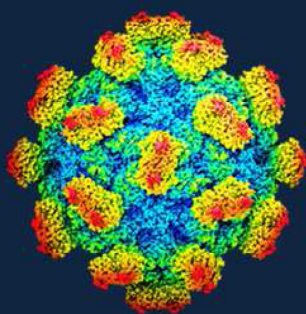


Rôle de la faune sauvage et du porc domestique comme réservoir
du virus de l'hépatite E (HEV) : étude de l'infection chez les suidés et
les cervidés et de la réceptivité du porc au HEV présent chez le sanglier

Role of wildlife and domestic pigs as reservoirs
for hepatitis E virus (HEV): study of the infection in suids and cervids
and of the susceptibility of pigs to HEV originating from wild boar



Damien THIRY

Thèse présentée en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences vétérinaires

Année académique 2015-2016

Université
de Liège



ACADEMIE UNIVERSITAIRE WALLONIE-EUROPE

UNIVERSITE DE LIEGE

FACULTE DE MEDECINE VETERINAIRE

DEPARTEMENT DES MALADIES INFECTIEUSES ET PARASITAIRES

SERVICE DE VIROLOGIE VETERINAIRE ET MALADIES VIRALES ANIMALES

DEPARTEMENT DES SCIENCES DES DENREES ALIMENTAIRES

SERVICE DE MICROBIOLOGIE DES DENREES ALIMENTAIRES

**Rôle de la faune sauvage et du porc domestique comme réservoir
du virus de l'hépatite E (HEV) : étude de l'infection chez les suidés et
les cervidés et de la réceptivité du porc au HEV présent chez le sanglier**

**Role of wildlife and domestic pigs as reservoirs
for hepatitis E virus (HEV): study of the infection in suids and cervids
and of the susceptibility of pigs to HEV originating from wild boar**

Damien Thiry

**THESE PRESENTEE EN VUE DE L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR EN SCIENCES VETERINAIRES**

ANNEE ACADEMIQUE 2015-2016

Illustrations de couverture :

Photographie de sanglier : photographe animalier Dan Ozmec

Représentation schématique du virus de l'hépatite E : Copyright 1993-2011, Virusworld, Jean-Yves Sgro, Institute for Molecular Virology, University of Wisconsin-Madison

Photographie de porcs exempts d'organismes pathogènes spécifiques : Dr Frédéric Paboeuf, Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation du laboratoire de Ploufragan/Plouzané, ANSES

A Lola et Gaston

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à mon promoteur, le Docteur Bernard Brochier ainsi qu'à mon co-promoteur le Professeur Georges Daube d'avoir accepté d'encadrer ma thèse de doctorat, pour nos discussions toujours enthousiastes, ainsi que pour leurs disponibilités.

Je remercie mon père, le Professeur Etienne Thiry, qui a certainement joué le rôle le plus important dans l'accomplissement de cette thèse.

Je tiens également à remercier le Professeur Annick Linden, d'avoir toujours répondu positivement aux propositions d'études sur le virus de l'hépatite E dans la faune sauvage en Région Wallonne ainsi que pour nos échanges très instructifs à ce sujet. Merci de m'avoir permis d'utiliser cette « mine d'or » que représentent les échantillonnages réalisés par le réseau de surveillance sanitaire de la faune sauvage.

Je remercie également le Professeur Claude Saegerman pour son aide précieuse dans l'analyse des données statistiques.

J'adresse un tout grand merci à mes collègues et amis du service de virologie : Ana, Christina, Lorène, Louisa, Edmilson, William avec une mention spéciale pour Axel, dit « papy » sans qui ce travail n'aurait pas pu se réaliser et pour ses conseils réfléchis. Axel, je n'oublierai jamais nos discussions annuelles animées dans la lueur des nuits parisiennes autour d'un « dernier » petit gris de Toul avant d'aller dormir. Je remercie les Professeurs Alain Vanderplasschen et Laurent Gillet ainsi que l'ensemble des services d'immunologie, de vaccinologie et d'épidémiologie pour la bonne humeur, l'esprit de camaraderie et d'entraide qui règne dans les labos. Que cet esprit règne encore longtemps au sein du B43bis.

Je remercie l'ensemble des membres du service de virologie de l'Institut Scientifique de Santé Publique de m'avoir intégré dans leur équipe et tout particulièrement le Docteur Isabelle Thomas pour son aide et ses conseils précieux.

Je remercie toute l'équipe des unités d'Epidémiologie et Bien-être du Porc et de Production de Porcs Assainis et d'Expérimentation du laboratoire de Ploufragan/Plouzané de l'ANSES, et tout particulièrement les Dr Nicolas Rose et Frédéric Paboeuf de m'avoir accueilli au sein de leurs laboratoires et animaleries avec beaucoup de sympathie. Ces moments passés en Bretagne ont beaucoup enrichi mon travail.

Je tiens à remercier chaleureusement le Professeur Jacques Mainil de m'avoir permis de continuer dans la voie de la recherche en microbiologie et de m'avoir ouvert, depuis maintenant un an, au monde passionnant des bactéries.

Je remercie également l'ensemble des services de Bactériologie et de Santé et Pathologies de la Faune Sauvage, en particulier Thomas et Jessica pour leur contribution dans les analyses ELISA mais également Jean-Noël, Audrey, Nadège, Christophe, Cyrille, Julien, Sandro. Je peux désormais affirmer que l'esprit de camaraderie ne se cantonne pas au seul B43bis mais qu'il est également bien présent au sein du B43a.

Ce travail a été subventionné par le Service Public Fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement et par le Service Public de Wallonie.

Un merci tout particulier va à mes parents : maman, pour ta présence infaillible depuis 31 ans et qui se continue merveilleusement avec la troisième génération. Papa, je ne sais pas comment tu as fait pour me transmettre ce gène de la recherche, moi qui du plus loin que je me souviens, me destinais à une vie de praticien. Je quitte la viro pour la bactério après avoir eu le plaisir de partager tous ces moments avec toi. Je te suis très reconnaissant d'avoir cru en moi et de m'avoir donné ma chance. Grâce à toi, qui, sans le vouloir m'a guidé dans cette voie, je me lève chaque matin en savourant cette chance de faire un travail que j'aime.

Je remercie Caro, Jimmy, Manon, Perrine, Carlos, Diego, Pedro, Julien et Isotta pour l'union fraternelle qui a toujours régné entre nous malgré la distance qui nous sépare parfois. Avec vous, le mot « famille » prend tout son sens. Nous étions 4, combien serons-nous ... ?

Enfin, le meilleur arrivant toujours à la fin, peut-être parce qu'il est difficile de trouver les mots pour remercier les personnes auxquelles on tient le plus... Douze années... Douze années que tu soutiens mes choix, que tu portes un regard si juste et si posé en toutes circonstances. Elise, merci d'avoir accepté et de continuer à accepter tous ces sacrifices. Si cette thèse représente un bel accomplissement professionnel dans lequel tu as été un véritable moteur, mon plus bel accomplissement personnel est d'avoir fondé une famille avec toi. Grâce à toi, je me couche chaque soir en savourant cette chance d'avoir de si chouettes enfants, Lola et Gaston (à qui un jour, je leur ai promis, je ferai lire ce « livre » pour lequel papa s'éclipse le soir quand ils vont dormir).

