



Artículo

Evaluación de qPCR para la detección selectiva de entéricos Adenovirus seguido de genética basada en secuencias

Caracterización de las cepas F circulantes en Brasil

Lilian Gonçalves do Nascimento y Tulio Machado Fumian ^{*}, Sylvia Kahwage Sarmento [†], Reinaldo Röpke Junior [†]

Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental, Instituto Oswaldo Cruz, Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz), Av. Brasil 4365, Río de Janeiro 21040-360, RJ, Brasil; liliang.nascimento@gmail.com (LGdN); syl_kahwage@yahoo.com.br (SKS); reirope@hotmail.com (RRJ)

^{*} Correspondencia: fumiantm@gmail.com o tuliomf@ioc.fiocruz.br

[†] Estos autores contribuyeron igualmente a este trabajo y comparten la primera autoría.

Resumen: El adenovirus humano (HAdV) F40/41 es un patógeno importante en los casos de gastroenteritis aguda pediátrica. Sin embargo, la diversidad de diseños de estudios y métodos de diagnóstico a menudo conduce a interpretaciones erróneas de su impacto. Nuestro estudio exploró la diversidad genética de HAdV-F40/41 en Brasil utilizando un ensayo de qPCR específico para HAdV especie F, combinado con un análisis filogenético de los genes parciales de hexón y fibra. Nuestros resultados demostraron que las cepas HAdV-F41 predominaron y exhibieron una mayor diversidad que las cepas HAdV-F40. Con base en el gen hexón, las cepas brasileñas de HAdV-F41 se agruparon en dos grupos de tipos de genoma (GTC), divididos a su vez en subgrupos, y la mayoría de las cepas se agruparon en GTC2. La región del eje parcial del gen de la fibra exhibió una mayor conservación entre HAdV-F41. El ensayo de qPCR específico para la especie F de AdVH identificó AdVH-F en un 31,5 % adicional (34/108) de las muestras positivas para AdVH no caracterizadas previamente detectadas mediante un ensayo de qPCR de AdVH no específico. Ambos ensayos están fuertemente correlacionados en la detección de HAdV-F, y el ensayo qPCR específico para tipos entéricos puede mejorar la vigilancia de HAdV, especialmente cuando no es posible la secuenciación. Nuestro estudio proporciona conocimientos novedosos sobre la diversidad genética de las especies HAdV-F en

Palabras clave: gastroenteritis aguda; HAdV entéricos; diversidad genética; análisis filogenético; PCRq; Brasil



Cita: Nascimento, LGd;

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

TM Evaluación de qPCR para la detección selectiva de entéricos

Adenovirus seguido de

Genética basada en secuencias

Caracterización de cepas F

Circulando en Brasil. *Aplica. Microbiol.* 2024, 4,

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

applmicrobiol4030069

Editor académico: Ian Connorton

Recibido: 31 de mayo de 2024

Revisado: 24 de junio de 2024

Aceptado: 24 de junio de 2024

Publicado: 27 de junio de 2024



Copyright: © 2024 por los autores.

Licenciario MDPI, Basilea, Suiza.

Este artículo es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos y

condiciones de los Creative Commons

Licencia de atribución (CC BY)

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

1. Introducción

La gastroenteritis aguda (AGE) es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños menores de cinco años, especialmente en países de ingresos bajos y medios (PIBM), donde el acceso adecuado a la atención sanitaria, la higiene y la educación suele ser limitado [1,2]. Los estudios realizados en países de ingresos bajos y medianos para detectar múltiples enteropatógenos han detectado rotavirus, norovirus y adenovirus humano (HAdV) F40/41 como los principales patógenos entéricos detectados en pacientes pediátricos con GEA [3-6].

HAdV, miembros de la familia Adenoviridae (género Mastadenovirus), son virus de ADNbc lineales sin envoltura con un genoma de ~ 35 kpb [7]. Según análisis genómicos y bioinformáticos, HAdV se divide actualmente en siete especies con más de 100 tipos caracterizados (hadvwg.gmu.edu/, consultado el 16 de noviembre de 2023) [8]. Los diferentes tipos de HAdV exhiben diferentes tropismos tisulares, lo que resulta en una amplia gama de síntomas clínicos. En individuos inmunocompetentes, los síntomas suelen ser leves y provocan infecciones respiratorias, gastrointestinales y conjuntivales autolimitadas. La enfermedad grave suele afectar a personas inmunocomprometidas, lo que da lugar a infecciones persistentes y generalizadas que también pueden afectar el tracto genitourinario, el hígado, el sistema nervioso central y el sistema cardiovascular.

La especie F comprende dos tipos bien establecidos (HAdV-40 y -41), que se conocen como HAdV entérico debido a su tropismo por el tracto gastrointestinal y su asociación con AGE. Durante muchos años se subestimó la importancia del AdVH en la AGE pediátrica.

Sin embargo, el uso de técnicas de detección molecular como método de diagnóstico ha revelado su contribución sustancial a la carga global de AGE pediátrica [12]. En un estudio reciente en países de ingresos bajos y medianos, la Red Mundial de Vigilancia de la Diarrea Pediátrica identificó al HAdV-F40/41 como el segundo patógeno más frecuente detectado en niños menores de cinco años con AGE, detrás del rotavirus [3]. Como se pueden detectar diferentes tipos de HAdV en muestras de heces, estudios regionales en todo el mundo han informado una amplia gama de tasas de positividad de HAdV (tipos entéricos y no entéricos), con tasas que van desde el 1,6% hasta el 39,1% [13-16]. El amplio rango en las tasas de positividad de HAdV se debe a múltiples factores, incluido el diseño del estudio, el alcance, los métodos de diagnóstico, las variaciones regionales y temporales y la introducción de la inmunización contra rotavirus [5,6].

Hasta principios de 2022, HAdV-F era un patógeno pediátrico importante en los casos de GEA, pero su diversidad genómica seguía siendo poco comprendida. En marzo de ese año se detectaron múltiples casos de hepatitis grave de origen desconocido en niños inmunocompetentes. Investigaciones adicionales revelaron varios casos que se remontan a octubre de 2021 en más de 40 países [17,18].

La alta tasa de detección de HAdV-F41 y la posibilidad de una asociación clínica de F41 con hepatitis grave de origen desconocido aumentaron la urgencia de realizar estudios de filogenia molecular más completos para comprender mejor la evolución de la especie F, identificar nuevas cepas emergentes y obtener más datos para el desarrollo de vacunas [19].

El conocimiento sobre la diversidad genómica del HAdV-F40/41 y su contribución real a los casos de AGE, particularmente en Brasil, sigue siendo limitado. Para abordar esta brecha de investigación, nuestro estudio tuvo como objetivo evaluar la eficacia de un protocolo de reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa (qPCR) específico de la especie F para determinar el verdadero impacto del HAdV entérico en los casos de AGE. Además, realizamos una secuenciación y un análisis filogenético molecular de seis regiones hipervariables del gen hexon, junto con una secuenciación parcial de la región del eje del gen de la fibra de cepas HAdV-F40/41 detectadas en pacientes con AGE, para proporcionar información sobre la diversidad genética de la especie F en Brasil.

2. Materiales y métodos

2.1. Colección de heces y declaración de ética

Este estudio incluyó muestras de heces positivas para AdVH recolectadas entre enero de 2018 y diciembre de 2020 de pacientes hospitalizados y ambulatorios (niños y adultos) con síntomas de AGE, como se describió anteriormente [15]. La AGE se definió como la aparición repentina de diarrea ($\geq$ tres evacuaciones líquidas o semilíquidas en 24 h) que puede ir acompañada de fiebre, náuseas, vómitos o dolor abdominal. Las muestras de heces se enviaron sistemáticamente al Laboratorio Regional de Referencia de Rotavirus: Laboratorio de Virología Comparada y Ambiental (RRRL-LVCA) a través de sitios centinela en los Laboratorios Centrales de los Estados. El RRRL-LVCA forma parte de la red nacional de vigilancia de rotavirus, supervisada por la Coordinación General de Laboratorios de Salud Pública del Ministerio de Salud (MS).

