530. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
19. Гранд, Р.Дж. Патогенность и вирулентность аденовируса человека F41: возможные связи с тяжелым гепатитом у детей. *Вирулентность* 2023, 14, 2242544. [\[CrossRef\]](#)
20. Лю, Дж.; Грац, Дж.; Амур, К.; Ншама, Р.; Валонго, Т.; Маро, А.; Мдума, Э.; Платтс-Миллс, Дж.; Бойзен, Н.; Натаро, Дж.; и другие. Оптимизация количественных методов ПЦР для выявления энтеропатогенов. *PLoS ONE* 2016, 11, e0158199. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
21. Хернрот, Б.Е.; Конден-Ханссон, А.-К.; Ренштам-Хольм, А.-С.; Жиронес, Р.; Аллард, А.К. Факторы окружающей среды, влияющие на вирусные патогены человека и их потенциальные индикаторные организмы у голубых мидий, *Mytilus Edulis*: Первый скандинавский отчет. *Прил. Окружающая среда. Микробиол.* 2002, 68, 4523–4533. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
22. Аллард, А.; Альбинссон, Б.; Уодделл, Г. Быстрое типирование аденовирусов человека с помощью общей ПЦР в сочетании с анализом рестрикционной эндонуклеазы. *Дж. Клин. Микробиол.* 2001, 39. [\[CrossRef\]](#)
23. Ли, Л.; Симидзу, Х.; Доан, LTP; Тунг, П.Г.; Окицу, С.; Нисиро, О.; Сузуки, Э.; Со, Дж. К.; Ким, Канзас; Мюллер, WEG; и другие. Характеристика изолятов аденовируса типа 41 от детей с острым гастроэнтеритом в Японии, Вьетнаме и Корее. *Дж. Клин. Микробиол.* 2004, 42, 4032–4039. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
24. Сюй, В.; Макдонаф, МС; Эрдман, Д.Д. Видоспецифическая идентификация аденовирусов человека с помощью мультиплексного ПЦР-анализа. *Дж. Клин. Микробиол.* 2000, 38, 4114–4120. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
25. Ларкин, М.А.; Блэксилдс, Г.; Браун, Северная Каролина; Ченна, Р.; МакГеттиган, Пенсильвания; Маквилльям, Х.; Валентин, Ф.; Уоллес, ИМ; Вильм, А.; Лопес, Р.; и другие. Clustal W и Clustal X версии 2.0. *Биоинформатика* 2007, 23, 2947–2948. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
26. Стаматакис, А. RAxML Версия 8: Инструмент для филогенетического анализа и пост-анализа крупных филогений. *Биоинформатика* 2014, 30, 1312–1313. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
27. Миллер, Массачусетс; Пфайффер, В.; Шварц, Т. Создание научного портала CIPRES для вывода больших филогенетических деревьев. В материалах семинара по шлюзовым вычислительным средам (GCE) 2010 г., Новый Орлеан, Луизиана, США, 14 ноября 2010 г.; стр. 1–8. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
28. Тамура, К.; Стечер, Г.; Кумар, С. MEGA11: Молекулярно-эволюционно-генетический анализ, версия 11. *Mol. Биол. Эвол.* 2021, 38, 3022–3027. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
29. Лю, Дж.; Платтс-Миллс, Дж.А.; Джума, Дж.; Кабир, Ф.; Нкесе, Дж.; Окой, К.; Операрио, диджей; Уддин, Дж.; Ахмед, С.; Алонсо, Польша; и другие. Использование методов количественной молекулярной диагностики для выявления причин диареи у детей: повторный анализ исследования «случай-контроль» GEMS. *Ланцет* 2016, 388, 1291–1301. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