Table des matières

Table des matières	vi
Liste des abréviations	viii
Préambule	1
Chapitre 1 : Introduction - - - - -	4
1.1 Historique	5
1.2 Cycle réplcatif du virus de l'hépatite E	6
1.3 Le virus de l'hépatite E et les virus apparentés chez les animaux : classification, structure virale et interactions virus - hôtes <i>"Hepatitis E virus and related viruses in animals"</i>	7
1.4 Le virus de l'hépatite E chez l'homme	27
1.4.1 Répartition géographique	27
1.4.2 Pathogénie et aspects cliniques	27
1.4.3 Situation en Belgique	28
1.5 Diagnostic de laboratoire	29
1.6 Traitement - Prophylaxie	30
Chapitre 2 : Objectifs - - - - -	31
Chapitre 3 : Section expérimentale - - - - -	34
3.1 Mise au point des techniques	35
3.2 Etude 1 : Estimation de la séroprévalence du virus de l'hépatite E (HEV) chez le porc par ELISA et Western blot et comparaison de séquences de HEV porcines et humaines détectées en Belgique <i>"Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium"</i>	39
3.3 Etude 2 : La faune sauvage belge comme réservoir potentiel du virus de l'hépatite E <i>"Belgian wildlife as potential zoonotic reservoir of hepatitis E virus"</i>	50

3.4	Etude 3 : Infection expérimentale de porcs, par voie intraveineuse ou orale, avec une souche du virus de l'hépatite E (HEV) de sanglier, une souche de HEV porcine et une souche de HEV de sanglier préalablement passée en modèle porcin	63
	<i>“Productive infection in pigs experimentally inoculated intravenously or orally with a wild boar hepatitis E virus (HEV), a swine HEV and a wild boar HEV previously passed in swine”</i>	
Chapitre 4 : Discussion générale	-----	81
4.1	Infection par le virus de l'hépatite E dans les populations de porcs, de sangliers et de cervidés en Belgique	82
4.2	Réceptivité du porc à l'infection par le virus de l'hépatite E originaire du porc ou du sanglier	89
4.3	Modèle conceptuel de la transmission du virus de l'hépatite E en Belgique	94
Chapitre 5 : Conclusion et perspectives	-----	99
Chapitre 6 : Résumé – Summary	-----	102
Chapitre 7 : Bibliographie	-----	112

Liste des abréviations

Aa : acide aminé

Ab : *antibodies* = anticorps

Ac : anticorps

ADN : acide désoxyribonucléique

ARN : acide ribonucléique

ARSIA : Agence Régionale de Santé et d'Identification Animales

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

ANSES : Agence Nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail

CDC : *Centers for disease control and prevention*

CO : cut-off

DGZ : *Dierengezondheidszorg Vlaanderen*

D.O. : densité optique

Eg : équivalent génomique

ELISA : *enzyme-linked immunosorbent assay* : test immuno-enzymatique

EOPS : exempt d'organismes pathogènes spécifiques

Ha : hectare

HAV : virus de l'hépatite A

HEV : virus de l'hépatite E

IgA : immunoglobuline A

IgG : immunoglobuline G

IgM : immunoglobuline M

MF : matières fécales

NTP : nucléoside triphosphate

ORF : *open reading frame* : cadre ouvert de lecture

pb : paire de bases

PCP : *papain-like cystein protease*

PFU : *plaque forming unit* : unité formant plaque

RdRp : ARN polymérase ARN dépendante

ROC : *Receiver operating characteristic* = fonction d'efficacité du récepteur

RPM : révolution par minute

RT-PCR : *reverse transcription polymerase chain reaction* : réaction de polymérisation en chaîne après transcription inverse

SwHEV : Virus de l'hépatite E porcin

Sw-WbHEV : Virus de l'hépatite E de sanglier préalablement passé en modèle porcin

SPF : Service Public Fédéral

SPF : *specific pathogen free* = exempt d'organismes pathogènes spécifiques

Wb : *Wild boar* = sanglier

WbHEV : Virus de l'hépatite E de sanglier

WHO : *World Health Organization*

WB : Western blot

Préambule

Le virus de l'hépatite E (*hepatitis E virus*, HEV) est endémique au sein de la plupart des régions du globe. La répartition mondiale des génotypes caractérisant les *Hepevirus* est cependant différente. Les *Hepevirus* font partie de la famille des *Hepeviridae* qui comprend quatre génotypes humains, les génotypes HEV-1 et 2 étant présents exclusivement chez l'homme et les génotypes HEV-3 et 4 atteignant à la fois l'homme mais aussi le porc, le sanglier, le cerf, la mangouste et, bien que plus distant, le lapin. D'autres génotypes ont également été proposés pour classer les *Hepevirus* infectant différentes espèces animales. En Europe, le génotype d'HEV circulant principalement est le génotype HEV-3. Les génotypes HEV-3 et 4 se retrouvent, en effet, surtout dans les régions dites « développées » du globe et, outre une transmission fécale-orale, ont également une voie de transmission caractérisée de zoonotique. A l'heure actuelle, seuls quelques cas de transmission de l'animal (porc, cerf et sanglier) à l'homme ont été démontrés. Certaines études indiquent également une séroprévalence accrue chez les personnes ayant des contacts répétés avec l'espèce porcine, notamment les éleveurs, les vétérinaires, les chasseurs et les employés d'abattoir. Quelques études réalisées dans le sud de la France ont montré une relation entre la consommation de saucisses de foie de porc dites figatelles et la présence du HEV chez l'homme.

Les génotypes HEV-1 et 2 se retrouvent, eux, essentiellement dans les régions dites « en voie de développement » du globe, avec une transmission via les eaux usées. Les cas de génotypes HEV-1 et 2 détectés dans nos régions sont souvent liés à des voyages en zones hyperendémiques.

L'hépatite E est une maladie qui peut, dans la plupart des cas, se révéler subclinique chez l'homme. Lorsque des symptômes sont présents, ceux-ci ressemblent à ceux de l'hépatite A avec de l'asthénie, de l'ictère, de l'hépatomégalie et des signes digestifs. La maladie est habituellement auto-limitante. Cependant, certains cas peuvent se révéler très dangereux et ce, surtout chez la femme enceinte qui peut présenter une hépatite fulminante dans 20 % des cas lorsqu'elle est infectée durant le 3^e trimestre de grossesse. Cependant cette situation n'a jamais été constatée avec des souches du génotype HEV-3 mais plutôt avec celles de génotypes HEV-1 et 2. Le taux de mortalité chez la femme enceinte infectée peut alors atteindre 25 %. Les complications survenant à la suite de l'infection par du virus de génotype HEV-3 sont des hépatites chroniques avec un taux élevé de mortalité chez les

patients immunodéprimés, transplantés, ou cirrhotiques. Des signes cliniques chez les animaux infectés n'ont pas été identifiés.

Dans les pays européens, l'hépatite E a longtemps été considérée comme une maladie sporadique et « d'importation » mais de nombreuses évidences d'épidémiologie moléculaire convergent vers l'existence d'un réservoir animal, essentiellement chez le porc et le sanglier, voire les cervidés. En Europe occidentale, l'origine zoonotique est suspectée dans la majorité des cas. En Belgique, l'hépatite E constitue donc un risque zoonotique pour lequel les différents facteurs de risque et les voies de transmission ne sont pas encore complètement élucidés. Il est possible que des cas d'hépatite E se produisent par l'ingestion d'eau de boisson contaminée par les matières fécales d'animaux infectés, mais aussi par l'ingestion de denrées alimentaires préparées à partir de produits infectés d'origine animale. L'infection par le HEV représente donc plus un enjeu de santé publique que de santé animale en tenant compte du caractère zoonotique de la transmission dans les pays industrialisés tels que la Belgique.

Chapitre 1. Introduction

1.1 Historique

L'histoire de l'hépatite E a débuté en Inde, durant l'hiver 1955-1956, lors d'une contamination de l'eau de distribution résultant des inondations provoquées par la mousson sur la rivière Jamuna à New Delhi (Khuroo, 2011). Cette importante épidémie d'hépatite fut, à cette époque, imputée au virus de l'hépatite A (*hepatitis A virus*, HAV). Cependant, certains chercheurs trouvaient étonnant que les adultes, qui devaient normalement être immunisés contre le HAV, pouvaient également développer la maladie et que, chose qui n'avait jamais été observée avec le HAV, le taux de mortalité était très élevé chez les femmes enceintes au cours du troisième trimestre de grossesse.