Este estudio fue aprobado por el Comité de Ética de la Fundación Oswaldo Cruz (Fiocruz) (número de aprobación CAEE: 94144918.3.0000.5248). La vigilancia se realizó a través de una red jerárquica en la que las muestras fueron proporcionadas por solicitud médica en hospitales y centros de salud, monitoreados por el Sistema Único de Salud (SUS). Este estudio se realizó en el ámbito del RRRL/MoH como parte de una política federal de salud pública para la vigilancia de AGE virales en Brasil. El Comité de Ética de Fiocruz renunció al consentimiento informado del paciente y los datos de los pacientes se mantuvieron de forma anónima y segura.

2.2. Extracción de ADN viral

Las extracciones de ácidos nucleicos se realizaron a partir de 140 μ L de suspensión de heces clarificada (10 % p/v) con el kit QIAamp Viral Mini (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) en la plataforma automatizada QIAcube, siguiendo las instrucciones del fabricante. Los ácidos nucleicos virales extraídos se eluyeron en 60 μ L del tampón de elución AVE y se almacenaron inmediatamente a -80°C hasta el análisis molecular. Se utilizó agua libre de RNasa/DNasa como control negativo en cada protocolo de extracción.

2.3. Detección y cuantificación de HAdV-F

Se utilizó un ensayo qPCR específico para HAdV-F [20] para detectar los tipos entéricos F40 y F41 en muestras que previamente habían dado positivo para HAdV usando un conjunto degenerado de cebadores y una sonda dirigida a una región conservada de la primera parte del hexón del adenovirus. gen [21]. Anteriormente se describió información detallada sobre los métodos iniciales de detección y cuantificación de HAdV [15].

El ensayo qPCR específico para la detección de HAdV entérico [20], dirigido a una secuencia conservada de 118 pb del gen de la fibra HAdV-F, se llevó a cabo utilizando el cebador directo (5-AACTTTCTCTCTTAATAGACGCC-3); cebador inverso (5-AGGGGGCTAGAAACAAAA- 3) y sonda (5-CTGACACGGCACTCT-3). Brevemente, las reacciones de qPCR HAdV-F se realizaron con 5 µl del ADN extraído en un volumen final de 20 µl, que contenía 10 µl del kit de PCR QuantiTect Probe 2x (Qiagen, Valencia, CA, EE. UU.) y cebadores y sonda con concentraciones finales de 0,5 µM y 0,25 µM, respectivamente. Las reacciones se realizaron en el sistema de PCR en tiempo real Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en las siguientes condiciones de ciclo térmico: 2 min a 50 °C, 15 min a 95 °C, 40 ciclos de 15 s a 95 °C, y 1 min a 60 °C. Las muestras que exhibieron una curva sigmoidea característica y cruzaron la línea del umbral con un valor de umbral del ciclo (Ct) <40 se consideraron positivas. Todas las series incluyeron controles negativos y positivos (muestra de heces), así como un control sin plantilla.

2.4. Diversidad genética de AdVH-F y secuenciación de

nucleótidos Para evaluar la diversidad genética de las cepas de AdVH-F que circulan en Brasil, se resecuenciaron muestras positivas inicialmente caracterizadas como tipos F40 y F41 [22]. Nos dirigimos a las seis regiones hipervariables (HVR1-HVR6) del gen hexon utilizando los cebadores S29 y S52 [23] y a la región del eje parcial del gen de fibra larga utilizando los cebadores AdF1 y AdF2 [24]. Las reacciones de PCR se realizaron utilizando la enzima Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, EE. UU.), con 5 µL de ADN extraído en un volumen de reacción final de 25 µL. Los amplicones esperados de 640 y 664 nt para el gen hexon y 508 y 530 nt para el gen de fibra para los tipos F40 y F41, respectivamente, se purificaron utilizando el kit de extracción en gel QIAquick (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante. Las reacciones de secuenciación de los amplicones purificados se realizaron utilizando el kit de reacción listo para secuenciación de ciclo Big Dye Terminator v. 3.1 en un analizador genético ABI Prism 3730 xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, EE. UU.) en la Plataforma genómica institucional de Fiocruz para la secuenciación de ADN (PDTIS).

2.5. Análisis filogenético y de mutaciones de F40/41. El

análisis de cromatograma y las secuencias de consenso se obtuvieron utilizando el software Geneious Prime 2021.1.1 (Biomatters Ltd., Auckland, Nueva Zelanda). Las secuencias de hexones y fibras nt de los tipos F40 y F41 se analizaron en términos de identidad más cercana con las secuencias disponibles en la base de datos GenBank utilizando la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/explosion.cgi>, consultado el 5 de mayo de 2023). Las secuencias se alinearon utilizando ClustalW [25], y el método de máxima verosimilitud (ML) se utilizó para el análisis filogenético utilizando el programa aleatorio Accelerated Maximum Likelihood (RAxML) [26] con el modelo general reversible en el tiempo (GTR) con distribución gamma. tasa de heterogeneidad entre sitios y 1000 iteraciones de arranque para genes de hexones y fibras, accesibles en CIPRES Science Gateway [27]. El resultado de las ejecuciones RAxML se utilizó en MEGA11 v11.0.13 [28] para visualizar y construir los árboles filogenéticos. Las secuencias de referencia se obtuvieron de la base de datos GenBank del Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Además, para investigar la diversidad genética de las cepas brasileñas de HAdV-F, se compararon mutaciones sinónimas y no sinónimas en las porciones secuenciadas de los genes de hexón y fibra con cepas prototipo obtenidas de la base de datos GenBank.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas en este estudio se depositaron en la base de datos GenBank con los siguientes números de acceso: OQ442226 – OQ442299.

2.6. Análisis estadístico

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 9.0.0. (GraphPad Software, San Diego, CA, EE. UU.; www.graphpad.com, consultado el 15 de octubre 2023). Se utilizó la prueba U de Mann-Whitney para evaluar diferencias significativas entre qPCR protocolos. Se emplearon pruebas de chi-cuadrado o exacta de Fisher para analizar categorías características en tablas de contingencia y la correlación de los valores de Ct entre qPCR para AdvHA (todos los tipos) y qPCR específica para AdvHA-F se evaluaron mediante la correlación de Pearson coeficiente. Para todos los análisis, un valor de $p < 0,05$ se consideró estadísticamente significativo.

3. Resultados

3.1. Detección de HAdV-F40/41 mediante un ensayo de qPCR específico

En nuestro estudio anterior, realizado con muestras recolectadas entre enero de 2018 y En diciembre de 2020, investigamos el papel del AdvH entre pacientes con AGE en Brasil. Inicialmente, empleamos un conjunto de cebadores de qPCR degenerado dirigido a una región conservada del gen hexon (qPCR_HAdV) para detectar la presencia de HAdV en un total de 1235 muestras de heces. Se secuenciaron muestras positivas con valores bajos de Ct para caracterizar aún más las especies de HAdV y tipos, con el 39% (123/315) de las muestras positivas para AdvH secuenciadas con éxito [15].

En el presente estudio, utilizamos un protocolo de qPCR con cebadores específicos HAdV-F40/41. (qPCR_HAdV-F) en el 91% de las muestras previamente secuenciadas (112/123). Usando el qPCR_HAdV-F Según el protocolo, se detectaron especies F en el 93,5% (43/46) de las muestras secuenciadas previamente identificadas como tipos entéricos F40 y F41 y en el 4,5% (3/66) de las muestras previamente identificadas. como HAdV no entéricos. Tres muestras originalmente caracterizadas como pertenecientes a la especie C dieron positivo para la especie F, mientras que tres muestras caracterizadas como pertenecientes a la especie F dio negativo usando qPCR_HAdV-F (Tabla 1).

Tabla 1. Comparación entre los ensayos de qPCR degenerados de HAdV y específicos de F.

Clasificación HAdV	qPCR degenerada por HAdV ¹	qPCR HAdV-F		Positividad (%)
	Nº de muestras analizadas positivas para AdvH	Positivo	Negativo	
tipos entéricos	46	43	3	93,5
Tipos no entéricos	66	3	63	4.5
HAdV no secuenciado	108	34	74	31,5
Total	220	80	140	36.4

¹ Para la comparación del protocolo qPCR, la tabla muestra los resultados originales de la caracterización de HAdV para el sistema seleccionado. muestras, como se publicó anteriormente [15].

Además, utilizamos el ensayo qPCR_HAdV-F para el grupo de muestras positivas para HAdV. que no se pudieron secuenciar debido a la baja detección viral (generalmente muestras detectadas con CT > 30). Entre las muestras positivas para HAdV no secuenciadas detectadas previamente con el qPCR_HAdV, detectamos HAdV-F en el 31,5% de las muestras (34/108) con el nuevo protocolo (Tabla 1).

