



Article

Évaluation de la qPCR pour la détection sélective des entériques Adénovirus suivi d'une génétique basée sur la séquence

Caractérisation des souches F circulant au Brésil

Lilian Gonçalves do Nascimento et Tulio [†] , Sylvia Kahwage Sarmiento [†] , Reinaldo Röpke Junior [†]
Machado Fumian*

Laboratoire de Virologie Comparative et Environnementale, Institut Oswaldo Cruz, Fondation Oswaldo Cruz (Fiocruz), Av. Brésil 4365, Rio de Janeiro 21040-360, RJ, Brésil ;

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

* Correspondance : fumiantm@gmail.com ou tuliomf@ioc.fiocruz.br

[†] Ces auteurs ont contribué à parts égales à ce travail et partagent la paternité première.

Résumé : L'adénovirus humain (HAdV) F40/41 est un agent pathogène important dans les cas de gastro-entérite aiguë pédiatrique. Cependant, la diversité des conceptions d'études et des méthodes de diagnostic conduit souvent à des interprétations erronées de leur impact. Notre étude a exploré la diversité génétique du HAdV-F40/41 au Brésil à l'aide d'un test qPCR spécifique pour l'espèce HAdV F, combiné à une analyse phylogénétique des gènes partiels de l'hexon et des fibres. Nos résultats ont démontré que les souches HAdV-F41 prédominaient et présentaient une diversité plus élevée que les souches HAdV-F40. Sur la base du gène hexon, les souches brésiliennes HAdV-F41 ont été regroupées en deux groupes de types de génome (GTC), divisés en sous-groupes, la plupart des souches se regroupant en GTC2. La région partielle de la tige du gène de la fibre présentait une conservation plus élevée parmi HAdV-F41. Le test qPCR spécifique pour l'espèce F du HAdV a identifié le HAdV-F dans 31,5 % supplémentaires (34/108) des échantillons positifs au HAdV non caractérisés auparavant, détectés à l'aide d'un test qPCR HAdV non spécifique. Les deux tests sont fortement corrélés à la détection du HAdV-F, et le test qPCR spécifique pour les types entériques peut améliorer la surveillance du HAdV, en particulier lorsque le séquençage n'est pas possible. Notre étude fournit de nouvelles informations sur la diversité génétique des espèces HAdV-F.

Mots-clés : gastro-entérite aiguë ; HAdV entériques ; diversité génétique ; Analyse phylogénétique ; qPCR ; Brésil



Citation : Nascimento, LGd ;

Sarmiento, Saskatchewan; Röpke Junior,

R. ; Fumian, TM Évaluation de la qPCR pour la détection sélective des entériques

Adénovirus suivi de

Génétique basée sur les séquences

Caractérisation des souches F

Circulant au Brésil. Appl. Microbiol. 2024, 4,

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

appliedmicrobiol4030069

Rédacteur académique : Ian Connerton

Reçu : 31 mai 2024

Révisé : 24 juin 2024

Accepté : 24 juin 2024

Publié : 27 juin 2024



Copyright : © 2024 par les auteurs.

Licencié MDPI, Bâle, Suisse.

Cet article est un article en libre accès distribué selon les termes et

conditions des Creative Commons

Licence d'attribution (CC BY) (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

La gastro-entérite aiguë (AGE) est l'une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les enfants de moins de cinq ans, en particulier dans les pays à revenu faible et intermédiaire (PRFI) où l'accès aux soins de santé, à l'hygiène et à l'éducation est souvent limité [1,2]. Des études menées dans les PRFI pour détecter plusieurs entéropathogènes ont détecté le rotavirus, le norovirus et l'adénovirus humain (HAdV) F40/41 comme principaux pathogènes entériques détectés chez les patients pédiatriques atteints d'AGE [3-6].

Les HAdV, membres de la famille des Adenoviridae (genre Mastadenovirus), sont des virus à ADNdb linéaires, non enveloppés, dotés d'un génome d'environ 35 kpb [7]. Sur la base d'analyses génomiques et bioinformatiques, HAdV est actuellement divisé en sept espèces avec plus de 100 types caractérisés (hadvwg.gmu.edu/, consulté le 16 novembre 2023) [8]. Différents types de HAdV présentent différents tropismes tissulaires, entraînant un large éventail de symptômes cliniques. Chez les individus immunocompétents, les symptômes sont généralement légers et conduisent à des infections respiratoires, gastro-intestinales et conjonctivales spontanément résolutives. Une maladie grave touche généralement les personnes immunodéprimées, entraînant des infections persistantes et généralisées qui peuvent également affecter le tractus génito-urinaire, le foie, le système nerveux central et le système cardiovasculaire [9-11].

L'espèce F comprend deux types bien établis (HAdV-40 et -41), appelés HAdV entérique en raison de leur tropisme pour le tractus gastro-intestinal et de leur association avec l'AGE. L'importance du HAdV dans l'AGE pédiatrique a été sous-estimée pendant de nombreuses années.

Cependant, l'utilisation de techniques de détection moléculaire comme méthode de diagnostic a révélé leur contribution substantielle au fardeau mondial de l'AGE pédiatrique [12]. Dans une étude récente menée dans les PRFI, le Réseau mondial de surveillance de la diarrhée pédiatrique a identifié le HAdV-F40/41 comme le deuxième agent pathogène le plus fréquemment détecté chez les enfants de moins de cinq ans atteints d'AGE, derrière le rotavirus [3]. Comme différents types de HAdV peuvent être détectés dans les échantillons de selles, des études régionales dans le monde entier ont rapporté un large éventail de taux de positivité du HAdV (types entériques et non entériques), avec des taux allant de 1,6 % à 39,1 % [13-16]. La large gamme de taux de positivité au HAdV est due à de multiples facteurs, notamment la conception de l'étude, sa portée, les méthodes de diagnostic, les variations régionales et temporelles et l'introduction de la vaccination contre le rotavirus [5,6].

Jusqu'au début de 2022, HAdV-F était un agent pathogène pédiatrique majeur dans les cas d'AGE, mais sa diversité génomique restait mal comprise. En mars de la même année, plusieurs cas d'hépatite grave d'origine inconnue ont été détectés chez des enfants immunocompétents. Une enquête plus approfondie a révélé plusieurs cas remontant à octobre 2021 dans plus de 40 pays [17,18].

Le taux de détection élevé de HAdV-F41 et la possibilité d'une association clinique de F41 avec une hépatite sévère d'origine inconnue ont accru l'urgence d'études plus complètes sur la phylogénie moléculaire afin de mieux comprendre l'évolution de l'espèce F, d'identifier de nouvelles souches émergentes et d'obtenir davantage de données pour le développement de vaccins [19].

Les connaissances concernant la diversité génomique des HAdV-F40/41 et leur contribution réelle aux cas d'AGE, en particulier au Brésil, restent limitées. Pour combler cette lacune en matière de recherche, notre étude visait à évaluer l'efficacité d'un protocole de réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) spécifique à l'espèce F pour déterminer le véritable impact du HAdV entérique dans les cas d'AGE. De plus, nous avons effectué le séquençage et l'analyse phylogénétique moléculaire de six régions hypervariables du gène hexon, ainsi qu'un séquençage partiel de la région de la tige du gène de la fibre provenant des souches HAdV-F40/41 détectées chez les patients AGE, afin de mieux comprendre la diversité génétique de l'espèce F au Brésil.

2. Matériels et méthodes

2.1. Collection de selles et déclaration d'éthique

Cette étude comprenait des échantillons de selles HAdV positifs collectés entre janvier 2018 et décembre 2020 auprès de patients hospitalisés et ambulatoires (enfants et adultes) présentant des symptômes d'AGE, comme décrit précédemment (15). L'AGE a été définie comme l'apparition soudaine d'une diarrhée ($\geq$ trois évacuations liquides ou semi-liquides en 24 heures) pouvant être accompagnée de fièvre, de nausées, de vomissements ou de douleurs abdominales. Des échantillons de selles ont été systématiquement envoyés au Laboratoire régional de référence sur les rotavirus – Laboratoire de virologie comparée et environnementale (RRRL – LVCA) via des sites sentinelles dans les laboratoires centraux des États. Le RRRL- LVCA fait partie du réseau national de surveillance des rotavirus, supervisé par la Coordination générale des laboratoires de santé publique du ministère brésilien de la Santé (MoS).