En 1980, les Dr Purcell et Pavri démontrèrent, grâce à des échantillons récoltés lors de l'épidémie de New Delhi et conservés au congélateur, qu'il ne s'agissait pas d'une hépatite A mais d'une hépatite non A non B. En même temps, le Dr Khuroo et son équipe firent les mêmes constatations. Cependant, la quantité de virus était insuffisante que pour en faire l'observation au microscope (Khuroo, 2011).

En 1983, lors d'une nouvelle épidémie d'hépatite non A non B dans une région d'Asie centrale, un virologue soviétique, le Dr Balayan, ne possédant pas de système de réfrigération pour le transport d'échantillons jusqu'à son laboratoire de Moscou, décida d'ingérer un mélange de yaourt et de matières fécales d'un patient infecté, de rentrer à Moscou et d'attendre que le virus agisse sur lui. Une fois malade, il récolta ses propres échantillons, put infecter des animaux de laboratoire et observer le virus en microscopie électronique. Le Dr Balayan put ainsi démontrer qu'il s'agissait d'un virus ressemblant au HAV mais qui ne l'était pas (Khuroo, 2011).

En 1990, le Dr Reyes et son équipe de GeneLabs Inc. avec la collaboration du Dr Bradley et son équipe du *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) ont cloné et séquencé le virus qui a dès lors été rebaptisé virus de l'hépatite E. Le HEV est alors devenu, en 1994, la cause principale d'hépatite à transmission entérique (Khuroo, 2011).

Au début des années 90, le Dr Tsarev qui avait travaillé avec le Dr Balayan à Moscou, et les Dr Emerson et Purcell ont mis au point un vaccin contre le HEV au sein du *National Institute of Allergy and Infectious Diseases* (NIAID). Ce vaccin est un peptide recombinant du

cadre ouvert de lecture 2 (ORF2) d'une souche de HEV d'origine pakistanaise exprimé en système baculovirus. Il a été testé avec succès entre 2000 et 2004 sur 2000 soldats de l'armée népalaise (Shrestha *et al.*, 2007). Un deuxième vaccin a également passé avec succès les phases deux et trois des essais et a été testé sur plus de 100.000 chinois. Ce vaccin, à base d'un peptide recombinant de l'ORF2 d'une souche chinoise de génotype 1 produit en système d'expression *Escherichia coli*, a été commercialisé en Chine, en 2012 (Kamili, 2011; Zhu *et al.*, 2010).

1.2 Cycle réplcatif du virus de l'hépatite E

Le cycle réplcatif du HEV présente encore de nombreuses inconnues, dues, entre autres, à l'absence de système de culture cellulaire efficace pour la multiplication de ce virus. En effet, les seuls systèmes de culture cellulaire ayant permis une réplcation virale ne parviennent pas à multiplier suffisamment le virus. De rares études rapportent que certaines lignées cellulaires sont permissives au HEV : il s'agit des Huh7, des PLC/PRF/5, des HepG2 (cellules d'hépatocarcinome humain), des A549 (cellules de carcinome pulmonaire humain), des IBRS2 (cellules rénales de porc) et des Caco-2 (cellules intestinales humaines) (Shukla *et al.*, 2011 ; Zhang *et al.*, 2011 ; Okamoto, 2012). Des techniques de culture en 3 dimensions ont également été adaptées (Berto *et al.*, 2012 ; Rogée *et al.*, 2013). Les hypothèses quant au modèle de réplcation du HEV se basent tant sur des analogies avec les autres virus à ARN monocaténaire que sur l'analyse de son génome (Figure 1).

Même si les hépatocytes semblent représenter le site primaire de réplcation, l'intestin et les ganglions lymphatiques pourraient également permettre la réplcation du HEV (William *et al.*, 2001). Le développement hypothétique de ce cycle est le suivant. Une fois le virus attaché à la surface cellulaire grâce aux protéoglycanes de type sulfate d'héparane (Kalia *et al.*, 2009), il se fixe à des récepteurs cellulaires d'origine inconnue associés aux clathrines puis est internalisé. Le virus perd alors sa capsid et son ARN est relargué dans le cytoplasme. Une partie de l'ARN est traduite par les ribosomes en protéines non structurales dont l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) et la réplcation débute, suivie de la synthèse d'ARN subgénomiques qui d'une part, seront traduits en protéines codées par l'ORF2 et l'ORF3 et, d'autre part, synthétiseront l'ARN génomique. Les virions sont alors formés par encapsidation

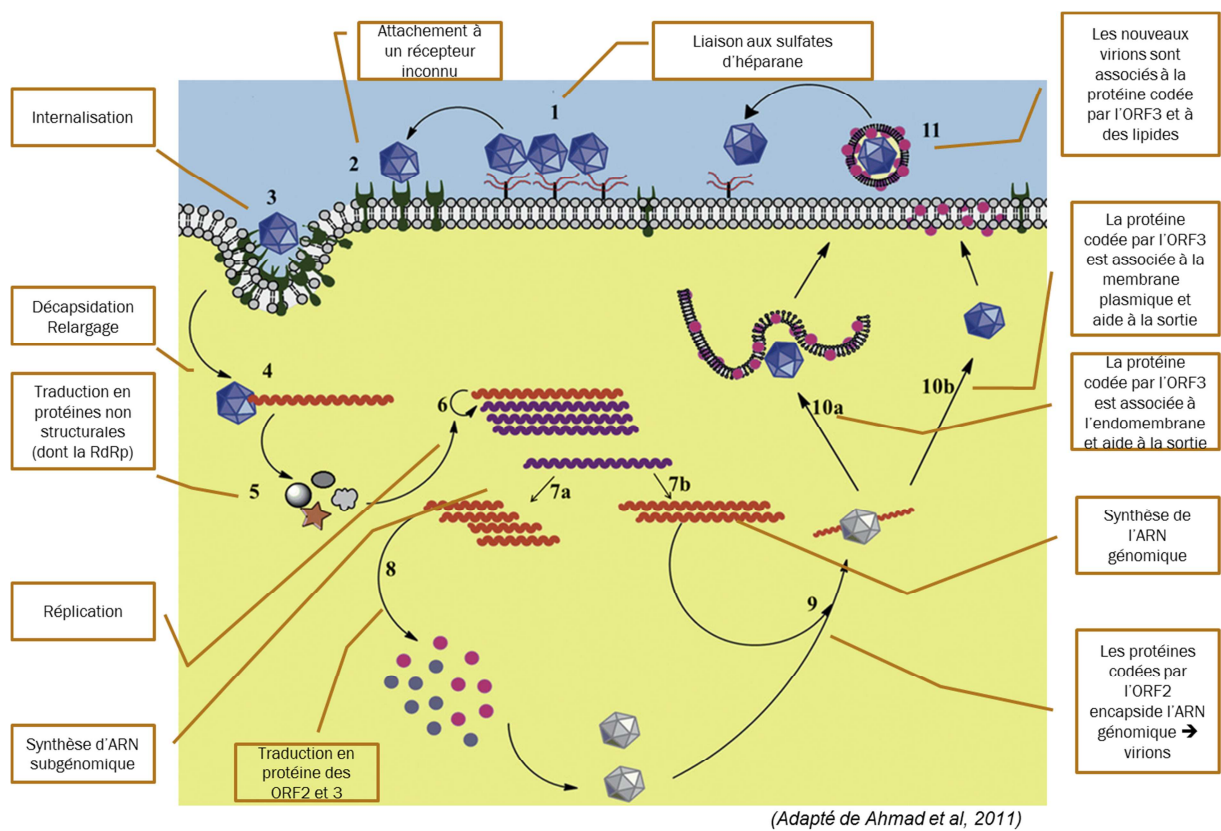


Figure 1. Cycle réplcatif, hypothèse (adapté de Ahmad *et al.*, 2011)

de l'ARN génomique par les protéines codées par l'ORF2 probablement aidées des phosphoprotéines du cytosquelette (ORF3) tandis que les protéines codant l'ORF3 s'associent à la membrane plasmique ou à des endomembranes pour aider la sortie des virions par un mécanisme non lytique associé aux lipides (Figure 1) (Ahmad *et al.*, 2011).