Para evaluar la eficiencia del ensayo qPCR_HAdV-F, comparamos los valores de Ct obtenidos utilizando ambos ensayos para cada muestra en el grupo positivo para HAdV-F (n = 80). Dispersión Se realizaron gráficos y análisis de regresión en cada muestra para determinar la correlación entre los valores de Ct para los dos ensayos. Un coeficiente de correlación de Pearson de 0,96. ($p < 0,0001$) indica una fuerte correlación (valor $r = 1$) entre la carga viral estimada obtenida mediante el ensayo qPCR_HAdV-F y el ensayo qPCR_HAdV (Figura 1a). Para cada imprimación conjunto, el 66,3% de las muestras analizadas (53/80) exhibieron eficiencias de amplificación por PCR similares (Ct 2,5 ciclos) (Figura 1b). Las eficiencias de PCR estimadas correspondieron a un promedio de Valores de 1,75 Ct entre los Δ Cts de las muestras, que oscilaron entre 0,04 y 8,09. Solo tres las muestras mostraron un Δ Ct superior a 5,0 Ct. Para evaluar el rendimiento del conjunto de cebadores específicos de HAdV-F, comparamos los valores de Ct obtenidos por qPCR_HAdV-F y qPCR_HAdV. ensayos en cada muestra positiva para HAdV-F. En el 48,75% (39/80) de las muestras analizadas, los valores de Ct para la especie, los cebadores específicos de F fueron más bajos, lo que sugiere que los cebadores específicos de HAdV-F

cies (Ct 2,5 ciclos) (Figura 1b). Las eficiencias de PCR estimadas correspondieron a un promedio de valores de 1,75 Ct entre los Δ Cts de las muestras, que oscilaron entre 0,04 y 8,09. Sólo tres muestras mostraron un Δ Ct superior a 5,0 Ct. Para evaluar el rendimiento del conjunto de cebadores específicos de HAdV-F, comparamos los valores de Ct obtenidos mediante los ensayos qPCR_HAdV-F y qPCR_HAdV en cada muestra positiva de HAdV-F. En el 48,75% (39/80) de las muestras analizadas, los valores de Ct para los cebadores específicos de la especie F fueron más bajos, lo que sugiere que los cebadores específicos de HAdV-F pueden detectar una carga viral más alta para la misma muestra en comparación con el decano . detectar una carga viral más alta para la misma muestra en comparación con los cebadores degenerados generar cebadores (Figura 1c). Al comparar los valores de Ct de la muestra positiva para HAdV (Figura 1c). Al comparar los valores de Ct de las muestras positivas para HAdV previamente detectadas por qPCR_HAdV y no secuenciadas, observamos que los valores de Ct detectados por qPCR_HAdV-F fueron significativamente más bajos detectados por qPCR_HAdV-F en las muestras positivas para HAdV-F. En la comparación de las muestras positivas para HAdV-F detectadas por el ensayo qPCR_HAdV-F usando muestras degeneradas con muestras positivas para HAdV no F detectadas por qPCR_HAdV usando cebadores degenerados, los valores medios de Ct de 35,9 y 36,6, respectivamente. Esto indica una mayor virulencia de HAdV-F detectada por qPCR_HAdV-F en comparación con qPCR_HAdV. Este indica una mayor excreción de carga viral en muestras de heces de pacientes detectados con tipos entericos de AdvHA (Figura 1d).

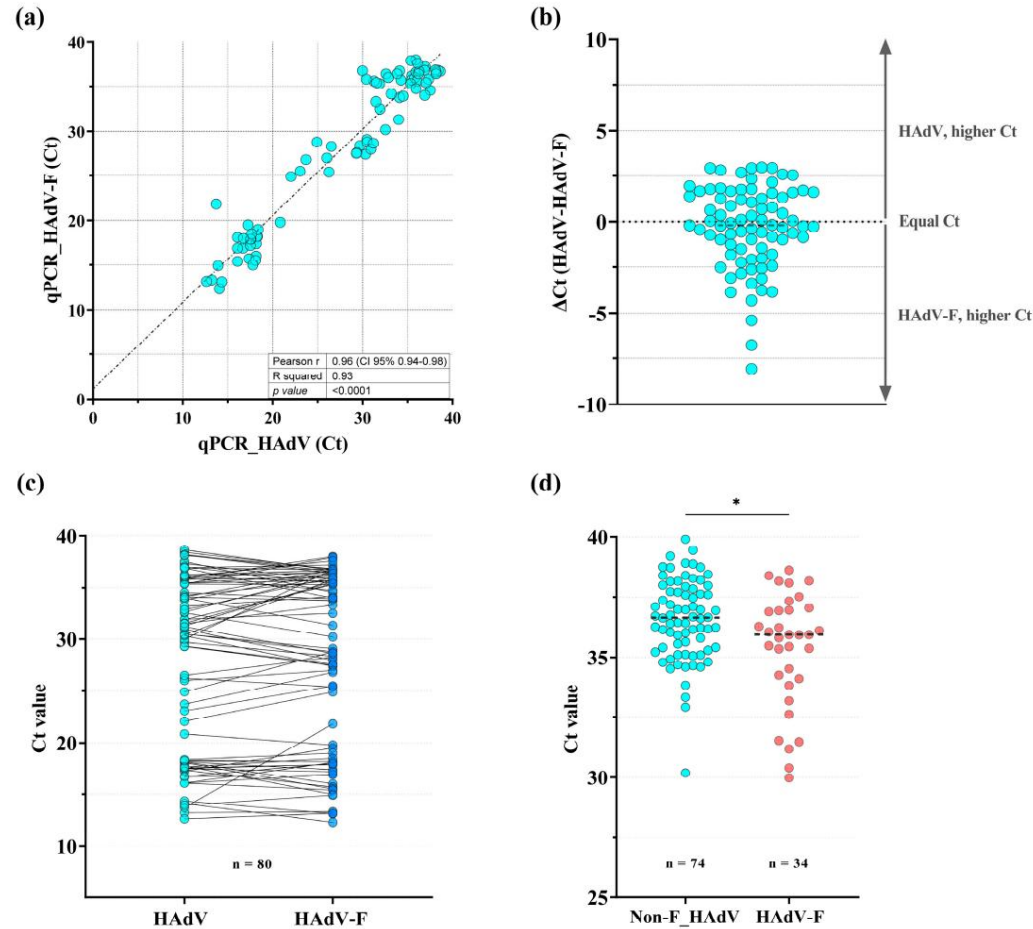


Figura 1. (a) Diagrama de dispersión de valores de Ct comparativos que muestran la correlación entre los valores de Ct detectados por qPCR_HAdV-F y qPCR_HAdV para muestras positivas para HAdV-F (n = 80) utilizando un conjunto de cebadores degenerados para HAdV (qPCR_HAdV) y un conjunto de cebadores específicos de HAdV-F (qPCR_HAdV-F). El coeficiente de correlación de Pearson indica la fuerza de dependencia lineal entre los diferentes ensayos de qPCR. (b) Diferencia Δ Ct entre qPCR_HAdV-F y valores de Ct del ensayo qPCR_HAdV para muestras positivas para HAdV-F con Ct <40 (n = 80). Cada punto azul representa una sola muestra. La línea discontinua indica el punto en el que la diferencia en los valores de Ct encontrado en cada ensayo de qPCR es igual a cero (Δ Ct = 0). (c) Comparación pareada de los valores de qPCR Ct obtenidos utilizando qPCR_HAdV y qPCR_HAdV-F para cada muestra positiva HAdV-F (Ct <40), representada por puntos de color azul claro y oscuro, respectivamente. (d) Comparación de los valores de Ct entre HAdV-F negativos (azul puntos) y HAdV-F-positivo (puntos rojos) en las muestras no secuenciadas detectadas por qPCR_HAdV y qPCR_HAdV-F, respectivamente. La línea discontinua horizontal indica los valores medianos de Ct. * p $\leq$ 0,05.

3.2. Análisis filogenético de genes de fibra y hexón HAdV-F

Entre el 43,9% (54/123) de las muestras previamente caracterizadas como HAdV-F, según una región conservada del gen hexon [15], secuenciamos con éxito el 70% (7/10) del muestras F40 y el 68,2% (30/44) de las muestras F41 en este estudio para el HVR1-HVR6 del gen hexón. Además, también amplificamos la región del eje parcial del gen de la fibra larga en El 100% (10/10) de las muestras F40 y el 61,4% (27/44) de las F41.