30. Сарменто, СК; де Андраде, JdSR; Мягостович, депутат; Фумиан Т.М. Вирусологические и эпидемиологические особенности норовируса. *Инфекции в Бразилии*, 2017–2018 гг. *Вирусы* 2021, 13, 1724. [\[CrossRef\]](#)
31. Гутьеррес, МБ; Фиалхо, АМ; Мараньян, АГ; Мальта, ФК; Андраде, JdSRd; Ассис, RMSd; Моута, Южная Корея; Мягостович, депутат; Лейте, JPG; Мачадо Фумиан, Т. Ротавирус А в Бразилии: молекулярная эпидемиология и надзор в 2018–2019 гг. *Патогены* 2020, 9, 515. [\[CrossRef\]](#)
32. Гелу, А.; Питч, К.; Либерт, У. Г. Генетическое разнообразие аденовируса человека и астровируса человека у детей с острым гастроэнтеритом на северо-западе Эфиопии. *Арх. Вирол.* 2019, 164, 2985–2993. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
33. Портал, ТМ; Реймао, ТКА; Киндере Нето, Джорджия; Фиуза, МКDC; Тейшейра, DM; Лима, ICG; Соуза Жуниор, ЕС; Бандейра, РДС; Де Деус, ДР; Хустино, МСА; и другие. Обнаружение и генотипирование кишечных вирусов у госпитализированных детей с острым гастроэнтеритом в Белене, Бразилия: встречаемость аденовирусной виремии по видам F, типам 40/41. *Дж. Мед. Вирол.* 2019, 91, 378–384. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

34. Примо, Д.; Пачеко, GT; Тиленецки, MdCST; Лучс, А. Наблюдение и молекулярная характеристика аденовируса человека у пациентов с острым гастроэнтеритом в эпоху ротавирусной вакцины, Бразилия, 2012–2017 гг. Дж. Клини. Вирол. 2018, 109, 35–40. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
35. Портес, ЮАР; Вولاتо, EdM; Роча, Миссисипи; Ребело, MC; Ксавье, MdPTR; Ассис, RMD; Роуз, TL; Мягостович, депутат; Лейте, JPG; Карвалью-Коста, Ф.А. Вспышка неэнтерального аденовируса A12 гастроэнтерита в Рио-де-Жанейро, Бразилия. Память Инст. Освальдо Круз 2016, 111, 403–406. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
36. Цю, Ф.-З.; Шен, Х.-Х.; Ли, Г.-Х.; Чжао, Л.; Чен, К.; Дуань, С.-Х.; Го, Ж.-Ю.; Чжао, М.-К.; Ян, Т.-Ф.; Ци, Ж.-Ж.; и другие. Аденовирус, связанный с острой диареей: исследование «случай-контроль». БМК Инфекция. Дис. 2018, 18, 450. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
37. Де Франческо, Массачусетс; Лоренцин, Г.; Мейни, А.; Шумахер, РФ; Карузо, А. Неэнтеральные аденовирусы, связанные с желудочно-кишечными заболеваниями. териит у госпитализированных детей. Микробиол. Спектр. 2021, 9, e0030021. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
38. Дхингра, А.; Хаге, Э.; Ганценмюллер, Т.; Бетчер, С.; Хофманн Дж.; Хампрехт, К.; Обермайер, П.; Рат, Б.; Хаусманн, Ф.; Добнер, Т.; и другие. Молекулярная эволюция видов аденовируса человека (HAdV) C. Sci. Отчет 2019, 9, 1039. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
39. Лукашев А.Н.; Иванова, О.Е.; Еремеева, Т.П.; Игго, Р.Д. Доказательства частой рекомбинации среди аденовирусов человека. Дж. Генерал Вирол. 2008, 89, 380–388. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
40. Робинсон, CM; Сингх, Г.; Ли, Ю; Деган, С.; Раджайя, Дж.; Лю, Э.Б.; Юсуф, Массачусетс; Бетенский, РА; Джонс, М.С.; Дайер, Д.В.; и другие. Молекулярная эволюция аденовирусов человека. наук. Отчет 2013, 3, 1812. [\[CrossRef\]](#) [\[ПабМед\]](#)