1.3 Le virus de l'hépatite E et les virus apparentés chez les animaux : classification, structure virale et interactions virus - hôtes

Cette partie discute les différents aspects de la virologie moléculaire et de la transmission zoonotique du HEV, de la présence d'*hepevirus* dans différentes espèces animales et formule des hypothèses quant à l'origine du HEV et des virus apparentés.

REVIEW ARTICLE

Hepatitis E Virus and Related Viruses in AnimalsD. Thiry¹, A. Mauroy¹, N. Pavio^{2,3,4}, M. A. Purdy⁵, N. Rose⁶, E. Thiry¹ and E. F. de Oliveira-Filho¹¹ Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium² UMR 1161 Virology, ANSES, Animal Health Laboratory, Maisons-Alfort, France³ UMR 1161 Virology, INRA, Maisons-Alfort, France⁴ UMR 1161 Virology, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France⁵ National Center for HIV/Hepatitis/STD/TB Prevention, Division of Viral Hepatitis, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA⁶ ANSES Laboratory of Ploufragan/Plouzané, Unit of Pig Epidemiology and Welfare, Ploufragan, France**Keywords:**

hepatitis E virus; new taxonomy; infected species; zoonosis; origin

Correspondence:

E. Thiry. Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium.
 Tel.: +32(0)43664263; Fax: +32(0)43664261;
 E-mail: etienne.thiry@ulg.ac.be

Received for publication December 2, 2014

doi:10.1111/tbed.12351

Summary

Hepatitis E is an acute human liver disease in healthy individuals which may eventually become chronic. It is caused by the hepatitis E virus (HEV) and can have a zoonotic origin. Nearly 57,000 people die yearly from hepatitis E-related conditions. The disease is endemic in both developing and developed countries with distinct epidemiologic profiles. In developing countries, the disease is associated with inadequate water treatment, while in developed countries, transmission is associated with animal contact and the ingestion of raw or uncooked meat, especially liver. All human HEV are grouped into at least four genotypes, while HEV or HEV-related viruses have been identified in an increasing number of domestic and wild animal species. Despite a high genetic diversity, only one single HEV serotype has been described to date for HEV genotypes 1–4. The discovery of new HEV or HEV-related viruses leads to a continuing increase in the number of genotypes. In addition, the genome organization of all these viruses is variable with overlapping open reading frames (ORF) and differences in the location of ORF3. In spite of the role of some domestic and wild animals as reservoir, the origin of HEV and HEV-related viruses in humans and animals is still unclear. This review discusses aspects of the detection, molecular virology, zoonotic transmission and origin of HEV and HEV-related viruses in the context of 'One Health' and establishes a link between the previous and the new taxonomy of this growing virus family.

Introduction

Hepatitis E is an acute human liver disease caused by the hepatitis E virus (HEV) and can have a zoonotic origin. Hepatitis E is usually a mild self-limiting disease; however, it may be fatal, especially among pregnant women in developing countries, or become chronic in immunocompromised individuals. Besides the infection of humans, HEV or HEV-related viruses have been identified in an increasing number of domestic and wild animal species (Smith et al., 2013). Nearly 57,000 people die yearly from hepatitis E-related causes (WHO, 2013). According to the World Health Organization (WHO), 20 million people get infected with HEV and three million develop acute

hepatitis every year (WHO, 2013). The disease is endemic in both developing and developed countries although the epidemiological profile varies between countries according to the level of development. In developed countries, hepatitis E is more associated with animal contact and the ingestion of raw or uncooked meat, especially liver (swine, wild boar and deer) (Wichmann et al., 2008; Lewis et al., 2010). In developing countries, hepatitis E is still linked to poor sanitary conditions ((CDC), C. f. D. C. a. P., 2013).

The first epidemiological study of hepatitis E came from India in the early fifties (Viswanathan, 1957) and described a waterborne infection due to sewage contamination of the Yamuna River (Viswanathan, 1957; Khuroo, 2011). The unknown viral agent was only identified in the eighties and

named 'enterically transmitted non-A and non-B hepatitis' (ET-NANBH; Francis and Maynard, 1979; Sreenivasan et al., 1984). Later in the nineties, the ET-NANBH virus was inoculated into cynomolgus monkeys, HEV cDNA was isolated for the first time, and the name 'HEV' was proposed (Reyes et al., 1990). Since then the number of reports on HEV infections in the human population has increased considerably, showing that HEV was present in many different countries (Aye et al., 1992; Huang et al., 1992; Tsarev et al., 1992; Yin et al., 1994).

Natural infection of HEV was detected in pigs for the first time in 1995 in Nepal (Clayson et al., 1995). Further studies showed that the porcine HEV strain is closely related to but distinct from the human HEV strains observed so far and represents the HEV genotype 3 (HEV-3) (Meng et al., 1997). Later, genotype 4 (HEV-4) was also found in humans and swine (Wang et al., 1999, 2002).

Current Nomenclature of HEV

Hepatitis E virus was initially classified in the *Picornaviridae* family with hepatitis A virus, based on clinical and epidemiological characteristics (Sreenivasan et al., 1984). However, due to morphological features and similarities to noroviruses in genome organization, HEV was thereafter repositioned as a member of the *Caliciviridae*, in the genus *Hepevirus* (Bradley et al., 1988). Later on, based on molecular analyses, HEV was placed as the sole species of the family *Hepeviridae*, genus *Hepevirus* and viruses were grouped into four major genotypes (1–4) (Emerson et al., 2005; Meng et al., 2011). In the meantime, other HEV-related viruses were detected (e.g. in rats), but not assigned until the most recent proposed classification (Table 1; Meng et al., 2011; Smith et al., 2014).

HEV genotypes

Recently, the ICTV *Hepeviridae* Study Group proposed a new consensual classification, placing all the HEV and HEV-related viruses into two genera: *Orthohepevirus* with four species (A–D) and *Piscihepevirus* with a single species (A) (Smith et al., 2014). The criteria proposed for this new classification were based on phylogeny and host range. Accordingly, *Orthohepevirus* A comprises sequences found in humans, pigs, wild boar, rabbit, deer, mongoose and camel; *Orthohepevirus* B contains viruses found in chickens; *Orthohepevirus* C encompasses sequences found in rats (HEV-C1) and ferrets (HEV-C2); and *Orthohepevirus* D, the bat virus (Table 1). Genotypes were also proposed for *Orthohepevirus* A: genotypes HEV-1 and HEV-2 have only been identified in humans, genotypes HEV-3 and HEV-4 have been reported in both humans and different animal species and are associated with the zoonotic cases.