3.2.1. Gen hexón

El análisis filogenético HVR1-HVR6 de las cepas brasileñas reveló que la Las cepas F40 estaban más conservadas que las cepas F41. Las siete cepas F40 agrupadas juntos, compartiendo >99% de identidad de nucleótidos (nt). Además, las regiones HVR1-HVR6 de Las cepas F40 mostraron >99% de identidad nt con las regiones correspondientes del gen hexon de la cepa prototipo Dungan (AB330121), y a cepas detectadas previamente en Brasil (MT791000), India (KU884615, MT952448), Finlandia (KU162869), Sudáfrica (MK955319),⁷ y China (MK883611) (Figura 2).

Aplica. Microbiol. 2024, 4, 1021; https://doi.org/10.3390/apm4041021



Figura 2. Árbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de las regiones hipervariables (HVR1-HVR6) del gen hexón. Las cepas HAdV-F40 y -F41 aisladas en este estudio se indican con un círculo relleno de naranja y rojo, respectivamente. Las cepas de referencia se descargaron del repositorio de GenBank y se etiquetaron con su número de acceso/tipo de HAdV/año de recolección/ID del aislado/país.

un círculo relleno de naranja y rojo, respectivamente. Las cepas de referencia se descargaron del repositorio Gen-Bank y se etiquetaron con su número de acceso/tipo de HAdV/año de colección/ID del aislado/país. Las cepas prototipo para los tipos F40 y F41 están marcadas con un diamante negro. El árbol filogenético se construyó utilizando el método de máxima verosimilitud utilizando el programa aleatorio Axelerated Maximum Likelihood (RAxML), con el modelo general reversible en el tiempo (GTR) con una tasa de heterogeneidad distribuida gamma entre sitios y 1000 iteraciones de arranque, y el software MEGA11 v11.0.13 (Auckland, Nueva Zelanda) para construir y visualizar el árbol. Los valores porcentuales de arranque de $\geq 70\%$ se muestran en cada punto de ramificación. Los grupos y subgrupos de tipo genoma hexón (H-GTC) están indicados para las cepas F41.

El análisis filogenético de HVR1-HVR6 en las cepas F41 mostró que las secuencias brasileñas se agruparon en dos linajes diferentes, H-GTC1 y H-GTC2 (H-GTC: grupo de tipo genoma basado en el gen hexon). Entre ellas, el 20 % (6/30) de las cepas se agruparon en H-GTC1, mientras que el 80 % (24/30) se agruparon en H-GTC2 (Figura 2). En términos de identidad entre los aislados brasileños, las cepas H-GTC2 mostraron un rango de variación ligeramente más amplio (95,9–100 % de identidad nt) en comparación con las cepas H-GTC1 (96,2–100 % de identidad nt). Con respecto al prototipo TAK (DQ315364), H-GTC2 (92,4–93,5% de identidad nt) mostró un mayor grado de divergencia que H-GTC1 (96,5–99,8% de identidad nt).

Un análisis más detallado reveló que H-GTC1 se subdividió en tres subgrupos. H-GTC1.1 con una cepa representativa (LVCA_30376), que se agrupó con cepas detectadas en Asia (MK342151 y KT210193), Europa (OP174923, ON532825 y MW567963) y Sudáfrica (MK962806), compartiendo $>99\%$ nt identidad. Cuatro cepas se agruparon en H-GTC1.2 y exhibieron una identidad nt máxima ($>99\%$) con cepas de China (HM565136 y MH465394) y Japón (AB103345). H-GTC1.3 tenía una única cepa representativa (LVCA_30088), que se agrupaba con cepas de países asiáticos (AB103347, MT952499 y DQ336391) y Estados Unidos (ON565007), mostrando $>99\%$ de identidad nt.

Las cepas H-GTC2 se segregaron en dos subgrupos, y H-GTC2.2 alberga la mayoría de las secuencias. Las identidades de nt compartidas oscilaron entre el 98,4 % y el 100 % con cepas de China (KY316161), Japón (LC726493), Sudáfrica (MK962810), Suecia (KX868523) y Estados Unidos (KF303069). Finalmente, una secuencia (LVCA_29342) se agrupó en H-GTC2.1, compartiendo una identidad nt máxima ($>98\%$) con cepas de países asiáticos (AB610522, AB610527, KT210190 y MT952501) y Estados Unidos (ON56501).

3.2.2. Gen de fibra

La región del eje parcial del gen de la fibra estaba más conservada que el gen del hexón, entre las secuencias de los tipos F40 y F41. Las diez cepas brasileñas F40 se agruparon, mostrando una similitud nt de $>99\%$. La región analizada del gen de la fibra exhibió una identidad de secuencia nt máxima de $>98\%$ con la cepa de referencia Dungan (L19443) y con cepas detectadas en Finlandia (KU162869), India (KU884631 y MT952560) y Sudáfrica (MK955316). (Figura 3).

Las cepas brasileñas F41 compartieron $>98\%$ de identidad nt con la cepa prototipo TAK (DQ315364) y se agruparon en dos grupos genéticos (F-GTC: grupo de tipo de genoma basado en el gen de la fibra). Dentro del grupo F-GTC1, ninguna cepa se agrupó con el subgrupo F-GTC1.1. Una cepa brasileña (LVCA_29630) se agrupó en el subgrupo F-GTC1.2, mientras que otras tres cepas se agruparon en el subgrupo F-GTC1.3, mostrando identidades nt máximas ($>99\%$) con cepas de China (KY316160, MT150355 y AB610544) y Japón (AB610540 y AB246870). Todas las demás cepas brasileñas F41 ($n = 23$) se agruparon en F-GTC2 (subgrupo F-GTC2.1) y compartieron identidades nt que oscilaron entre el 91,2% y el 100% en comparación con los otros grupos. La identidad nt máxima ($>99\%$) se observó con cepas de Sudáfrica (MK962809), el Reino Unido (OP174926), Irak (MG925782) y Alemania (ON532825 y KX868523). (Figura 3). Curiosamente, ninguna cepa brasileña se agrupó en el subgrupo F-GTC2.2.



Figura 3. Árbol filogenético basado en la secuencia de nucleótidos de la región del eje parcial del gen de la fibra. Las cepas HAdV-F40 y -F41 aisladas en este estudio se indican con un círculo relleno de naranja y rojo , respectivamente. Las cepas de referencia se descargaron del repositorio de GenBank y se etiquetaron con su número de acceso/tipo de HAdV/año de colección/ID del aislado/país. Las cepas prototipo para los tipos F40 y F41 están marcadas con un diamante relleno de negro. El árbol filogenético se construyó utilizando el método de máxima verosimilitud utilizando el programa Randomized Axelerated Maximum Likelihood (RAXML), con el modelo general reversible en el tiempo (GTR) con una tasa de heterogeneidad distribuida gamma entre sitios y 1000 iteraciones de arranque, y el software MEGA11 v11. Se utilizó 0,13 para construir y visualizar el árbol. Los valores porcentuales de arranque de $\geq 70\%$ se muestran en cada punto de ramificación. Los grupos y subgrupos de tipos de genoma de fibra (F-GTC) están indicados para las cepas F41.

3.3. Análisis de mutaciones del hexón y de la proteína de fibra de las cepas HAdV-F que circulan en Brasil 3.3.1. Gen hexón

Las cepas brasileñas HAdV-F40 detectadas estaban en su mayoría conservadas entre sí dentro de HVR1-HVR6. Una muestra (LVCA_29219) mostró una mutación de transversión (G850T), que resultó en un cambio de aminoácido de alanina (A) a serina (S). Comparado con el Dungan

prototipo, todas las cepas brasileñas albergaban una mutación que resultó en un cambio de aminoácido [serina (S) a leucina (L) (C488T)] (Figura 4).