Cette étude a été approuvée par le comité d'éthique de la Fondation Oswaldo Cruz (Fiocruz) (numéro d'approbation CAAE : 94144918.3.0000.5248). La surveillance a été réalisée à travers un réseau hiérarchique dans lequel les échantillons étaient fournis sur demande médicale dans les hôpitaux et les centres de santé, surveillés par le Système de Santé Unifié (SUS) brésilien. Cette étude a été menée dans le cadre du RRRL/MoH dans le cadre d'une politique fédérale de santé publique pour la surveillance de l'AGE viral au Brésil. Le comité d'éthique de Fiocruz a renoncé au consentement éclairé du patient et les données des patients ont été conservées de manière anonyme et sécurisée.

2.2. Extraction d'ADN viral

Des extractions d'acides nucléiques ont été réalisées à partir de 140 μ L de suspension de selles clarifiées (10 % p/v) avec le kit QIAamp Viral Mini (Qiagen, Valencia, CA, USA) sur la plateforme automatisée QIAcube, en suivant les instructions du fabricant. Les acides nucléiques viraux extraits ont été élués dans 60 μ L du tampon d'éluion AVE et immédiatement stockés à -80°C jusqu'à l'analyse moléculaire. De l'eau sans RNase/DNase a été utilisée comme contrôle négatif dans chaque protocole d'extraction.

2.3. Détection et quantification du HAdV-F

Un test qPCR spécifique pour HAdV-F [20] a été utilisé pour détecter les types entériques F40 et F41 dans des échantillons précédemment testés positifs pour HAdV en utilisant un ensemble d'amorces dégénérées et une sonde ciblant une région conservée de la première partie de l'hexon de l'adénovirus. gène [21].

Des informations détaillées sur les méthodes initiales de détection et de quantification du HAdV ont été décrites précédemment [15].

Le test qPCR spécifique pour la détection du HAdV entérique [20], ciblant une séquence conservée de 118 pb du gène de la fibre HAdV-F, a été réalisé en utilisant l'amorce directe (5-AACTTTCTCTCTTAATAGACGCC-3) ; amorce inverse (5-AGGGGGCTAGAAAAACAAAA- 3) et sonde (5-CTGACACGGGCACTCT-3). En bref, les réactions HAdV-F qPCR ont été réalisées avec 5 µL de l'ADN extrait dans un volume final de 20 µL, contenant 10 µL du kit 2x QuantiTect Probe PCR (Qiagen, Valencia, CA, USA) et des amorces et une sonde avec concentrations finales de 0,5 µM et 0,25 µM, respectivement. Les réactions ont été réalisées dans le système PCR en temps réel Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) dans les conditions de cycles thermiques suivantes : 2 min à 50 °C, 15 min à 95 °C, 40 cycles de 15 s. à 95 °C et 1 min à 60 °C. Les échantillons présentant une courbe sigmoïde caractéristique et franchissant la ligne de seuil avec une valeur de seuil de cycle (Ct) < 40 ont été considérés comme positifs. Toutes les analyses comprenaient des contrôles négatifs et positifs (échantillon de selles), ainsi qu'un contrôle sans modèle.

2.4. Diversité génétique HAdV-F et séquençage nucléotidique

Pour évaluer la diversité génétique des souches HAdV-F circulant au Brésil, des échantillons positifs initialement caractérisés comme les types F40 et F41 [22] ont été reséquencés. Nous avons ciblé les six régions hypervariables (HVR1 – HVR6) du gène hexon en utilisant les amorces S29 et S52 [23] et la région de la tige partielle du gène à fibres longues en utilisant les amorces AdF1 et AdF2 [24].

Les réactions PCR ont été réalisées en utilisant l'enzyme Platinum Taq ADN polymérase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), avec 5 µL d'ADN extrait dans un volume réactionnel final de 25 µL. Les amplicons attendus de 640 et 664 nt pour le gène hexon et de 508 et 530 nt pour le gène fibre pour les types F40 et F41, respectivement, ont été purifiés à l'aide du kit d'extraction sur gel QIAquick (Qiagen), en suivant les instructions du fabricant. Les réactions de séquençage des amplicons purifiés ont été réalisées à l'aide du kit de réaction Big Dye Terminator v. 3.1 Cycle Sequencing Ready sur un analyseur génétique ABI Prism 3730 xl (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) sur la plateforme génomique institutionnelle Fiocruz pour le séquençage de l'ADN (PDTIS).

2.5. Analyse phylogénétique et mutationnelle de l'analyse

du chromatogramme F40/41 et des séquences consensus ont été obtenues à l'aide du logiciel Geneious Prime 2021.1.1 (Biomatters Ltd., Auckland, Nouvelle-Zélande). Les séquences d'hexons et de fibres nt des types F40 et F41 ont été analysées en termes d'identité la plus proche avec les séquences disponibles dans la base de données GenBank à l'aide de l'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, consulté le 5 mai 2023). Les séquences ont été alignées à l'aide de ClustalW [25] et la méthode du maximum de vraisemblance (ML) a été utilisée pour l'analyse phylogénétique à l'aide du programme randomisé Accelerated Maximum Likelihood (RAxML) [26] avec le modèle général réversible dans le temps (GTR) avec une distribution gamma. taux d'hétérogénéité entre les sites et 1000 itérations d'amorçage pour les gènes hexons et fibres, accessibles sur CIPRES Science Gateway [27]. Le résultat des exécutions RAxML a été utilisé dans MEGA11 v11.0.13 [28] pour visualiser et construire les arbres phylogénétiques. Les séquences de référence ont été obtenues à partir de la base de données GenBank du National Center for Biotechnology Information (NCBI).

De plus, pour étudier la diversité génétique des souches brésiliennes HAdV-F, des mutations synonymes et non synonymes dans les parties séquencées des gènes hexon et fibre ont été comparées avec des souches prototypes obtenues à partir de la base de données GenBank.

Les séquences nucléotidiques obtenues dans cette étude ont été déposées dans la base de données GenBank avec les numéros d'accès suivants : OQ442226 – OQ442299.

2.6. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 9.0.0. (Logiciel GraphPad, San Diego, Californie, États-Unis ; www.graphpad.com, consulté le 15 octobre 2023). Le test U de Mann-Whitney a été utilisé pour évaluer les différences significatives entre les qPCR protocoles. Les tests du Chi carré ou exacts de Fisher ont été utilisés pour analyser les caractéristiques dans les tableaux de contingence et la corrélation des valeurs Ct entre la qPCR pour Le HAdV (tous les types) et la qPCR spécifique au HAdV-F ont été évalués à l'aide de la corrélation de Pearson. coefficient. Pour toutes les analyses, une valeur $p < 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative.

3. Résultats

3.1. Détection de HAdV-F40/41 à l'aide d'un test qPCR spécifique

Dans notre précédente étude, menée sur des échantillons collectés entre janvier 2018 et En décembre 2020, nous avons étudié le rôle du HAdV chez les patients atteints d'AGE au Brésil. Initialement, nous avons utilisé un ensemble d'amorces qPCR dégénérées ciblant une région conservée du gène hexon (qPCR_HAdV) pour tester la présence de HAdV dans un total de 1 235 échantillons de selles. Des échantillons positifs avec de faibles valeurs de Ct ont été séquencés pour mieux caractériser les espèces HAdV et types, avec 39 % (123/315) des échantillons positifs au HAdV séquencés avec succès [15].