Table 1. Comparison between previous and current *Hepeviridae* taxonomy

Previous taxonomy (ninth ICTV report)				New taxonomy (Smith et al., 2014)			
Genotype	Species	Genus	Family	Predominant host species	Reference strain	GenBank accession	Family
1	HEV-1	<i>Hepevirus</i>	<i>Hepeviridae</i>	Human	Burma	M73218	<i>Hepeviridae</i>
2	HEV-2			Human	Mexico	M74506	
3	HEV-3			Human, suids, cervids, mongoose, rabbit	Meng	AF082843	
4	HEV-4	<i>Hepevirus</i>	<i>Hepeviridae</i>	Human, suids	T1	AJ272108	<i>Orthohepevirus</i>
Unclassified	Avian HEV-1			Wild boar	JBOAR135-Shiz09	AB573435	
	Avian HEV-2			Wild boar	wbJOY_06	AB602441	
	Avian HEV-3			Camel	DcHEV-178C	KJ496143	<i>Orthohepevirus</i> B
Unclassified	/	<i>Hepevirus</i>	<i>Hepeviridae</i>	Chicken	F93-5077	AM943647	
	/			Chicken		AY535004	
	/			Chicken		AM943646	<i>Orthohepevirus</i> C
Unclassified	/	<i>Hepevirus</i>	<i>Hepeviridae</i>	Rat	RG3	GU345042	
	/			Ferret	FRHEV4	JN998606	
	/			Bat	BatHEV/BS 7/GE/2009	JQ001749	<i>Orthohepevirus</i> D
Unclassified	/	<i>Hepevirus</i>	<i>Hepeviridae</i>	Trout	Heenan lake	HQ731075	
	/						<i>Piscihepevirus</i>

Genotypes HEV-5 and HEV-6 have been found in wild boar in Japan and genotype HEV-7 in dromedary camels in Dubai (Table 1; Smith et al., 2014; Pavio et al., 2010).

Partial sequences from other potential members of the family were recently identified in moose, fox and mink. They show similarities to HEV in genome organization, size and phylogenetic analyses, suggesting they could represent new members of the *Hepeviridae* family. The moose virus appears to cluster closely to genotypes 1–7, while HEV isolated from mink is closely related to the ferret virus (HEV-C2), and the virus found in foxes is related to that in rats (HEV-C1) virus (Fig. 1; Lin et al., 2013; Woo et al., 2014; Batts et al., 2011; Takahashi et al., 2011; Raj et al., 2012; Drexler et al., 2012). These viruses have not been placed in any specific genotype because complete genomic sequences are required to place these viruses definitively.

HEV subgenotypes

Classification under the genotype level is very useful and important for both clinical and epidemiological studies. The most frequently used classification was proposed by Lu et al. (2006) and encompasses 24 subtypes. Genotypes 1–4 are split into five (a–e), two (a–b), 10 (a–j) and seven (a–g) subtypes, respectively (Lu et al., 2006). This classification is controversial and is not accepted by all researchers in the field. For instance, there are a number of publications including partial and complete genomic sequences of HEV with no differentiation under the genotype level (Takahashi et al., 2003; Tei et al., 2003; Sonoda et al., 2004; Wibawa et al., 2004). The main concern is related to the reliability of the subtype separation and, consequently, the usefulness of subtyping (Oliveira-Filho et al., 2013; Smith et al., 2013). The ICTV study group has not defined a permanent system for classification under genotype level (subgenotype

or subtypes); however, it has recommended the use of approaches based on labelling clades according to tree topology (Smith et al., 2014). Thus, genotype HEV-3 has been divided into three subgenotypes 3.1 (or G3 group 1), 3.2 (or G3 group 2) and 3.3 (Oliveira-Filho et al., 2013; Ijaz et al., 2014), and genotype HEV-4 has been divided into seven subgenotypes 4 a–g (Dai et al., 2013).

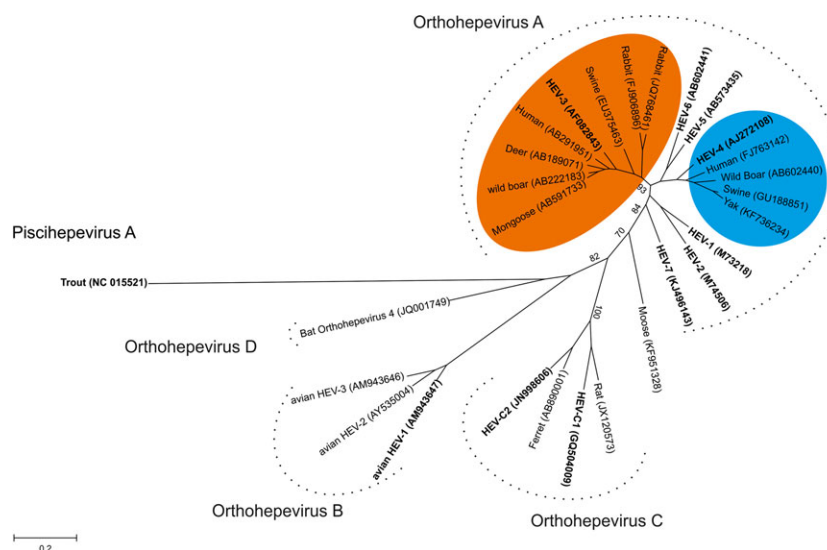
So far all the different viruses infecting humans from genotypes HEV-1 to HEV-4 are grouped in a single serotype. The serological diversity of the other hepeviruses remains uncertain, although it is known that specific assays can distinguish between viruses from Orthohepevirus B and HEV-C1 and the HEV-1–HEV-4 (Dremsek et al., 2012; Liu et al., 2014).

Structure

Hepatitis E virus is a small non-enveloped virus with a diameter of approximately 27–34 nm and an icosahedral capsid. The genome consists of a single-stranded positive RNA of 6.6–7.3 kb in length, polyadenylated at its 3'-end and 5'-capped with a 7-methylguanine. It contains three partly overlapping open reading frames (ORFs; Fig. 2) (Mushahwar, 2008). In addition, subgenomic viral RNA is also synthesized (Graff et al., 2006).

The 5' end of the genome contains a short non-coding region (NCR), 26–28 nucleotides in length. ORF1 has a size of approximately 1693 amino acids (aa). This region encodes a polyprotein which is probably cleaved into the viral non-structural proteins including methyltransferase, papain-like cysteine protease, macro domain, helicase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp); these enzymes are involved in viral replication, transcription and polyprotein cleavage (Reyes et al., 1990; Kaur et al., 1992; Koonin et al., 1992; Holla et al., 2013).

Fig. 1. Phylogenetic tree based on nucleotide sequences of complete capsid protein from different hepatitis E virus (HEV) and HEV-related viruses. Phylogenetic tree was inferred using the maximum likelihood method. A bootstrap analysis of 1000 replicates was included, and the results displayed on the interior branches. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6. Sequences in bold represent reference sequence listed by Smith et al., 2014 (Table 1). Accession numbers are shown in brackets. Hepatitis E virus found in bovids and molluscs is not presented here. Genotypes HEV-3 and HEV-4 are, respectively, coloured in orange and blue.