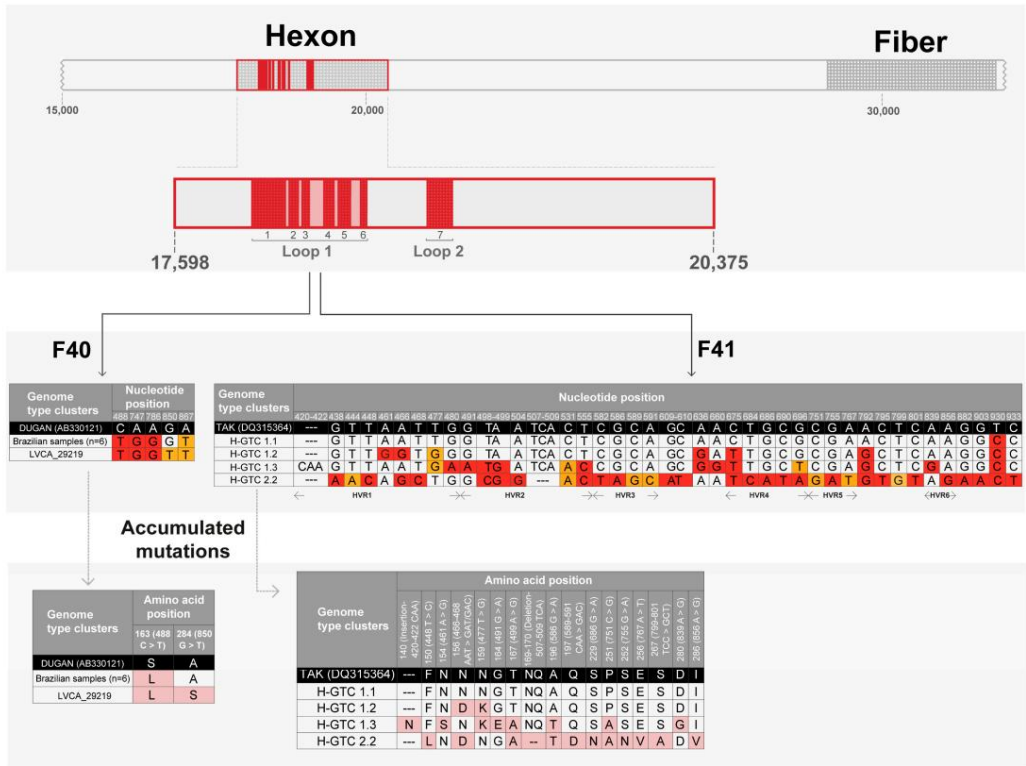


Figura 4. Genoma de HAdV con la proteína hexón representativa del tamaño TAK (DQ315364) del prototipo F41 (2778 nt) que muestra los HVR. Posiciones de nucleótidos de mutaciones sinónimas acumuladas con sus mutaciones de aminoácidos acumuladas en el HVR1-HVR6 del hexón en comparación con la cepa prototipo Dungan (L19443) y TAK (DQ315364) para los tipos F40 y F41, respectivamente. Las mutaciones de transición y transversión están resaltadas en rojo y naranja, respectivamente. Las mutaciones de aminoácidos están resaltadas en rosa. La posición del nucleótido definida en la figura se refiere a la región codificante de los cebadores dentro de HVR1-HVR6 (posición 289–967 nt en el gen hexón).

Por el contrario, las cepas F41 acumularon numerosas mutaciones sinónimas y no sinónimas. Sólo una muestra (LVCA_30376) se agrupó con la cepa TAK de referencia (H-GTC 1.1), con una mutación de transición (T930C) compartida con todas las cepas brasileñas. Mutaciones adicionales en cuatro cepas brasileñas mostraron características similares con las cepas de referencia H-GTC1.2, con mutaciones de transición y transversión dentro del HRV1. Estas mutaciones dieron como resultado cambios de aminoácidos en A446G [asparagina (N) a ácido aspártico (D)] y T477G [asparagina (N) a lisina (K)]. Una muestra se agrupó en H-GTC 1.3 y portaba varias mutaciones de H-GTC 1.2 junto con otras mutaciones no sinónimas, incluida la inserción del aminoácido asparagina (N) (CAA; nt 420–422) (Tabla 1). La mayoría de las cepas brasileñas F41 detectadas (n = 24) se agruparon con H-GTC 2.2, acumulando varias mutaciones en los seis HVR analizados. Este grupo se distingue de los demás por una delección de tres nucleótidos (TCA; nt 507–509) y la presencia de mutaciones sinónimas (G438A) y no sinónimas (T448C; CCA589–591GAC; G686A; G755A; A767T; T799G; C801T ; A856G) (Figura 4).

3.3.2. Gen de fibra

Para las cepas brasileñas F40, la región del eje parcial del gen de la fibra acumuló más mutaciones en comparación con la región HVR1-HVR6 del gen hexon. Todas las muestras brasileñas de F40 se agruparon, divergiendo de la cepa Dungan de referencia con mutaciones que resultaron en cambios de aminoácidos en las posiciones G476A [arginina (R) a glutamina (Q)], A914G.

[lisina (K) a arginina (R)] y G946A [alanina (A) a treonina (T)]. Tres de estas cepas F40 tenían una mutación adicional en G502A [ácido aspártico (D) a asparagina (N)].

Por el contrario, para las muestras brasileñas F41, la región del eje parcial del gen de la fibra estaba más conservada en comparación con la región HVR1-HVR6 del gen hexon. A pesar de tener menos mutaciones, las cepas F41 se dividieron en dos F-GTC principales. En comparación con la cepa TAK de referencia, la mayoría de las mutaciones dieron lugar a sustituciones sinónimas.

Sólo se detectaron dos mutaciones no sinónimas. El primero se encontró en todas las cepas brasileñas F41 de ambos subgrupos (G596A), que cambió el aminoácido de serina (S) a asparagina (N). La otra mutación no sinónima en el gen de la fibra F41 se detectó solo en muestras de F-GTC2.2 (G748T), lo que provocó el cambio de aminoácido de valina (V) a fenilalanina (F).

4. Discusión

La AGE causada por HAdV entérico impone una carga significativa y a menudo subestimada sobre las enfermedades diarreicas pediátricas en los países de ingresos bajos y medianos [3,12,29]. La falta de una metodología de vigilancia estandarizada, incluidos métodos de detección molecular cuantitativa específicos del AdVH-F40/41, impide una caracterización más precisa del AdVH entérico y su impacto en las enfermedades diarreicas. Nuestro estudio proporciona un análisis comparativo del rendimiento analítico de dos ensayos de qPCR utilizados para la detección de HAdV general y entérico específico en muestras de heces y agrega información novedosa sobre la diversidad genética de las cepas HAdV-F40/41 detectadas en casos de AGE en Brasil.

Al emplear un ensayo qPCR dirigido específicamente a HAdV-F, confirmamos su sensibilidad mediante la detección de muestras de heces de HAdV-F previamente secuenciadas. Además, el nuevo ensayo identificó tres muestras previamente clasificadas como especie C. Esto sugiere una posible coinfección de distintas especies de HAdV dentro del mismo paciente. Las tres muestras pertenecían a pacientes menores de dos años y un paciente mostró además una detección simultánea de rotavirus.

En nuestro estudio anterior, también observamos codetecciones entre diferentes virus entéricos. Específicamente, se identificó HAdV en el 30% de las muestras previamente confirmadas como positivas para norovirus o rotavirus [15]. Nuestro equipo de investigación también informó tasas de detección del 32,1% para norovirus [30] y del 12% para rotavirus [31] en estudios realizados en las mismas regiones de Brasil. Estos hallazgos resaltan la circulación sustancial de estos importantes virus entéricos en el país, particularmente entre niños menores de dos años. Como era de esperar, la probabilidad de codetecciones aumenta con la cantidad de patógenos analizados. En la misma línea, un reanálisis del Global Enteric Multicenter Study (GEMS) reveló la presencia de dos o más patógenos asociados a la diarrea en el 38,9% de las muestras [29].

Entre los tipos no entéricos de HAdV, las especies A, B, C y D se detectan con frecuencia en muestras de heces en todo el mundo [13,14,32–34]. Si bien con frecuencia se detectan especies de HAdV no entéricas, su papel preciso en los casos de AGE sigue siendo incierto [12]. Sin embargo, algunos estudios han informado la detección de HAdV no entérico como único agente en lactantes con AGE. Por ejemplo, en un brote de AGE en Brasil, HAdV-A12 fue el único virus entérico detectado entre varios otros examinados, con altas cargas virales detectadas en cinco de nueve muestras de heces [35]. Un estudio de casos y controles realizado en China sugirió una fuerte correlación entre HAdV-B3 y diarrea en niños [36]. En Italia, un estudio en el que participaron niños hospitalizados con síntomas de AGE detectó únicamente HAdV-C1, -C2 y -B3 no entéricos. Entre las muestras positivas para AdVH, se detectaron tipos no entéricos en más del 75% de los pacientes como único patógeno entérico [37]. Estos estudios enfatizan la importancia del seguimiento y caracterización de los tipos no entéricos, especialmente durante los brotes de AGE.