Dans la présente étude, nous avons utilisé un protocole qPCR avec des amorces spécifiques HAdV-F40/41 (qPCR_HAdV-F) dans 91 % des échantillons précédemment séquencés (112/123). Utilisation du qPCR_HAdV-F protocole, les espèces F ont été détectées dans 93,5 % (43/46) des échantillons séquencés précédemment identifiés comme types entériques F40 et F41 et dans 4,5 % (3/66) des échantillons précédemment identifiés. comme HAdV non entériques. Trois échantillons initialement caractérisés comme appartenant à l'espèce C testé positif à l'espèce F, tandis que trois échantillons caractérisés comme appartenant à l'espèce F testé négatif en utilisant qPCR_HAdV-F (Tableau 1).

Tableau 1. Comparaison entre les tests qPCR HAdV dégénérés et F-spécifiques.

Classification HAdV	qPCR dégénérée par HAdV ¹	qPCR HAdV-F		Positivité (%)
	N° d'échantillons testés positifs au HAdV	Positif	Négatif	
Types entériques	46	43	3	93,5
Types non entériques	66	3	63	4.5
HAdV non séquencé	108	34	74	31,5
Total	220	80	140	36,4

¹ Pour la comparaison des protocoles qPCR, le tableau affiche les résultats de caractérisation HAdV d'origine pour le échantillons, comme publié précédemment [15].

De plus, nous avons utilisé le test qPCR_HAdV-F pour le groupe d'échantillons HAdV-positifs qui n'a pas pu être séquencé en raison d'une faible détection virale (généralement des échantillons détectés avec Ct > 30). Parmi les échantillons HAdV-positifs non séquencés précédemment détectés avec le qPCR_HAdV, nous avons détecté HAdV-F dans 31,5% des échantillons (34/108) avec le nouveau protocole (Tableau 1).

Pour évaluer l'efficacité du test qPCR_HAdV-F, nous avons comparé les valeurs Ct obtenu en utilisant les deux tests pour chaque échantillon du groupe positif HAdV-F (n = 80). Dispersion des tracés et des analyses de régression ont été effectués sur chaque échantillon afin de déterminer la corrélation entre les valeurs Ct pour les deux tests. Un coefficient de corrélation de Pearson de 0,96 ($p < 0,0001$) indique une forte corrélation (valeur $r = 1$) entre la charge virale estimée obtenue par le test qPCR_HAdV-F et le test qPCR_HAdV (Figure 1a). Pour chaque amorce ensemble, 66,3 % des échantillons testés (53/80) présentaient des efficacités d'amplification PCR similaires (Ct 2,5 cycles) (Figure 1b). Les efficacités PCR estimées correspondaient à une moyenne de 1,75 valeurs Ct entre les ΔCts des échantillons, qui variaient de 0,04 à 8,09. Seulement trois les échantillons ont montré un ΔCt supérieur à 5,0 Ct. Pour évaluer les performances du jeu d'amorces spécifiques à HAdV-F, nous avons comparé les valeurs Ct obtenues par qPCR_HAdV-F et qPCR_HAdV. tests sur chaque échantillon positif à HAdV-F. Dans 48,75 % (39/80) des échantillons testés, les valeurs Ct pour les espèces, les amorces spécifiques à F étaient plus faibles, ce qui suggère que les amorces spécifiques à HAdV-F

Parmi les 43,9 % (54/123) d'échantillons précédemment caractérisés comme HADV-F, sur la base de une région conservée du gène hexon [15], nous avons séquencé avec succès 70 % (7/10) du Échantillons F40 et 68,2 % (30/44) des échantillons F41 dans cette étude pour le HVR1-HVR6 du gène hexon. De plus, nous avons également amplifié la région partielle de la tige du gène des fibres longues dans 100% (10/10) des échantillons F40 et 61,4% (27/44) des F41.

Figure 2. Arbre phylogénétique basé sur la séquence nucléotidique des régions hypervariables (HVR1-HVR6) du gène hexon. Les souches HAdV-F40 et -F41 isolées dans cette étude sont désignées par un (HVR1-HVR6) du gène hexon. Les souches HAdV-F40 et -F41 isolées dans cette étude sont désignées par un cercle rempli d'orange et de rouge, respectivement. Les souches de référence ont été téléchargées à partir du référentiel GenBank et étiquetées avec leur numéro d'accèsion/type HAdV/année de collecte/ID d'isolat/pays.

un cercle rempli d'orange et de rouge, respectivement. Les souches de référence ont été téléchargées à partir du référentiel Gen-Bank et étiquetées avec leur numéro d'accèsion/type HAdV/année de collecte/ID d'isolat/pays. Les souches prototypes des types F40 et F41 sont marquées d'un losange rempli de noir. L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du programme randomisé Axelerated Maximum Likelihood (RAxML), avec le modèle général réversible dans le temps (GTR) avec un taux d'hétérogénéité distribué par gamma sur les sites et 1 000 itérations d'amorçage, et le logiciel MEGA11 v11. 0.13 (Auckland, Nouvelle-Zélande) a été utilisé pour construire et visualiser l'arbre. Les pourcentages de boot-strap ≥ 70 % sont affichés à chaque point de dérivation. Les groupes de type génome hexon (H-GTC) et les sous-groupes sont indiqués pour les souches F41.

L'analyse phylogénétique des HVR1-HVR6 dans les souches F41 a montré que les séquences brésiliennes se regroupaient en deux lignées différentes, H-GTC1 et H-GTC2 (H-GTC : groupe de types de génome basé sur le gène hexon). Parmi celles-ci, 20 % (6/30) des souches se sont regroupées dans H-GTC1, tandis que 80 % (24/30) se sont regroupées dans H-GTC2 (Figure 2). En termes d'identité entre les isolats brésiliens, les souches H-GTC2 présentaient une plage de variation légèrement plus large (95,9 à 100 % d'identité nt) par rapport aux souches H-GTC1 (96,2 à 100 % d'identité nt). Concernant le prototype TAK (DQ315364), H-GTC2 (92,4 à 93,5 % d'identité nt) présentait un degré de divergence plus élevé que le H-GTC1 (96,5 à 99,8 % d'identité nt).

Une analyse plus approfondie a révélé que H-GTC1 était subdivisé en trois sous-groupes. H-GTC1.1 avec une souche représentative (LVCA_30376), regroupée avec des souches détectées en Asie (MK342151 et KT210193), en Europe (OP174923, ON532825 et MW567963) et en Afrique du Sud (MK962806), partageant > 99 % de nt identité. Quatre souches se sont regroupées dans H-GTC1.2 et ont présenté une identité nt maximale (> 99 %) avec les souches de Chine (HM565136 et MH465394) et du Japon (AB103345). H-GTC1.3 avait une seule souche représentative (LVCA_30088), regroupée avec des souches de pays asiatiques (AB103347, MT952499 et DQ336391) et des États-Unis (ON565007), affichant une identité nt supérieure à 99 %.

Les souches H-GTC2 sont divisées en deux sous-groupes, le H-GTC2.2 hébergeant la majorité des séquences. Les identités nt partagées variaient de 98,4 % à 100 % avec des souches provenant de Chine (KY316161), du Japon (LC726493), d'Afrique du Sud (MK962810), de Suède (KX868523) et des États-Unis (KF303069). Enfin, une séquence (LVCA_29342) regroupée dans H-GTC2.1, partageant une identité nt maximale (> 98 %) avec des souches de pays asiatiques (AB610522, AB610527, KT210190 et MT952501) et des États-Unis (ON56501).

3.2.2. Gène de fibre

La région partielle de la tige du gène de la fibre était plus conservée que le gène de l'hexon, parmi les séquences de types F40 et F41. Les dix souches brésiliennes F40 se sont regroupées, affichant une similarité nt supérieure à 99 %. La région analysée du gène de la fibre présentait une identité de séquence maximale de > 98 % avec la souche de référence Dungan (L19443) et avec les souches détectées en Finlande (KU162869), en Inde (KU884631 et MT952560) et en Afrique du Sud (MK955316). (Figure 3).