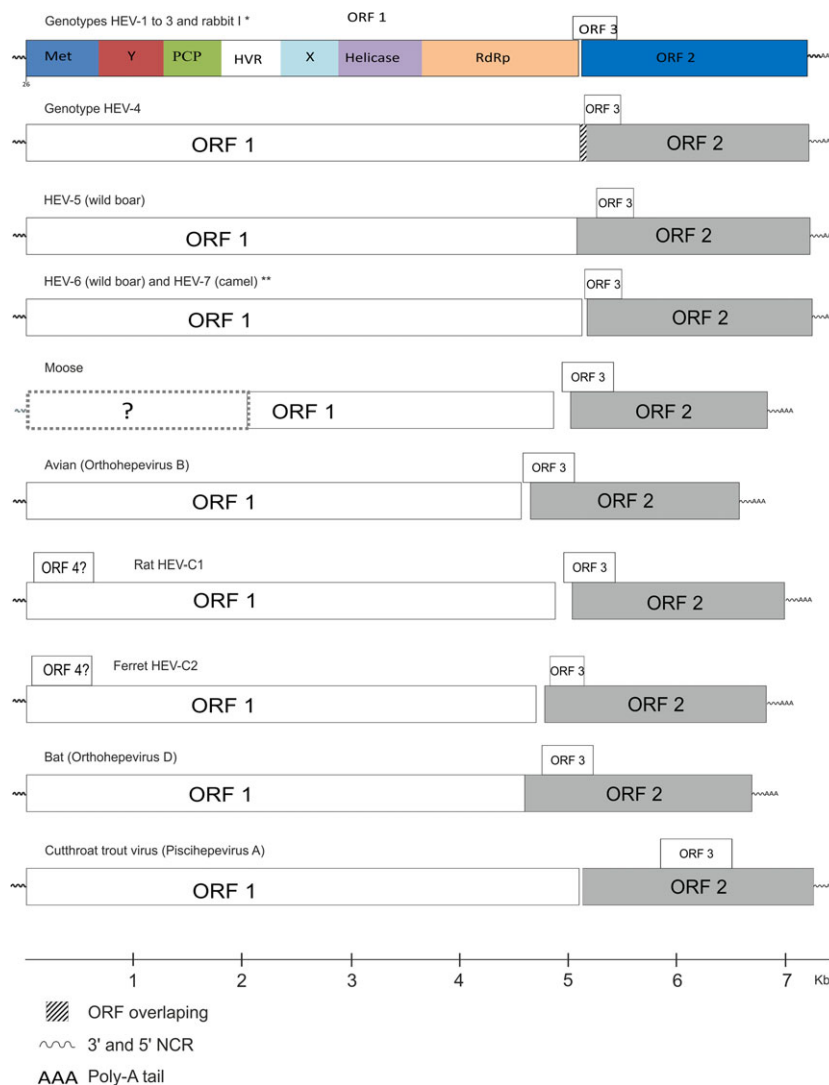


Fig. 2. Genome organization of genotypes 1, 3 and 4 and hepatitis E virus (HEV)-related viruses from wild boar, rat, bat, ferret, moose, avian and cutthroat trout. The complete genomic sequence from the moose virus was not available. The true frame usage of the open reading frames (ORFs) is not shown in this figure. Sequences used in this figure were obtained from GenBank with following accession numbers: HEV-1 (M73218), HEV-2 (M74506), HEV-3 (AF082843) and rabbit (FJ906895); HEV-4 (AJ272108); avian (AM943647); rat (GQ504009); bat (NC_018382); CTV (NC_015521); ferret (AB890001); moose (KF951328); wild boar HEV-5 (AB602441), camel (KJ496143) and wild boar HEV-6 (AB573435). ORF1 encodes methyltransferase (Met), Y, papain-like cysteine protease (PCP), hypervariable region (HVR), X (macro domain), helicase and RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) domains. * based on AF082843 ** based on AB602441.

Open reading frames 2 encodes the structural capsid protein and has a size of approximately 660 aa for genotypes 1–3 and 675 aa for members of genotype 4. This protein is highly immunogenic and is responsible for various functions such as assembly and host interaction. Due to the high aa homogeneity of this region and the presence of only one reported HEV serotype, it is used both for diagnostic tests and vaccine development (Tsarev et al., 1997; Zhang et al., 2001; Engle et al., 2002; Koff, 2007; Panda et al., 2007).

Open reading frames 3 encodes a small phosphorylated protein with a size of approximately 120 aa which binds to the hepatocellular cytoskeleton to form a complex together with the capsid protein. Other possible ORF3 functions may be related to the regulation of cell signalling pathway and infectivity in vivo (Graff et al., 2005; Jiménez de Oya et al., 2007; Panda et al., 2007; Khuroo, 2008).

A fourth ORF (ORF4) was reported from HEV-C2 (ferret) and two HEV-C1 (rat) sequences (Johne et al., 2012;

Raj et al., 2012). In these Orthohepeviruses C, ORF4 has 183 aa and overlaps with the 5' end of ORF1. Its function is not yet known, but it has been located into the methyltransferase domain. Two additional ORFs were reported for one sequence found in rats, however, without the presence of a conventional start codon (Johne et al., 2012). A HEV-related sequence found in moose has been partially sequenced. It contains a 3' end with poly A tail, ORF2, ORF3 and partial ORF1 (Lin et al., 2013). More details regarding the genome organization of the different HEV and HEV-related viruses are available in Fig. 2.

Direct and Indirect Detection of HEV-Related Viruses in Animals

Hepatitis E virus and HEV-related strains have been genetically detected in naturally infected domestic and wild animals (Fig. 3). In addition, antibodies against HEV have also been

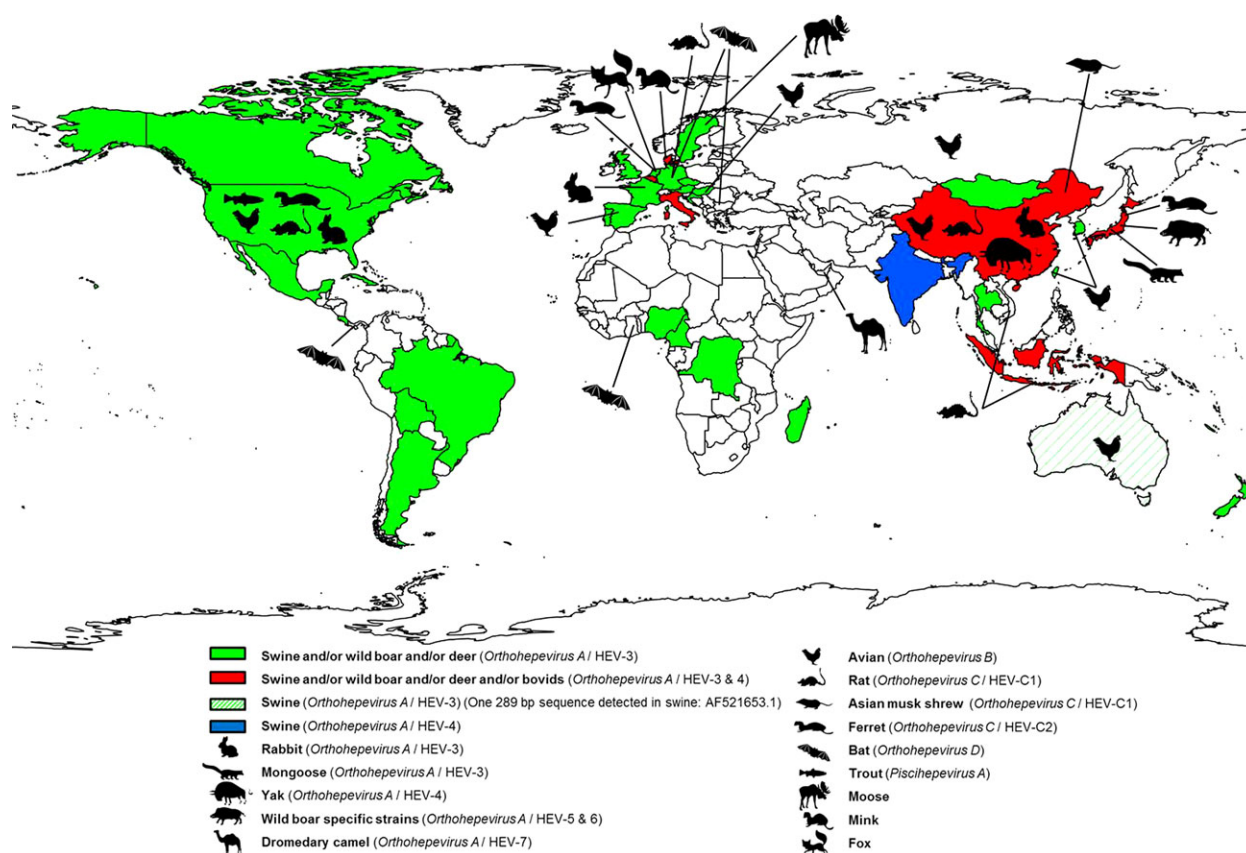


Fig. 3. Geographical distribution of animal hepatitis E virus (HEV) and HEV-related viruses (without non-human primates). References used in this figure are shown in Table S1.

detected in many animal species such as dog, cat, sheep, goat, horse, rodents, cattle, duck, pigeon and non-human primates (Arankalle et al., 2001; Vitral et al., 2005; Mochizuki et al., 2006; Zhang et al., 2008a; Pavio et al., 2010). The antibody presence in these species raises a puzzling question and suggests that these animals may have been exposed to the HEV or to an antigenically related agent.