La secuenciación parcial de las proteínas entéricas de la cápside del HAdV también podría ser un método eficaz para análisis filogenéticos y seguimiento de nuevos linajes emergentes cuando no se dispone de la secuenciación completa del genoma. Diferentes especies presentan diferentes mecanismos de evolución. Por ejemplo, la aparición de nuevos tipos en las especies B, C y D de HAdV se asocia con la recombinación homóloga dentro de los tipos de especies [38–40]. De manera diferente, para la especie F no hay evidencia de recombinación entre los tipos F40 y F41, y su estructura mole-

La evolución parece estar impulsada por la acumulación de mutaciones puntuales en varias regiones del genoma dentro de cada tipo. Estudios recientes que analizan todo el genoma de HAdV-F41 han demostrado que los genes del hexón y la fibra (tanto cortos como largos), junto con las regiones E3 y E4, son los principales puntos críticos de mutaciones [41–43]. Estudios filogenéticos recientes del tipo F41 identificaron tres linajes o grupos genéticos diferentes [41]. Para dilucidar mejor la filogenia y la diversidad genética del AdVHA entérico circulante en Brasil, secuenciamos el HVR1-HVR6 del gen hexón y la región del eje parcial del gen de la fibra de muestras positivas para AdVHA-F recolectadas entre 2018 y 2020. Compararon las cepas brasileñas F41 con las secuencias F41 obtenidas antes y durante los casos de hepatitis grave.

De acuerdo con los resultados obtenidos en el este de la India [44], nuestro análisis demostró que las cepas brasileñas de HAdV-F40 eran menos predominantes y estaban más conservadas genéticamente que las cepas HAdV-F41. Las cepas brasileñas F41 se dividieron en dos linajes o grupos principales según el análisis filogenético de los genes de fibra larga y hexón parcialmente secuenciados, y la mayoría de las cepas que circulan en el país se agrupan con GTC2. Otros países han informado de la cocirculación de varias cepas F41, con predominio del linaje 2 [41,44].

Las tasas de detección más altas de F41 en comparación con F40 pueden estar relacionadas con su mayor diversidad genética, una tendencia reportada en estudios en Brasil y varios otros países [13,14,34,36] que puede conferir una ventaja genética. Los análisis filogenéticos de los genes de hexón y fibra de F40 y F41 revelan que las cepas brasileñas que circulan en el país tienen una alta similitud genómica con las que circulan a nivel mundial, sin evidencia de una nueva variante emergente de HAdV-F.

A finales de 2021 y principios de 2022, se informó en varios países del mundo la aparición de casos de hepatitis aguda en niños. Estos casos se vincularon inicialmente con altas tasas de detección de HAdV-F41, sin que se detectaran virus de la hepatitis aguda clásica [45,46]. Al principio, esta observación sugirió la circulación de una nueva cepa potencialmente virulenta de HAdV-F41. En nuestro estudio, detectamos algunas mutaciones en los genes hexón y de fibra larga parcialmente secuenciados de las cepas tipo F41 que circulaban antes de los casos de hepatitis grave. Además, varias cepas de F41 identificadas en Brasil más de dos años antes de la aparición de casos graves de hepatitis exhiben una alta identidad de nucleótidos con cepas de F41 recientemente secuenciadas detectadas en muestras de niños afectados. Nuestros hallazgos se alinean con estudios del Reino Unido, Alemania y Kenia que analizaron la diversidad genómica de las cepas F41 circulantes antes y durante la aparición de casos graves de hepatitis. La mayoría de las cepas pertenecían al linaje 2, lo que implica que puede haber factores adicionales involucrados en la aparición de estos casos [41,43]. Más recientemente, un estudio realizado en el Reino Unido también informó que los linajes F41 detectados antes y después de la COVID ya estaban circulando en el Reino Unido [42]. Todos estos estudios detectaron un tercer linaje, mostrando una divergencia significativa en la fibra corta, lo que sugiere un nuevo recombinante que aún no ha sido detectado en Brasil.

Hallazgos recientes han indicado que la coinfección del virus adenoasociado 2 (AAV2) con otros patógenos, incluido HAdV-F41, puede provocar enfermedad hepática [47,48]. Un estudio epidemiológico de aguas residuales realizado en Irlanda también determinó una correlación entre la carga de casos de hepatitis grave y la carga viral diaria de HAdV y AAV2 en las aguas residuales, lo que indica que la circulación comunitaria de estos patógenos puede estar asociada con el brote [49].

Nuestro estudio tiene limitaciones. En primer lugar, no pudimos realizar pruebas qPCR-F en todas las muestras positivas para HAdV, ni pudimos secuenciar todas las muestras positivas de los tipos F40 y F41. Esto podría llevar a una interpretación errónea de los principales grupos que circulan en el país y potencialmente a perder información clave sobre la diversidad de HAdV-F. Además, nuestro análisis de la evolución de la especie F se basó en segmentos parciales de los genes del hexón y de la fibra larga en lugar del genoma completo. Otros genes, como el gen de la fibra corta y las regiones E3 y E4, son puntos críticos conocidos de mutaciones y su análisis podría proporcionar nuevos datos importantes sobre la evolución del AdVHA [41–43].

5. Conclusiones

En el estudio actual, exploramos la diversidad genética de las cepas HAdV-F40/41 mediante la amplificación parcial de las regiones hipervariables del hexón y los genes de fibra larga de

pacientes con AGE. El análisis filogenético reveló que la mayoría de las cepas brasileñas F41 se agrupaban dentro del linaje GCT2. Por el contrario, las cepas F40 estaban más conservadas en ambos genes analizados. Nuestro estudio proporciona nuevos conocimientos sobre la diversidad genética de las especies HAdV-F en Brasil. Además, demostramos la utilidad de los ensayos qPCR de detección de HAdV tanto entéricos como no entéricos, que pueden mejorar significativamente la vigilancia de HAdV, especialmente en los casos en los que la secuenciación no es factible. Estos ensayos deben considerarse para la implementación de ensayos de diagnóstico molecular optimizados en programas de seguimiento de AGE virales. Finalmente, nuestro estudio ofrece datos completos sobre la diversidad genética y la evolución de las cepas HAdV-F, respaldando así futuros esfuerzos de desarrollo.

Contribuciones de los autores: Conceptualización, LGdN, SKS y TMF; metodología, LGdN, SKS y TMF; análisis formal, LGdN, SKS, RRJ y TMF; investigación, LGdN y SKS; curación de datos, LGdN, SKS y RRJ; redacción: preparación del borrador original, LGdN, SKS y RRJ; redacción: revisión y edición, TMF; supervisión, TMF; administración de proyectos, TMF; adquisición de financiación, TMF. Todos los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Financiamiento: Esta investigación fue apoyada por el Consejo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico de Brasil (CNPq), FAPERJ—Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Processo SEI 260003/000530/2023 (Ref. Proc. N.º 200.171/2023; Jovem Cientista do Nosso Estado, Fumian, TM), y PAEF-3 del Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. CGLab, Ministerio de Salud de Brasil, brindó apoyo adicional. Fumian TM es Beca de Productividad del Investigador del CNPq de Brasil.

Declaración de disponibilidad de datos: Los conjuntos de datos generados y analizados durante el estudio actual están disponibles en el repositorio de GenBank con los números de acceso OQ442226–OQ442299. Este estudio está registrado en el Sistema Nacional de Patrimonio Genético y Gestión de Conocimientos Tradicionales Asociados de Brasil (SisGen, n.º A837EB6).

Agradecimientos: Nos gustaría agradecer a todo el personal de LVCA por el apoyo técnico.

Conflictos de intereses: Los autores declaran que no conocen intereses financieros o relaciones personales en competencia que puedan haber influido en el trabajo presentado en este artículo. Los autores han leído y aceptado la versión publicada del manuscrito.