Les souches brésiliennes F41 partageaient une identité nt supérieure à 98 % avec la souche prototype TAK (DQ315364) et étaient regroupées en deux groupes génétiques (F-GTC : groupe de types de génome basé sur le gène de la fibre). Au sein du cluster F-GTC1, aucune souche n'est regroupée avec le sous-groupe F-GTC1.1. Une souche brésilienne (LVCA_29630) regroupée dans le sous-groupe F-GTC1.2, tandis que trois autres souches se sont regroupées dans le sous-groupe F-GTC1.3, affichant des identités nt maximales (> 99 %) avec les souches de Chine (KY316160, MT150355 et AB610544) et Japon (AB610540 et AB2468). Toutes les autres souches brésiliennes F41 (n = 23) regroupées dans F-GTC2 (sous-groupe F-GTC2.1) et partageaient des identités nt allant de 91,2 % à 100 % par rapport aux autres groupes. L'identité nt maximale (> 99 %) a été observée avec des souches d'Afrique du Sud (MK962809), du Royaume-Uni (OP174926), d'Irak (MG925782) et d'Allemagne (ON532825 et KX868523).

(Figure 3). Fait intéressant, aucune souche brésilienne n'est regroupée avec le sous-groupe F-GTC2.2.



Figure 3. Arbre phylogénétique basé sur la séquence nucléotidique de la région de la tige partielle du gène de la fibre. Les souches HAdV-F40 et -F41 isolées dans cette étude sont désignées respectivement par un cercle rempli d'orange et de rouge. Les souches de référence ont été téléchargées à partir du référentiel GenBank et étiquetées avec leur numéro d'accèsion/type HAdV/année de collecte/ID d'isolat/pays. Les souches prototypes des types F40 et F41 sont marquées d'un losange rempli de noir. L'arbre phylogénétique a été construit à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance à l'aide du programme RAXML (Randomized Axelerated Maximum Likelihood), avec le modèle général réversible dans le temps (GTR) avec un taux d'hétérogénéité distribué par gamma sur les sites et 1 000 itérations d'amorçage, et le logiciel MEGA11 v11. 0.13 a été utilisé pour construire et visualiser l'arbre. Les valeurs de pourcentage bootstrap ≥ 70 % sont affichées à chaque point de branchement. Les groupes et sous-groupes de type génome fibreux (F-GTC) sont indiqués pour les souches F41.

3.3. Analyse de mutation de l'hexon et de la protéine fibreuse des souches HAdV-F circulant au Brésil 3.3.1. Gène hexon

Les souches brésiliennes HAdV-F40 détectées étaient pour la plupart conservées entre elles au sein de HVR1-HVR6. Un échantillon (LVCA_29219) a montré une mutation transversion (G850T), qui a entraîné un changement d'acide aminé de l'alanine (A) à la sérine (S). Comparé aux Dugan

prototype, toutes les souches brésiliennes abritaient une mutation qui entraînait un changement d'acide aminé [sérine (S) en leucine (L) (C488T)] (Figure 4).

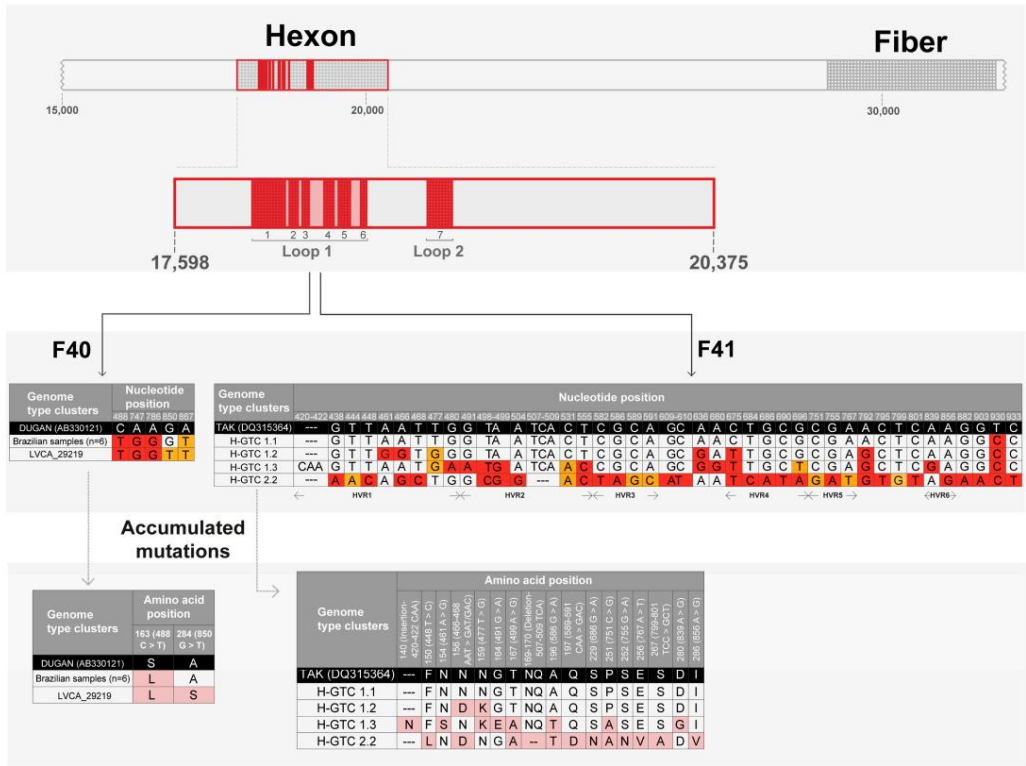


Figure 4. Génome HAdV avec la protéine hexon représentative du prototype F41 de taille TAK (DQ315364) (2 778 nt) affichant les HVR. Positions nucléotidiques des mutations synonymes accumulées avec leurs mutations d'acides aminés accumulées dans HVR1-HVR6 de l'hexon par rapport à la souche prototype Dungan (L19443) et TAK (DQ315364) pour les types F40 et F41, respectivement. Les mutations de transition et de transversion sont surlignées respectivement en rouge et orange. Les mutations des acides aminés sont surlignées en rose. La position des nucléotides définie sur la figure fait référence à la région codante des amorces dans HVR1-HVR6 (position 289-967 nt dans le gène hexon).

D'une manière différente, les souches F41 ont accumulé de nombreuses mutations non synonymes et synonymes. Un seul échantillon (LVCA_30376) regroupé avec la souche TAK de référence (H-GTC 1.1), avec une mutation de transition (T930C) partagée avec toutes les souches brésiliennes. Des mutations supplémentaires dans quatre souches brésiliennes ont montré des caractéristiques similaires à celles des souches de référence H-GTC 1.2, avec des mutations de transition et de transversion au sein du HRV1. Ces mutations ont entraîné des modifications des acides aminés dans A446G [asparagine (N) en acide aspartique (D)] et T477G [asparagine (N) en lysine (K)]. Un échantillon regroupé en H-GTC 1.3, portant plusieurs mutations H-GTC 1.2 ainsi que d'autres mutations non synonymes, y compris l'insertion de l'acide aminé asparagine (N) (CAA ; nt 420-422) (Tableau 1). La plupart des souches brésiliennes F41 détectées (n = 24) se sont regroupées avec H-GTC 2.2, accumulant plusieurs mutations sur les six HVR analysés. Ce groupe se distingue des autres en raison d'une délétion de trois nucléotides (TCA ; nt 507-509) et de la présence de mutations synonymes (G438A) et non synonymes (T448C ; CCA589-591GAC ; G686A ; G755A ; A767T ; T799G ; C801T ; A856G) (Figure 4).