HEV in Mammals

HEV infection of non-human primates

The first study reporting the infection of non-human primates with genotype 1 HEV (previously called ET-NAN-BH) showed that the cynomolgus monkey was susceptible to infection and suitable for use in experimental infection studies (Bradley et al., 1987). Several other species such as tamarins, rhesus monkey, three-striped night monkey and the common chimpanzee were also successfully infected with HEV (Bradley et al., 1987; Gupta et al., 1990; Ticehurst et al., 1992; McCaustland et al., 2000). Recently, it was demonstrated that the cynomolgus monkey is susceptible to infection with human and swine genotype 3 HEV from Argentina, Brazil and the Netherlands (de Carvalho

et al., 2013). These studies were very important in understanding different aspects of HEV infection in humans. Naturally occurring anti-HEV antibodies were reported in both free-living and captive non-human primates, and their role as reservoir has been discussed (Arankalle et al., 1994; Hirano et al., 2003b). However, neither HEV nor HEV-related viruses have been found naturally in non-human primates (Meng, 2011).

HEV infection of Suidae

Since the first sequence was reported in swine in 1997 in the USA (Meng et al., 1997), HEV genotypes 3 and 4 have been detected and seem to be enzootic in domestic pigs across the five continents (Fig. 3).

In Japan, HEV was detected in wild boar for the first time in 2004 (Sonoda et al., 2004). Subsequently, it has been detected in several countries (Pavio et al., 2010). The majority of HEV strains detected from wild boar belong to genotype 3 (Meng, 2010b). In contrast to domestic swine, high detection rates of HEV RNA have been reported not only in young animals but also in adult wild boar (de Deus et al., 2008; Martelli et al., 2008; Oliveira-Filho et al., 2014). In addition, it seems that viral genetic heterogeneity is higher

in wild boar populations. Different subtypes have been reported within the same populations from Germany and Sweden (Adlhoeh et al., 2009; Widén et al., 2011; Oliveira-Filho et al., 2014). In Japan, sequences from both genotypes 3 and 4 have been detected in wild boar as well as sequences belonging to the genotypes HEV-5 and HEV-6 (Sato et al., 2011; Takahashi et al., 2011; Smith et al., 2014).

HEV infection of Cervidae

Molecular and serological evidence of HEV and HEV-related viruses in cervids has been reported in Sika deer, red deer, tufted deer, Reeve's muntjac, roe deer and moose (Tei et al., 2003; Matsuura et al., 2007; Yu et al., 2007; Zhang et al., 2008b; Reuter et al., 2009; Boadella et al., 2010; Forgách et al., 2010; Rutjes et al., 2010; Lin et al., 2013). The first report of HEV-related sequences in deer demonstrated a close phylogenetic relationship with genotype 3. In contrast to the other viruses found in cervids, the HEV-related virus detected in Swedish moose does not cluster within genotypes HEV-1 to HEV-7. Phylogenetic analysis based on the complete capsid protein indicates that the virus found in moose clusters in a separate branch (Fig. 1).

HEV infection of Bovidae

Antibodies against HEV have been detected in cattle in several studies (Arankalle et al., 2001; Wang et al., 2002; Vitral et al., 2005; Zhang et al., 2008a). However, only one study from China has genetic confirmation, obtained through the amplification of a 189 bp sequence of ORF2 from eight cow faeces. These sequences showed homology of 96–100% to each other and 76–86%, 82–84%, 79–85% and 84–96% homology with genotypes 1–4, respectively. Accordingly, the HEV sequences found in bovines were assigned to genotype 4 (Hu and Ma, 2010). The same short HEV ORF2 sequence of 189 bp was amplified from six faecal samples of sheep by the same research group in China. These sequences showed homology of 99–100% between themselves and 79–85%, 81–83%, 79–84% and 85–95% homology with genotypes 1, 2, 3 and 4, respectively, and clustered into genotype 4 (Wang and Ma, 2010). However, additional studies must be conducted to confirm the presence of viruses in these animal species, and longer sequences need to be isolated to confirm the genotype assignment. Recently, full genome sequences closely related to HEV-4 were detected in yak in China (Fig. 1; Xu et al., 2014).

HEV infection of Camelidae

Recently, HEV-related virus was recovered in the faeces of three dromedary camels in Dubai. The isolates were called DcHEV (178 and 180C) and show more than 20% nucleotide divergence from the other HEVs (Woo et al., 2014).

These viruses are most similar to viruses in the genus, *Orthohepevirus* A, and have been placed within this genus as genotype HEV-7 (Smith et al., 2014).

HEV infection of Leporidae

In 2009, HEV-related sequences were found in Chinese farmed rabbits. Phylogenetic analysis based on the complete genome sequence suggests that they were genetically closely related to human and porcine genotype HEV-3. The sequences of rabbit HEV have about 85% nucleotide homology between themselves and 74%, 73%, 78–79%, 74–75% and 46–47% homology with genotypes 1–4 of mammals and avian HEV, respectively. Later on, more sequences were reported in China, the USA and France, including closely related sequences found in humans (Cossaboom et al., 2011, 2012; Izopet et al., 2012; Han et al., 2014).

The sequences found in rabbits clustered in a new distinct branch related to genotype 3 and were initially suggested to form another genotype (Zhao et al., 2009; Geng et al., 2011; Izopet et al., 2012). Further studies have shown that the HEV strains found in rabbits cluster at the edge of genotype 3 sequence space and could indeed represent a new genotype or a new genotype HEV-3 clade (Oliveira-Filho et al., 2013; Smith et al., 2013). According to the ICTV Hepevirus study group, the HEV strains found in rabbits are considered a distant variant in genotype HEV-3 (Smith et al., 2014).

HEV infection of Muridae

The presence of antibodies against HEV has been reported in different rodent species (Kabrane-Lazizi et al., 1999; Favorov et al., 2000; Arankalle et al., 2001; Hirano et al., 2003a; Easterbrook et al., 2007). Hepatitis E virus antigens were detected in different organs after experimental infection of Wistar rats with human virus (genotype 1) (Manerat et al., 1996). Nevertheless, none of the above-mentioned studies succeeded in recovering viral genome.

In 2008, fragments of HEV-related viruses were sequenced from faeces of *Rattus norvegicus* from Germany. The HEV-related sequences detected in rats have a sequence homology of about 60% and 50% with human and avian HEV strains, respectively. Subsequently, the complete genomes of the two HEV strains from rats were determined and it was suggested that they might belong to a new species within *Hepeviridae* (Johns et al., 2010). Since then, new HEV-C1 sequences have been reported in Germany, USA, China, Vietnam and Indonesia (Johns et al., 2012; Li et al., 2013b,d) and specific HEV-C1 sequences were included in the species *Orthohepevirus* C genotype HEV-C1 (Smith et al., 2014). Recently, several liver tissue samples from *Rattus rattus* and *R. norvegicus* in museum collections were tested and found to contain HEV genotype 3 (Lack et al., 2012).