Referencias

- Colaboradores de enfermedades diarreicas del GBD 2016. Estimaciones de la morbilidad, mortalidad y etiologías de la diarrea a nivel mundial, regional y nacional en 195 países: un análisis sistemático para el estudio de la carga mundial de enfermedades 2016. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18, 1211–1228. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Wardlaw, T.; Salamá, P.; Brocklehurst, C.; Chopra, M.; Mason, E. Diarrea: por qué siguen muriendo niños y qué se puede hacer. *Lanceta* 2010, 375, 870–872. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Cohen, AL; Platts-Mills, JA; Nakamura, T.; Operario, DJ; Antonio, S.; Mwenda, JM; Weldegebriel, G.; Rey-Benito, G.; de Oliveira, LH; Ortiz, C.; et al. Etiología e incidencia de la diarrea que requiere hospitalización en niños menores de 5 años en 28 países de ingresos bajos y medios: hallazgos de la red mundial de vigilancia de la diarrea pediátrica. *Globo BMJ. Salud* 2022, 7, e009548. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Kotloff, KL; Nataro, JP; Soldador negro, WC; Nasrin, D.; Farag, TH; Panchalingam, S.; Wu, Y.; Sembrar, así; Sur, D.; Breiman, RF; et al. Carga y etiología de las enfermedades diarreicas en lactantes y niños pequeños en países en desarrollo (estudio multicéntrico entérico global, GEMS): un estudio prospectivo de casos y controles. *Lanceta* 2013, 382, 209–222. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Operario, DJ; Platts-Mills, JA; Nadan, S.; Páquina, N.; Seheri, M.; Mphahlele, J.; Praharaj, I.; Kang, G.; Araujo, TI; Leite, JPG; et al. Etiología de la diarrea acuosa aguda grave en niños de la red mundial de vigilancia de rotavirus mediante la reacción cuantitativa en cadena de la polimerasa. *J. Infectar. Dis.* 2017, 216, 220–227. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Platts-Mills, JA; Liu, J.; Rogawski, ET; Kabir, F.; Lertsethtakarn, P.; Siguas, M.; Khan, SS; Praharaj, I.; Murei, A.; Nshama, R.; et al. Uso de métodos de diagnóstico molecular cuantitativo para evaluar la etiología, la carga y las características clínicas de la diarrea en niños en entornos de bajos recursos: un nuevo análisis del estudio de cohorte MAL-ED. *Globo de lanceta. Salud* 2018, 6, e1309–e1318. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Davison, AJ; Benkˆo, M.; Harrach, B. Contenido genético y evolución de los adenovirus. *J. General Virol.* 2003, 84, 2895–2908. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Seto, D.; Chodosh, J.; Brister, JR; Jones, MS; Miembros de la comunidad de investigación de adenovirus. Uso de la secuencia del genoma completo para caracterizar y nombrar adenovirus humanos. *J. Virol.* 2011, 85, 5701–5702. [\[Referencia cruzada\]](#)
- Lion, T. Infecciones por adenovirus en pacientes inmunocompetentes e inmunodeprimidos. *Clínico. Microbiol. Rev.* 2014, 27, 441–462. [\[Referencia cruzada\]](#)

10. Lynch, JP; Kajon, AE Adenovirus: epidemiología, propagación global de nuevos serotipos y avances en el tratamiento y la prevención. *Semin. Respirar. Crítico. Cuidado médico*. 2016, 37, 586–602. [\[Referencia cruzada\]](#)
11. Shieh, W.-J. Infecciones por adenovirus humanos en población pediátrica: una actualización sobre la correlación clínico-patológica. *Biomédica. J.* 2021, 45, 38–49. [\[Referencia cruzada\]](#)
12. Lee, B.; Damon, CF; Platts-Mills, JA Gastroenteritis aguda pediátrica asociada con adenovirus 40/41 en personas de bajos ingresos y Países de ingresos medios. *actual. Opinión. Infectar. Dis.* 2020, 33, 398–403. [\[Referencia cruzada\]](#)
13. Afrad, MH; Avzun, T.; Haque, J.; Haque, W.; Hossain, YO; Rahman, AR; Ahmed, S.; Faruque, ASG; Rahman, MZ; Rahman, M. Detección de adenovirus entéricos y no entéricos en pacientes con gastroenteritis, Bangladesh, 2012-2015. *J. Med. Virol.* 2018, 90, 677–684. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
14. Kumthip, K.; Khamrin, P.; Ushijima, H.; Maneekarn, N. Adenovirus entéricos y no entéricos asociados con gastroenteritis aguda en pacientes pediátricos en Tailandia, 2011 a 2017. *PLoS ONE* 2019, 14, e0220263. [\[Referencia cruzada\]](#)
15. Nascimento, LG; Fialho, AM; Andrade, JdSR; Asís, RMS; Fumian, TM Adenovirus entérico humano F40/41 como causa principal de gastroenteritis aguda en niños en Brasil, 2018 a 2020. *Sci. Rep.* 2022, 12, 11220. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
16. Zhou, HL; Bessey, T.; Wang, SM; Mo, Z.-J.; Barclay, L.; Wang, J.-X.; Zhang, C.-J.; Ma, J.-C.; Qiu, C.; Zhao, G.; et al. Carga y etiología de la diarrea moderada y grave en niños menores de 5 años que viven en el norte y el sur de China: vigilancia prospectiva basada en la población. *Patógeno intestinal*. 2021, 13, 33. [\[Referencia cruzada\]](#)
17. Marsh, K.; Taylor, R.; Pollock, L.; Roy, K.; Lakha, F.; Ho, A.; Henderson, D.; Divala, T.; Currie, S.; Yirrell, D.; et al. Investigación de casos de hepatitis de etiología desconocida entre niños pequeños, Escocia, del 1 de enero de 2022 al 12 de abril de 2022. *Euro Surveill.* 2022, 27, 2200318. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Zhang, LY-Y.; Huang, LS-S.; Yue, Y.-H.; Fawaz, R.; Lim, JK; Fan, J.-G. Hepatitis aguda de origen desconocido en niños: temprana Observaciones del brote de 2022. *J.Clin. Traducción Hepatol.* 2022, 10, 522–530. [\[Referencia cruzada\]](#)
19. Grand, RJ Patogenicidad y virulencia del adenovirus humano F41: posibles vínculos con la hepatitis grave en niños. *Virulencia* 2023, 14, 2242544. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu, J.; Gratz, J.; Amor, C.; Nshama, R.; Walongo, T.; Maro, A.; Mduma, E.; Platts-Mills, J.; Boisen, N.; Nataro, J.; et al. Optimización de métodos de PCR cuantitativa para la detección de enteropatógenos. *MÁS UNO* 2016, 11, e0158199. [\[Referencia cruzada\]](#)
21. Hernroth, BE; Conden-Hansson, A.-C.; Rehnstam-Holm, A.-S.; Girones, R.; Allard, AK Factores ambientales que influyen en los patógenos virales humanos y sus posibles organismos indicadores en el mejillón azul, *Mytilus Edulis*: el primer informe escandinavo. *Aplica. Reinar. Microbiol.* 2002, 68, 4523–4533. [\[Referencia cruzada\]](#)
22. Allard, A.; Albinsson, B.; Wadell, G. Tipificación rápida de adenovirus humanos mediante una PCR general combinada con análisis de endonucleasas de restricción. *J.Clin. Microbiol.* 2001, 39. [\[Referencia cruzada\]](#)
23. Li, L.; Shimizu, H.; Doan, LTP; Tung, PG; Okitsu, S.; Nishio, O.; Suzuki, E.; Seo, JK; Kim, Kansas; Müller, WEG; et al. Caracterizaciones de aislados de adenovirus tipo 41 de niños con gastroenteritis aguda en Japón, Vietnam y Corea. *J.Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4032–4039. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Xu, W.; McDonough, MC; Erdman, DD Identificación específica de especies de adenovirus humanos mediante un ensayo de PCR múltiple. *J. Clínico. Microbiol.* 2000, 38, 4114–4120. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Larkin, MA; Escudos negros, G.; Marrón, NP; Chenna, R.; McGettigan, Pensilvania; McWilliam, H.; Valentín, F.; Wallace, IM; Wilm, A.; López, R.; et al. Clustal W y Clustal X Versión 2.0. *Bioinformática* 2007, 23, 2947–2948. [\[Referencia cruzada\]](#)
26. Stamatakis, A. RAxML Versión 8: una herramienta para el análisis filogenético y el posanálisis de grandes filogenias. *Bioinformática* 2014, 30, 1312–1313. [\[Referencia cruzada\]](#)
27. Miller, MA; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. Creación del portal científico CIPRES para la inferencia de grandes árboles filogenéticos. En *Actas del Taller sobre entornos informáticos de puerta de enlace (GCE) de 2010*, Nueva Orleans, Luisiana, EE. UU., 14 de noviembre de 2010; págs. 1–8. [\[Referencia cruzada\]](#)
28. Tamura, K.; Stecher, G.; Kumar, S. MEGA11: Análisis de genética evolutiva molecular Versión 11. *Mol. Biol. Evolución*. 2021, 38, 3022–3027. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
29. Liu, J.; Platts-Mills, JA; Juma, J.; Kabir, F.; Nkeze, J.; Okoi, C.; Operario, DJ; Uddin, J.; Ahmed, S.; Alonso, PL; et al. Uso de métodos de diagnóstico molecular cuantitativo para identificar las causas de la diarrea en niños: un nuevo análisis del estudio de casos y controles GEMS. *Lanceta* 2016, 388, 1291–1301. [\[Referencia cruzada\]](#)
30. Sarmiento, SK; de Andrade, JdSR; Miagostovich, diputado; Fumian, TM Características virológicas y epidemiológicas del norovirus Infecciones en Brasil, 2017-2018. *Virus* 2021, 13, 1724. [\[CrossRef\]](#)
31. Gutiérrez, MB; Fialho, AM; Maranhao, AG; Malta, FC; Andrade, JdSRd; Assis, RMSd; Mouta, SdSe; Miagostovich, diputado; Leite, JPG; Machado Fumian, T. Rotavirus A en Brasil: Epidemiología y Vigilancia Molecular durante 2018-2019. *Patógenos* 2020, 9, 515. [\[CrossRef\]](#)
32. Gelaw, A.; Pietsch, C.; Liebert, UG Diversidad genética de adenovirus humanos y astrovirus humanos en niños con gastroenteritis aguda en el noroeste de Etiopía. *Arco. Virol.* 2019, 164, 2985–2993. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Portal, TM; Reymão, TKA; Quinderé Neto, GA; Fiuza, MKDC; Teixeira, DM; Lima, ICG; Sousa Júnior, EC; Bandeira, RDS; De Dios, DR; Justino, MCA; et al. Detección y genotipado de virus entéricos en niños hospitalizados con gastroenteritis aguda en Belém, Brasil: aparición de viremia por adenovirus por especie F, tipos 40/41. *J. Med. Virol.* 2019, 91, 378–384. [\[Referencia cruzada\]](#)