3.3.2. Gène de fibre

Pour les souches brésiliennes F40, la région de la tige partielle du gène de la fibre a accumulé plus de mutations que la région HVR1-HVR6 du gène de l'hexon. Tous les échantillons brésiliens F40 regroupés, divergeant de la souche Dungan de référence avec des mutations entraînant des changements d'acides aminés dans les positions G476A [arginine (R) en glutamine (Q)], A914G

[lysine (K) en arginine (R)] et G946A [alanine (A) en thréonine (T)]. Trois de ces souches F40 présentait une mutation supplémentaire en G502A [acide aspartique (D) en asparagine (N)].

En revanche, pour les échantillons brésiliens F41, la région partielle de la tige du gène de la fibre était plus conservée que la région HVR1-HVR6 du gène hexon. Malgré moins de mutations, les souches F41 ont été divisées en deux F-GTC majeurs. Par rapport à la souche TAK de référence, la majorité des mutations ont entraîné des substitutions synonymes.

Seules deux mutations non synonymes ont été détectées. Le premier a été trouvé dans toutes les souches brésiliennes F41 des deux sous-groupes (G596A), ce qui a modifié l'acide aminé de la sérine (S) à l'asparagine (N). L'autre mutation non synonyme du gène de la fibre F41 a été détectée uniquement dans des échantillons de F-GTC2.2 (G748T), entraînant le changement d'acide aminé de la valine (V) à la phényl-alanine (F).

4. Discussion

L'AGE provoqué par le HAdV entérique impose un fardeau important et souvent sous-estimé aux maladies diarrhéiques pédiatriques dans les PRFI [3,12,29]. L'absence de méthodologie de surveillance standardisée, y compris de méthodes de détection moléculaire quantitative spécifiques au HAdV-F40/41, nuit à une caractérisation plus précise du HAdV entérique et de son impact sur les maladies diarrhéiques. Notre étude fournit une analyse comparative des performances analytiques de deux tests qPCR utilisés pour la détection du HAdV général et entérique spécifique dans des échantillons de selles et ajoute de nouvelles informations concernant la diversité génétique des souches HAdV-F40/41 détectées dans les cas d'AGE au Brésil.

En utilisant un test qPCR ciblant spécifiquement HAdV-F, nous avons confirmé sa sensibilité grâce à la détection d'échantillons de selles HAdV-F préalablement séquencés. De plus, le nouveau test a identifié trois échantillons précédemment classés comme espèce C. Cela suggère une co-infection potentielle d'espèces HAdV distinctes chez le même patient. Les trois échantillons appartenaient à des patients âgés de moins de deux ans, un patient présentant en outre une détection simultanée du rotavirus.

Dans notre étude précédente, nous avons également observé des co-détectations entre différents virus entériques. Plus précisément, le HAdV a été identifié dans 30 % des échantillons précédemment confirmés positifs au norovirus ou au rotavirus [15]. Notre équipe de recherche a également signalé des taux de détection de 32,1 % pour les norovirus [30] et de 12 % pour les rotavirus [31] dans des études menées dans les mêmes régions du Brésil. Ces résultats mettent en évidence la circulation importante de ces virus entériques majeurs dans le pays, notamment chez les enfants de moins de deux ans. Comme prévu, la probabilité de co-détectations augmente avec le nombre d'agents pathogènes dépistés. Dans le même ordre d'idées, une réanalyse de la Global Enteric Multicenter Study (GEMS) a révélé la présence d'au moins deux agents pathogènes associés à la diarrhée dans 38,9 % des échantillons [29].

Parmi les types non entériques de HAdV, les espèces A, B, C et D sont fréquemment détectées dans les échantillons de selles dans le monde entier [13,14,32-34]. Bien que des espèces HAdV non entériques soient fréquemment détectées, leur rôle précis dans les cas d'AGE reste incertain [12]. Néanmoins, certaines études ont rapporté la détection du HAdV non entérique comme seul agent chez les nourrissons atteints d'AGE. Par exemple, lors d'une épidémie d'AGE au Brésil, HAdV-A12 était le seul virus entérique détecté parmi plusieurs autres virus dépistés, avec des charges virales élevées détectées dans cinq échantillons de selles sur neuf [35]. Une étude cas-témoins menée en Chine a suggéré une forte corrélation entre HAdV-B3 et la diarrhée chez les enfants [36]. En Italie, une étude portant sur des enfants hospitalisés présentant des symptômes d'AGE n'a détecté que les HAdV-C1, -C2 et -B3 non entériques. Parmi les échantillons positifs au HAdV, des types non entériques ont été détectés chez plus de 75 % des patients comme seul pathogène entérique [37]. Ces études soulignent l'importance de la surveillance et de la caractérisation des types non entériques, en particulier lors d'épidémies d'AGE.

Le séquençage partiel des protéines de la capside entérique du HAdV pourrait également constituer une méthode efficace pour les analyses phylogénétiques et la surveillance de nouvelles lignées émergentes lorsque le séquençage du génome entier n'est pas disponible. Différentes espèces présentent différents mécanismes d'évolution. Par exemple, l'émergence de nouveaux types chez les espèces HAdV B, C et D est associée à une recombinaison homologue au sein des types d'espèces [38-40]. En revanche, pour l'espèce F, il n'existe aucune preuve de recombinaison entre les types F40 et F41, et sa structure moléculaire

l'évolution semble être motivée par l'accumulation de mutations ponctuelles dans diverses régions du génome au sein de chaque type. Des études récentes analysant l'ensemble du génome de HAdV-F41 ont montré que les gènes hexon et fibre (courts et longs), ainsi que les régions E3 et E4, sont les principaux points chauds des mutations (41-43). Des études phylogénétiques récentes du type F41 ont identifié trois lignées ou groupes génétiques différents (41). Pour mieux élucider la phylogénie et la diversité génétique du HAdV entérique circulant au Brésil, nous avons séquencé le HVR1-HVR6 du gène hexon et la région de la tige partielle du gène de la fibre à partir d'échantillons positifs au HAdV-F collectés entre 2018 et 2020. Nous avons également comparé les souches brésiliennes F41 avec les séquences F41 obtenues avant et pendant les cas d'hépatite sévère.

Conformément aux résultats obtenus dans l'est de l'Inde [44], notre analyse a démontré que les souches brésiliennes HAdV-F40 étaient moins prédominantes et plus génétiquement conservées que les souches HAdV-F41. Les souches brésiliennes F41 ont été divisées en deux lignées ou groupes principaux sur la base de l'analyse phylogénétique des gènes d'hexon et de fibres longues partiellement séquencés, la majorité des souches circulant dans le pays se regroupant avec GTC2. D'autres pays ont signalé une co-circulation de diverses souches F41, avec une prédominance de la lignée 2 [41,44]. Les taux de détection plus élevés du F41 par rapport au F40 peuvent être liés à sa plus grande diversité génétique, une tendance rapportée dans des études menées au Brésil et dans plusieurs autres pays [13,14,34,36] et qui peut conférer un avantage génétique. Les analyses phylogénétiques des gènes hexon et fibre de F40 et F41 révèlent que les souches brésiliennes circulant dans le pays présentent une grande similitude génomique avec celles circulant dans le monde, sans preuve d'une nouvelle variante émergente de HAdV-F.