41. Геттинг Дж.; Кордес, АК; Штайнбрюк, Л.; Хейм, А. Молекулярная филогения линий аденовируса человека 41 типа. Вирус Эвол. 2022, 8, veac098. [\[Перекрестная ссылка\]](#)
42. Мэйс, М.; Хохар, Ф.; Уилкинсон, SAJ; Смит, AD; Коваленко Г.; Дуган, Г.; Квик, Дж.; Ломан, Нью-Джерси; Бейкер, С.; Карран, доктор медицины; и другие. Мультиплексное секвенирование MinION предполагает генетическое разнообразие кишечного аденовируса F41, сравнимое с эпохой до COVID-19. Микроб. Геномика 2023, 9, mgen000920. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
43. Ламбизия, AW; Макори, ТО; Мутунга, М.; Черуйот, Р.; Мурунга, Н.; Квик, Дж.; Гитинджи, Г.; Ноукс, диджей; Хоулдрокфорт, CJ; Аготи, CN. Геномная эпидемиология аденовирусов человека F40 и F41 в прибрежной Кении: ретроспективное исследование на базе больницы (2013–2022 гг.). Вирус Эвол. 2023, 9, vead023. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
44. Чандра, П.; Ло, М.; Митра, С.; Банерджи, А.; Саха, П.; Окамото, К.; Деб, АК; Гош, СК; Манна, А.; Дутта, С.; и другие. Генетическая характеристика и филогенетические вариации штаммов аденовируса F человека, циркулирующих в Восточной Индии в 2017–2020 гг. Дж. Мед. Вирол. 2021, 93, 6180–6190. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
45. Санчес, ЛХГ; Шиая, Х.; Бейкер, Дж. М.; Саайби, С.; Бухфелльнер, М.; Бритт, В.; Санчес, В.; Поттер, Дж.Л.; Ингрэм, Луизиана; Келли, Д.; и другие. Серия случаев детей с острым гепатитом и аденовирусной инфекцией человека. Н. англ. Дж. Мед. 2022, 387, 620–630. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
46. Келгери, К.; Купер, М.; Гупте, Г.Л.; Брант, А.; Патель, М.; Йохансен, Л.; Валампарампил, Дж.; Онг, Э.; Хартог, Х.; Перера, МТРР; и другие. Клинический спектр детей с острым гепатитом неустановленной этиологии. Н. англ. Дж. Мед. 2022, 387, 611–619. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
47. Морфопулу, С.; Баддл, С.; Торрес Монтагут, штат Огайо; Аткинсон, Л.; Герра-Ассунсан, Ж.А.; Моради Марджане, М.; Зеннезини Кьоцци, Р.; Стори, Н.; Кампос, Л.; Хатчинсон, Дж. К.; и другие. Геномные исследования необъяснимого острого гепатита у детей. Природа 2023, 617, 564–573. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
48. Фан Дж.; Эслик, Грузия; Эллиотт, Э.Дж. Демистифицируя глобальную вспышку тяжелого острого гепатита неизвестной этиологии у детей: Систематический обзор и метаанализ. Дж. Заразить. 2024, 88, 2–14. [\[Перекрестная ссылка\]](#) [\[ПабМед\]](#)
49. Мартин, Н.А.; Гонсалес, Г.; Рейнольдс, CJ; Беннетт, К.; Кэмпбелл, К.; Нолан, ТМ; Бирн, А.; Феннема, С.; Холохан, Н.; Кунтамукула, CP; и другие. Аденоассоциированный вирус 2 и аденовирус человека F41 в сточных водах во время вспышки тяжелого острого гепатита у детей, Ирландия. Экстрен. Заразить. Дис. 2023, 29, 751–760. [\[Перекрестная ссылка\]](#)

Отказ от ответственности/Примечание издателя: Заявления, мнения и данные, содержащиеся во всех публикациях, принадлежат исключительно отдельному автору(ам) и соавтору(ам), а не MDPI и/или редактору(ам). MDPI и/или редактор(ы) не несут ответственности за любой вред людям или имуществу, возникший в результате любых идей, методов, инструкций или продуктов, упомянутых в контенте.