34. Primo, D.; Pacheco, GT; Timenetsky, MdCST; Luchs, A. Vigilancia y caracterización molecular de adenovirus humanos en pacientes con gastroenteritis aguda en la era de la vacuna contra rotavirus, Brasil, 2012-2017. *J.Clin. Virol.* 2018, 109, 35–40. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Portes, RAE; Volotão, EdM; Rocha, MS; Rebelo, MC; Xavier, MdPTP; Assis, RMd; Rosa, TL; Miagostovich, diputado; Leite, JPG; Carvalho-Costa, FA Un brote de gastroenteritis por adenovirus no entérico A12 en Río de Janeiro, Brasil. *Memoria. Inst. Oswaldo Cruz* 2016, 111, 403–406. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Qiu, F.-Z.; Shen, X.-X.; Li, G.-X.; Zhao, L.; Chen, C.; Duan, S.-X.; Guo, J.-Y.; Zhao, M.-C.; Yan, TF; Qi, J.-J.; et al. Adenovirus asociado con diarrea aguda: un estudio de casos y controles. *Infección BMC. Dis.* 2018, 18, 450. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. De Francesco, MA; Lorenzin, G.; Meini, A.; Schumacher, RF; Caruso, A. Adenovirus no entéricos asociados con gastroenteritis teritis en niños hospitalizados. *Microbiol. Espectro.* 2021, 9, e0030021. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. Dhingra, A.; Hage, E.; Ganzenmueller, T.; Böttcher, S.; Hofmann, J.; Hamprecht, K.; Obermeier, P.; Rath, B.; Hausmann, F.; Dobner, T.; et al. Evolución molecular de la especie C. Sci. de adenovirus humano (HAdV). *Rep.* 2019, 9, 1039. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
39. Lukashev, AN; Ivanova, OE; Ereemeeva, TP; Iggo, RD Evidencia de recombinación frecuente entre adenovirus humanos. *J. General Virol.* 2008, 89, 380–388. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
40. Robinson, CM; Singh, G.; Lee, JY; Dehghan, S.; Rajaiya, J.; Liu, EB; Yousuf, MA; Betensky, RA; Jones, MS; Dyer, DW; et al. Evolución molecular de los adenovirus humanos. *Ciencia. Rep.* 2013, 3, 1812. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
41. Götting, J.; Cordés, AK; Steinbrück, L.; Heim, A. Filogenia molecular de los linajes del adenovirus humano tipo 41. *Evolución del virus.* 2022, 8, veac098. [\[Referencia cruzada\]](#)
42. Maes, M.; Khokhar, F.; Wilkinson, SAJ; Smith, AD; Kovalenko, G.; Dougan, G.; Rápido, J.; Loman, Nueva Jersey; panadero, S.; Curran, MD; et al. La secuenciación Multiplex MinION sugiere una diversidad genética del adenovirus entérico F41 comparable a la era anterior a la COVID-19. *Microbio. Genómica* 2023, 9, mgen000920. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Lambisia, AW; Makori, A; Mutunga, M.; Cheruiyot, R.; Murunga, N.; Rápido, J.; Githinji, G.; Nokes, DJ; Houldcroft, CJ; Agoti, CN Epidemiología genómica del adenovirus humano F40 y F41 en la costa de Kenia: un estudio retrospectivo de vigilancia hospitalaria (2013-2022). *Evolución del virus.* 2023, 9, vead023. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
44. Chandra, P.; Mira, M.; Mitra, S.; Banerjee, A.; Saha, P.; Okamoto, K.; Deb, Alaska; Ghosh, SK; Maná, A.; Dutta, S.; et al. Caracterización genética y variaciones filogenéticas de las cepas de adenovirus F humano que circularon en el este de la India durante 2017-2020. *J. Medicina. Virol.* 2021, 93, 6180–6190. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
45. Sánchez, LHG; Shiau, H.; panadero, JM; Saaybi, S.; Buchfellner, M.; Britt, W.; Sánchez, V.; Alfarero, JL; Ingram, Luisiana; Kelly, D.; et al. Una serie de casos de niños con hepatitis aguda e infección por adenovirus humanos. *N. inglés. J. Med.* 2022, 387, 620–630. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
46. Kelgeri, C.; Couper, M.; Gupta, GL; Brant, A.; Patel, M.; Johansen, L.; Valamparampil, J.; Ong, E.; Hartog, H.; Perera, MTPR; et al. Espectro clínico de niños con hepatitis aguda de causa desconocida. *N. inglés. J. Med.* 2022, 387, 611–619. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
47. Morfopoulou, S.; Buddle, S.; Torres Montaguth, OE; Atkinson, L.; Guerra-Assunção, JA; Moradi Marjaneh, M.; Zennzini Chiozzi, R.; Piso, N.; Campos, L.; Hutchinson, JC; et al. Investigaciones genómicas de hepatitis aguda inexplicable en niños. *Naturaleza* 2023, 617, 564–573. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
48. Phan, J.; Eslick, GD; Elliott, EJ Desmitificando el brote global de hepatitis aguda grave de etiología desconocida en niños: Una revisión sistemática y un metanálisis. *J. Infectar.* 2024, 88, 2–14. [\[Referencia cruzada\]](#) [\[PubMed\]](#)
49. Martín, NA; González, G.; Reynolds, LJ; Bennett, C.; Campbell, C.; Nolan, TM; Byrne, A.; Fennema, S.; Holohan, N.; Kuntamukkula, SR; et al. Virus adenoasociado 2 y adenovirus humano F41 en aguas residuales durante un brote de hepatitis aguda grave en niños, Irlanda. *Emergente. Infectar. Dis.* 2023, 29, 751–760. [\[Referencia cruzada\]](#)

Descargo de responsabilidad/Nota del editor: Las declaraciones, opiniones y datos contenidos en todas las publicaciones son únicamente de los autores y contribuyentes individuales y no de MDPI ni de los editores. MDPI y/o los editores renuncian a toda responsabilidad por cualquier daño a personas o propiedad que resulte de cualquier idea, método, instrucción o producto mencionado en el contenido.