Fin 2021 et début 2022, l'émergence de cas d'hépatite aiguë chez les enfants a été signalée dans plusieurs pays du monde. Ces cas étaient initialement liés à des taux de détection élevés de HAdV-F41, sans détection de virus de l'hépatite aiguë classique [45,46]. Dans un premier temps, cette observation suggérait la circulation d'une nouvelle souche potentiellement virulente de HAdV-F41. Dans notre étude, nous avons détecté quelques mutations dans les gènes hexons et fibres longues partiellement séquencés des souches de type F41 circulant avant les cas d'hépatites sévères. De plus, plusieurs souches F41 identifiées au Brésil plus de deux ans avant l'apparition de cas d'hépatite sévère présentent une identité nucléotidique élevée avec des souches F41 récemment séquencées détectées dans des échantillons provenant d'enfants affectés. Nos résultats concordent avec des études menées au Royaume-Uni, en Allemagne et au Kenya qui ont analysé la diversité génomique des souches F41 en circulation avant et pendant l'émergence de cas d'hépatite sévère. La majorité des souches appartenaient à la lignée 2, ce qui implique qu'il pourrait y avoir des facteurs supplémentaires impliqués dans l'émergence de ces cas (41, 43). Plus récemment, une étude menée au Royaume-Uni a également rapporté que les lignées F41 détectées avant et après la COVID circulaient déjà au Royaume-Uni [42]. Toutes ces études ont détecté une troisième lignée, montrant une divergence significative dans la fibre courte, suggérant un nouveau recombinaut qui n'a pas encore été détecté au Brésil.

Des découvertes récentes ont indiqué que la co-infection du virus adéno-associé 2 (AAV2) avec d'autres agents pathogènes, dont HAdV-F41, peut conduire à une maladie du foie (47, 48). Une étude épidémiologique basée sur les eaux usées en Irlande a également déterminé une corrélation entre le fardeau des cas d'hépatite sévère et la charge virale quotidienne de HAdV et d'AAV2 dans les eaux usées, indiquant que la circulation communautaire de ces agents pathogènes pourrait être associée à l'épidémie (49).

Notre étude a des limites. Premièrement, nous n'avons pas pu effectuer de tests qPCR-F sur tous les échantillons positifs au HAdV, ni séquencer tous les échantillons positifs des types F40 et F41. Cela pourrait conduire à une mauvaise interprétation des principaux clusters circulant dans le pays et potentiellement manquer des informations clés sur la diversité du HAdV-F. De plus, notre analyse de l'évolution de l'espèce F était basée sur des segments partiels des gènes de l'hexon et des fibres longues plutôt que sur le génome complet. D'autres gènes, tels que le gène des fibres courtes et les régions E3 et E4, sont des points chauds connus pour les mutations et leur analyse pourrait fournir de nouvelles données importantes concernant l'évolution du HAdV (41-43).

5. Conclusions

Dans la présente étude, nous avons exploré la diversité génétique des souches HAdV-F40/41 par amplification partielle des régions hypervariables de l'hexon et des gènes de fibres longues provenant de

patients atteints d'AGE. L'analyse phylogénétique a révélé que la majorité des souches brésiliennes F41 se regroupaient dans la lignée GCT2. À l'inverse, les souches F40 étaient davantage conservées dans les deux gènes analysés. Notre étude fournit de nouvelles informations sur la diversité génétique des espèces HAdV-F au Brésil. De plus, nous avons démontré l'utilité des tests qPCR de détection du HAdV entériques et non entériques, qui peuvent améliorer considérablement la surveillance du HAdV, en particulier dans les cas où le séquençage n'est pas réalisable. Ces tests doivent être pris en compte pour la mise en œuvre de tests de diagnostic moléculaire optimisés dans les programmes de surveillance de l'AGE viral. Enfin, notre étude offre des données complètes sur la diversité génétique et l'évolution des souches HAdV-F, soutenant ainsi les futurs efforts de développement de vaccins.

Contributions des auteurs : Conceptualisation, LGdN, SKS et TMF ; méthodologie, LGdN, SKS et TMF ; analyse formelle, LGdN, SKS, RRJ et TMF ; enquête, LGdN et SKS ; conservation des données, LGdN, SKS et RRJ ; rédaction : préparation du projet original, LGdN, SKS et RRJ ; rédaction – révision et édition, TMF ; supervision, TMF ; administration de projet, TMF ; acquisition de financement, TMF. Tous les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Financement : Cette recherche a été soutenue par le Conseil national brésilien pour le développement scientifique et technologique (CNPq), FAPERJ—Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, Processo SEI 260003/000530/2023 (Réf. Proc. .N.º 200.171/2023 ; Jovem Cientista do Nosso Estado, Fumian, TM), et PAEF-3 de l'Institut Oswaldo Cruz, Fiocruz. Un soutien supplémentaire a été apporté par le CGLab, le ministère brésilien de la Santé. Fumian TM est une bourse de recherche en productivité du CNPq brésilien.

Déclaration de disponibilité des données : les ensembles de données générés et analysés au cours de la présente étude sont disponibles dans le référentiel GenBank sous les numéros d'accès OQ442226-OQ442299. Cette étude est enregistrée dans le Système national brésilien de gestion du patrimoine génétique et des connaissances traditionnelles associées (SisGen, n° A837EB6).

Remerciements : Nous tenons à remercier tout le personnel de LVCA pour son soutien technique.

Conflits d'intérêts : Les auteurs déclarent qu'ils n'ont aucun intérêt financier concurrent connu ni aucune relation personnelle qui aurait pu sembler influencer le travail rapporté dans cet article. Les auteurs ont lu et accepté la version publiée du manuscrit.

Les références

1. Collaborateurs du GBD 2016 sur les maladies diarrhéiques. Estimations de la morbidité, de la mortalité et des étiologies mondiales, régionales et nationales de la diarrhée dans 195 pays : une analyse systématique pour l'étude sur la charge mondiale de morbidité 2016. *Lancet Infect. Dis.* 2018, 18, 1211-1228. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
2. Wardlaw, T. ; Salama, P. ; Brocklehurst, C. ; Chopra, M. ; Mason, E. Diarrhée : Pourquoi les enfants meurent encore et que peut-on faire. *Lancet* 2010, 375, 870-872. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
3. Cohen, AL; Platts-Mills, JA; Nakamura, T. ; Opératrice, DJ ; Antoni, S. ; Mwenda, JM; Weldegebriel, G. ; Rey-Benito, G. ; de Oliveira, LH; Ortiz, C. ; et coll. Étiologie et incidence de la diarrhée nécessitant une hospitalisation chez les enfants de moins de 5 ans dans 28 pays à faible revenu et à revenu intermédiaire : résultats du réseau mondial de surveillance de la diarrhée pédiatrique. *BMJ Glob. Santé* 2022, 7, e009548. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
4. Kotloff, KL; Nataro, JP ; Soudeur noir, WC ; Nasrin, D. ; Farag, TH; Panchalingam, S. ; Wu, Y. ; True, DONC ; Sur, D. ; Breiman, RF; et coll. Fardeau et étiologie des maladies diarrhéiques chez les nourrissons et les jeunes enfants dans les pays en développement (étude multicentrique mondiale entérique, GEMS) : une étude cas-témoins prospective. *Lancet* 2013, 382, 209-222. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
5. Opérateur, DJ ; Platts-Mills, JA; Nataro, S. ; Page, N. ; Seheri, M. ; Mphahlele, J. ; Praharaj, moi. ; Kang, G. ; Araujo, informatique ; Leite, JPG ; et coll. Étiologie de la diarrhée aqueuse aiguë sévère chez les enfants dans le réseau mondial de surveillance des rotavirus utilisant la réaction en chaîne par polymérase quantitative. *J. Infect. Dis.* 2017, 216, 220-227. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
6. Platts-Mills, JA; Liu, J. ; Rogawski, ET; Kabir, F. ; Lertsethtakarn, P. ; Siguas, M. ; Khan, SS ; Praharaj, moi. ; Murei, A. ; Nshama, R. ; et coll. Utilisation de méthodes de diagnostic moléculaire quantitative pour évaluer l'étiologie, le fardeau et les caractéristiques cliniques de la diarrhée chez les enfants vivant dans des contextes à faibles ressources : une réanalyse de l'étude de cohorte MAL-ED. *Lancette Glob. Santé* 2018, 6, e1309–e1318. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
7. Davison, AJ; Benkˆo, M. ; Harrach, B. Contenu génétique et évolution des adénovirus. *J. Général Virol.* 2003, 84, 2895-2908. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
8. Séto, D. ; Chodosh, J. ; Brister, JR ; Jones, MS ; Membres de la communauté de recherche sur les adénovirus. Utilisation de la séquence du génome entier pour caractériser et nommer les adénovirus humains. *J. Virol.* 2011, 85, 5701-5702. [\[Référence croisée\]](#)
9. Lion, T. Infections à adénovirus chez les patients immunocompétents et immunodéprimés. *Clin. Microbiol. Rév.* 2014, 27, 441-462. [\[Référence croisée\]](#)

10. Lynch, JP; Kajon, AE Adénovirus : épidémiologie, propagation mondiale de nouveaux sérotypes et progrès en matière de traitement et de prévention. *Semin. Respir. Critique. Soins Med.* 2016, 37, 586-602. [\[Référence croisée\]](#)
11. Shieh, W.-J. Infections à adénovirus humains dans la population pédiatrique : une mise à jour sur la corrélation clinico-pathologique. *Bioméde. J.* 2021, 45, 38-49. [\[Référence croisée\]](#)
12. Lee, B. ; Damon, CF; Platts-Mills, JA Gastro-entérite aiguë pédiatrique associée à l'adénovirus 40/41 dans les pays à faible revenu et Pays à revenu intermédiaire. *Curr. Avis. Infecter. Dis.* 2020, 33, 398-403. [\[Référence croisée\]](#)
13. Afrad, MH; Avzun, T. ; Haque, J. ; Haque, W. ; Hossain, MOI ; Rahman, AR ; Ahmed, S. ; Faruque, ASG; Rahman, MZ; Rahman, M. Détection des adénovirus entériques et non entériques chez les patients atteints de gastroentérite, Bangladesh, 2012-2015. *J.Méd. Virol.* 2018, 90, 677-684. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
14. Kumthip, K. ; Khamrin, P. ; Ushijima, H. ; Maneekarn, N. Adénovirus entériques et non entériques associés à la gastro-entérite aiguë chez les patients pédiatriques en Thaïlande, 2011 à 2017. *PLoS ONE* 2019, 14, e0220263. [\[Référence croisée\]](#)
15. Nascimento, LG ; Fialho, AM; Andrade, JdSR; Assistance, RMS; Fumian, TM Adénovirus entérique humain F40/41 comme cause majeure de gastroentérite aiguë chez les enfants au Brésil, 2018 à 2020. *Sci. Représentant* 2022, 12, 11220. [\[CrossRef\]](#) [\[Pub Med\]](#)
16. Zhou, H.-L. ; Bessey, T. ; Wang, SM ; Mo, Z.-J. ; Barclay, L. ; Wang, J.-X. ; Zhang, C.-J. ; Ma, J.-C. ; Qiu, C. ; Zhao, G. ; et coll. Fardeau et étiologie de la diarrhée modérée et sévère chez les enfants de moins de 5 ans vivant dans le nord et le sud de la Chine : surveillance prospective basée sur la population. *Pathog intestinal.* 2021, 13, 33. [\[Réf. croisée\]](#)
17. Marais, K. ; Tayler, R. ; Pollock, L. ; Roy, K. ; Lakha, F. ; Ho, A. ; Henderson, D. ; Divala, T. ; Currie, S. ; Yirrell, D. ; et coll. Enquête sur les cas d'hépatite d'étiologie inconnue chez les jeunes enfants, Écosse, 1er janvier 2022 au 12 avril 2022. *Euro Surveill.* 2022, 27, 2200318. [\[CrossRef\]](#) [\[Pub Med\]](#)
18. Zhang, L.-Y. ; Huang, L.-S. ; Yue, Y.-H. ; Fawaz, R. ; Lim, JK ; Fan, J.-G. Hépatite aiguë d'origine inconnue chez les enfants : précoce Observations de l'épidémie de 2022. *J. Clin. Trad. Hépatol.* 2022, 10, 522-530. [\[Référence croisée\]](#)
19. Grand, RJ Pathogénicité et virulence de l'adénovirus humain F41 : liens possibles avec une hépatite grave chez les enfants. *Virulence* 2023, 14, 2242544. [\[CrossRef\]](#)
20. Liu, J. ; Gratz, J. ; Amour, C. ; Nshama, R. ; Walongo, T. ; Maro, A. ; Mduma, E. ; Platts-Mills, J. ; Boisen, N. ; Nataro, J. ; et coll. Optimisation des méthodes de PCR quantitative pour la détection des entéropathogènes. *PLoS ONE* 2016, 11, e0158199. [\[Référence croisée\]](#)
21. Herroth, BE; Conden-Hansson, A.-C. ; Rehnstam-Holm, A.-S. ; Girones, R. ; Allard, AK Facteurs environnementaux influençant les agents pathogènes viraux humains et leurs organismes indicateurs potentiels chez la moule bleue, *Mytilus Edulis* : le premier rapport scandinave. *Appl. Environ. Microbiol.* 2002, 68, 4523-4533. [\[Référence croisée\]](#)
22. Allard, A. ; Albinsson, B. ; Wadell, G. Typage rapide des adénovirus humains par une PCR générale combinée à une analyse des endonucléases de restriction. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39. [\[Réf. croisée\]](#)
23. Li, L. ; Shimizu, H. ; Doan, LTP; Toung, PG ; Okitsu, S. ; Nishio, O. ; Suzuki, E. ; SEO, JK ; Kim, KS ; Müller, WEG; et coll. Caractérisations des isolats d'adénovirus de type 41 provenant d'enfants atteints de gastroentérite aiguë au Japon, au Vietnam et en Corée. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42, 4032-4039. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
24. Xu, W. ; McDonough, MC; Erdman, DD Identification spécifique à l'espèce des adénovirus humains par un test PCR multiplex. *J. Clin. Microbiol.* 2000, 38, 4114-4120. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
25. Larkin, MA; Boucliers noirs, G. ; Brun, NP ; Chenna, R. ; McGettigan, Pennsylvanie ; McWilliam, H. ; Valentin, F. ; Wallace, IM ; Wilm, A. ; López, R. ; et coll. Clustal W et Clustal X version 2.0. *Bioinformatique* 2007, 23, 2947-2948. [\[Référence croisée\]](#)
26. Stamatakis, A. RAXML Version 8 : Un outil pour l'analyse phylogénétique et la post-analyse des grandes phylogénies. *Bioinformatique* 2014, 30, 1312-1313. [\[Référence croisée\]](#)
27. Miller, MA; Pfeiffer, W. ; Schwartz, T. Création de la passerelle scientifique CIPRES pour l'inférence de grands arbres phylogénétiques. Dans *Actes de l'atelier 2010 Gateway Computing Environments (GCE)*, Nouvelle-Orléans, LA, États-Unis, 14 novembre 2010 ; p. 1 à 8. [\[Référence croisée\]](#)
28. Tamura, K. ; Stecher, G. ; Kumar, S. MEGA11 : Analyse génétique évolutive moléculaire version 11. *Mol. Biol. Évol.* 2021, 38, 3022-3027. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
29. Liu, J. ; Platts-Mills, JA; Juma, J. ; Kabir, F. ; Nkeze, J. ; Okoi, C. ; Opératrice, DJ ; Uddin, J. ; Ahmed, S. ; Alonso, PL; et coll. Utilisation de méthodes de diagnostic moléculaire quantitative pour identifier les causes de la diarrhée chez les enfants : une réanalyse de l'étude cas-témoins GEMS. *Lancet* 2016, 388, 1291-1301. [\[Référence croisée\]](#)
30. Sarmiento, Saskatchewan ; de Andrade, JdSR; Miagostovitch, député ; Fumian, TM Caractéristiques virologiques et épidémiologiques du norovirus Infections au Brésil, 2017-2018. *Virus* 2021, 13, 1724. [\[CrossRef\]](#)
31. Gutierrez, MB ; Fialho, AM; Maranhão, AG; Malte, FC ; Andrade, JdSRd; Assis, RMSd; Mouta, SdSe; Miagostovitch, député ; Leite, JPG ; Machado Fumian, T. Rotavirus A au Brésil : épidémiologie moléculaire et surveillance en 2018-2019. *Pathogènes* 2020, 9, 515. [\[CrossRef\]](#)
32. Gelaw, A. ; Pietsch, C. ; Liebert, UG Diversité génétique de l'adénovirus humain et de l'astrovirus humain chez les enfants atteints de gastroentérite aiguë dans le nord-ouest de l'Éthiopie. *Cambre. Virol.* 2019, 164, 2985-2993. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
33. Portail, TM ; Reymao, TKA ; Quinderé Neto, Géorgie ; Fiuza, MKDC; Teixeira, DM; Lima, ICG ; Sousa Júnior, CE; Bandeira, RDS ; De Deus, DR; Justino, MCA; et coll. Détection et génotypage des virus entériques chez les enfants hospitalisés atteints de gastroentérite aiguë à Belém, Brésil : apparition de virémie à adénovirus par espèce F, types 40/41. *J.Méd. Virol.* 2019, 91, 378-384. [\[Référence croisée\]](#)

34. Primo, D. ; Pacheco, GT; Timenetsky, MdCST ; Luchs, A. Surveillance et caractérisation moléculaire de l'adénovirus humain chez les patients atteints de gastroentérite aiguë à l'ère du vaccin contre le rotavirus, Brésil, 2012-2017. *J. Clin. Virol.* 2018, 109, 35-40. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
35. Portes, SAR ; Volotão, EdM; Rocha, MS; Rebelo, MC; Xavier, MdPTP ; Assis, RMd; Rose, TL; Miagostovitch, député ; Leite, JPG ; Carvalho-Costa, FA Une épidémie de gastroentérite à adénovirus non entérique A12 à Rio de Janeiro, Brésil. *Mémoire. Inst. Oswaldo Cruz* 2016, 111, 403-406. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
36. Qiu, F.-Z.; Shen, XX.-X.; Li, G.-X.; Zhao, L. ; Chen, C. ; Duan, S.-X.; Guo, J.-Y. ; Zhao, MC ; Yan, T.-F. ; Qi, J.-J. ; et coll. Adénovirus associé à la diarrhée aiguë : une étude cas-témoins. *Infecter BMC. Dis.* 2018, 18, 450. [\[Réf. croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
37. De Francesco, MA; Lorenzin, G. ; Meini, A. ; Schumacher, RF; Caruso, A. Adénovirus non entériques associés à la gastroentérologie ténit chez les enfants hospitalisés. *Microbiol. Spectre.* 2021, 9, e0030021. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
38. Dhingra, A. ; Hage, E. ; Ganzenmueller, T. ; Böttcher, S. ; Hofmann, J. ; Hamprecht, K. ; Obermeier, P. ; Rath, B. ; Hausmann, F. ; Dobner, T. ; et coll. Evolution moléculaire des espèces d'adénovirus humains (HAdV) *C. Sci. Rapport* 2019, 9, 1039. [\[CrossRef\]](#) [\[Pub Med\]](#)
39. Loukachev, AN ; Ivanova, OE ; Eremeeva, TP ; Iggo, RD Preuve de recombinaison fréquente parmi les adénovirus humains. *J. Le général Virol.* 2008, 89, 380-388. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
40. Robinson, CM; Singh, G. ; Lee, JY ; Dehghan, S. ; Rajaiya, J. ; Liu, EB; Yousuf, MA; Betensky, RA; Jones, MS ; Teinturier, DW ; et coll. Evolution moléculaire des adénovirus humains. *Sci. Rep.* 2013, 3, 1812. [\[CrossRef\]](#) [\[Pub Med\]](#)
41. Götting, J. ; Cordes, AK ; Steinbrück, L. ; Heim, A. Phylogénie moléculaire des lignées d'adénovirus humains de type 41. *Virus Évol.* 2022, 8, veac098. [\[Référence croisée\]](#)
42. Maes, M. ; Khokhar, F. ; Wilkinson, SAJ; Smith, AD; Kovalenko, G. ; Dougan, G. ; Vite, J. ; Loman, New Jersey ; Boulanger, S. ; Curran, MD; et coll. Le séquençage multiplex MinION suggère une diversité génétique de l'adénovirus entérique F41 comparable à l'ère pré-COVID-19. *Microbe. Génomique* 2023, 9, mgen000920. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
43. Lambasia, AW ; Makori, TO ; Mutunga, M. ; Cheruiyot, R. ; Murunga, N. ; Vite, J. ; Githinji, G. ; Nokes, DJ ; Houldcroft, CJ; Agoti, CN Épidémiologie génomique des adénovirus humains F40 et F41 sur la côte du Kenya : une étude rétrospective de surveillance en milieu hospitalier (2013-2022). *Virus Évol.* 2023, 9, vead023. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
44. Chandra, P. ; Lo, M. ; Mitra, S. ; Banerjee, A. ; Saha, P. ; Okamoto, K. ; Déb, AK ; Ghosh, Saskatchewan ; Manne, A. ; Dutta, S. ; et coll. Caractérisation génétique et variations phylogénétiques des souches d'adénovirus-F humain circulant dans l'est de l'Inde entre 2017 et 2020. *J. Méd. Virol.* 2021, 93, 6180-6190. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
45. Sánchez, LHG ; Shiau, H. ; Boulanger, JM; Saaybi, S. ; Buchfellner, M. ; Britt, W. ; Sánchez, V. ; Potier, JL ; Ingram, LA ; Kelly, D. ; et coll. Une série de cas d'enfants atteints d'hépatite aiguë et d'infection à adénovirus humain. *N. Engl. J.Méd.* 2022, 387, 620-630. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
46. Kelgeri, C. ; Couper, M. ; Gupte, GL; Brant, A. ; Patel, M. ; Johansen, L. ; Valampampil, J. ; Ong, E. ; Hartog, H. ; Perera, MTPR; et coll. Spectre clinique des enfants atteints d'hépatite aiguë de cause inconnue. *N. Engl. J.Méd.* 2022, 387, 611-619. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
47. Morfopoulou, S. ; Buddle, S. ; Torres Montaguth, OE ; Atkinson, L. ; Guerra-Assunção, JA; Moradi Marjaneh, M. ; Zennzini Chiozzi, R. ; Étage, N. ; Campos, L. ; Hutchinson, JC; et coll. Enquêtes génomiques sur l'hépatite aiguë inexpliquée chez les enfants. *Nature* 2023, 617, 564-573. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
48. Phan, J. ; Eslick, GD; Elliott, EJ démystifie l'épidémie mondiale d'hépatite aiguë sévère d'étiologie inconnue chez les enfants : Une revue systématique et une méta-analyse. *J. Infecter.* 2024, 88, 2-14. [\[Référence croisée\]](#) [\[Pub Med\]](#)
49. Martin, NA; González, G. ; Reynolds, LJ ; Bennett, C. ; Campbell, C. ; Nolan, MT; Byrne, A. ; Fennema, S. ; Holohan, N. ; Kuntamukkula, SR ; et coll. Virus adéno-associé 2 et adénovirus humain F41 dans les eaux usées lors d'une épidémie d'hépatite aiguë sévère chez les enfants, Irlande. *Émerger. Infecter. Dis.* 2023, 29, 751-760. [\[Référence croisée\]](#)

Avis de non-responsabilité/Note de l'éditeur : Les déclarations, opinions et données contenues dans toutes les publications sont uniquement celles du ou des auteurs et contributeurs individuels et non de MDPI et/ou du ou des éditeurs. MDPI et/ou le(s) éditeur(s) déclinent toute responsabilité pour tout préjudice corporel ou matériel résultant des idées, méthodes, instructions ou produits mentionnés dans le contenu.