HEV infection of Soricidae

Sequences closely related to HEV-C1 were detected from Asian musk shrews which shared the environment with wild rats in China (Guan et al., 2013).

HEV infection of Mustelidae

The first HEV-related virus found in Mustelidae was reported in the Netherlands in 2012. Two years later, HEV was detected in a ferret breeding colony in the USA and in Japan (Li et al., 2014). Phylogenetic analysis based on complete genomic sequences showed that HEV-related sequences found in ferrets were separate from genotypes 1 to 4 and clustered in a separate branch near to sequences found in rats (HEV-C1) (Raj et al., 2012; Li et al., 2015). Recently, partial genomic sequences of HEV-related viruses, genetically close to viruses found in ferrets (HEV-C2), were detected in 4 farmed mink from Denmark in 2013 (Krog et al., 2013).

HEV infection of Herpestidae

The only HEV-related virus in Herpestidae was detected in 2006, in a mongoose from Japan (Nakamura et al., 2006). The whole genome sequence of this strain was determined: it was HEV genotype 3 closely related to a Japanese porcine HEV sequence.

HEV infection of Canidae

In 2013, fragments of HEV-related virus were sequenced from faeces of two foxes in the Netherlands. These fragments were related to HEV-C1, but it is unknown, whether this virus circulates naturally in foxes or if detection is due to the consumption of prey such as rats (Bodewes et al., 2013).

HEV infection of Chiroptera

In 2012, a study analysed 3869 bat faecal and blood samples across five continents to detect HEV-related sequences. This study included 85 species of bats. Viruses were detected in 3 bat families (*Hipposideridae*, *Vespertilionidae* and *Phyllostomidae*) from Africa, Central America and Europe. There was a high genetic diversity between HEV-related viruses found in bats, comparable to that observed between sequences found in *Orthohepevirus A* (Drexler et al., 2012). Currently, all the HEV sequences found in bats have been assigned to the new species *Orthohepevirus D* (Table 1; Smith et al., 2014).

HEV Infection of Birds

In 1999, a virus related to HEV associated to big liver and spleen disease (BLS) was identified in chickens from Australia. This virus has about 62% homology with HEV nucleotide sequences from genotypes 1–4 (Payne et al.,

1999). In 2001, another virus was detected from bile samples of White Leghorn chickens from the USA with hepatosplenomegaly (HS) syndrome (Haqshenas et al., 2001). Later, the virus was designated avian HEV, and the viruses causing both BLS and HS were found to be distinct variant strains of the same virus (Meng, 2010a). Since then, they have been found to be circulating among North American, European and Asian chicken flocks (Huang et al., 2002; Sun et al., 2004a; Peralta et al., 2009; Kwon et al., 2012; Zhao et al., 2013; Hsu and Tsai, 2014). Currently, all strains found in chicken are considered as belonging to the same specie *Orthohepevirus B*.

Contrary to other animal species where HEV infections are usually asymptomatic, *Orthohepevirus B* infection is associated with symptomatic disease. Besides the enlargement of spleen and liver, both ovarian regression and presence of red fluid in the abdomen are commonly associated with the HS syndrome (Payne et al., 1999; Haqshenas et al., 2001). Experimental infection studies have also described several other clinical signs such as anorexia and diarrhoea (Billam et al., 2005). In addition, it was suggested that heterogeneity into the distinct strains may be related to different pathogeneses (Billam et al., 2009).

Orthohepevirus B shares several antigenic epitopes with HEV found in humans and swine, although at least one specific epitope has been reported among the viruses found in birds (Haqshenas et al., 2002; Guo et al., 2006). Further experimental infections have demonstrated that the *Orthohepevirus B* can infect and produce low viremia in turkeys, but is not infectious for rhesus monkeys (Huang et al., 2004; Sun et al., 2004b).

HEV infection of Fish

In 1988, a new virus, infecting trout without causing disease, was isolated and named cutthroat trout virus (CTV; Hedrick et al., 1991). After two decades, the complete genome of this virus was obtained and the organization was shown to be similar to HEV. Phylogenetic analysis based on partial RdRp aa sequences indicates proximity to the *Hepeviridae* family (Batts et al., 2011), and currently, it has been assigned as the sole species into the genus *Piscihepevirus* (Smith et al., 2014).

HEV infection of Bivalve Molluscs

The presence of HEV RNA was reported on several occasions in bivalve molluscs (Li et al., 2007; Crossan et al., 2012; Donia et al., 2012). However, this is most likely due to passive filtration of HEV from contaminated water rather than to HEV replication occurring in molluscs. Indeed, experimental bio accumulation of HEV has been demonstrated in oysters (Grodzki et al., 2014).

Zoonotic Concerns of HEV and HEV-Related Viruses

Before the first detection of HEV in swine, the occurrence of hepatitis E was associated with lack of access to clean water and contamination of drinking water due to unreliable sewage systems and hepatitis E was considered a disease of developing countries (Viswanathan, 1957; Aggarwal and Naik, 2009). Due to this, from the late eighties to the early nineties, it was improbable that clinicians would diagnose autochthonous hepatitis E in industrialized countries (Scharschmidt, 1995). However, the presence of HEV antibodies in healthy individuals and blood donors in Europe and North America could not always be associated with travel to an endemic region (Skaug et al., 1994). Thus, several autochthonous cases were reported in the USA, Europe, Australia and New Zealand (Mast et al., 1996).

Later on, the viruses were revealed to be present in domestic swine and wild boar populations in both developing and developed countries (Meng et al., 1997; Meng, 2010a; Thiry et al., 2014). The genetic proximity raised the possibility of an animal reservoir and phylogenetic analysis clearly revealed that the autochthonous cases occurred more frequently than had been previously recognized in developed countries (Clemente-Casares et al., 2003).

Nowadays, viruses from the *Hepeviridae* family and HEV-related viruses are recognized to be present in mammals, avian and fish. Evidence suggesting zoonotic infections has been reported from strains circulating in domestic swine, wild boars, deer and rabbits (Meng et al., 1997; Hsieh et al., 1999; Tei et al., 2003; Izopet et al., 2012). To date, limited information is available concerning the ability of these viruses to infect different species.

Strong Evidence of Foodborne Transmission of HEV

In 2003, zoonotic transmission was reported for the first time. Accordingly, four human cases were linked to the consumption of uncooked wild boar liver and Sika deer meat in Japan. Confirmation was only possible from the deer meat, as no wild boar liver remained to be tested (Matsuda et al., 2003; Tei et al., 2003). A nucleotide homology of 99.7–100% was observed between fragments of 326 nucleotides obtained from the patients who consumed raw deer sushi or sashimi and from the frozen deer meat used to prepare these meals (Tei et al., 2003).

In 2004, another study showed 99.7% homology between the full viral genome sequences found in wild boar and deer hunted in the same forest as the Sika deer consumed by the four patients above (Takahashi et al., 2004). Another report from Japan in 2005 demonstrated transmission via ingestion of wild boar meat. Phylogenetic analysis based on the complete capsid sequences showed 99.95% homology between HEV genotype 3 sequences obtained from the

patient serum and the frozen wild boar meat consumed by them (Li et al., 2005).

Recently, high homology between sequences detected in consumed pork meat and an acute hepatitis E patient was observed in Spain (Riveiro-Barciela et al., 2015). Another strong evidence of HEV foodborne transmission was reported in a patient who consumed figatelli (raw pig liver sausage) in France (Renou et al., 2014).

HEV Transmission through Direct Contact or Indirect Evidence

Epidemiological investigations or clinical evidence has pointed out the consumption of wild boar or domestic pig meat as sources of several human HEV infections with genotypes HEV-3 and HEV-4 (Matsuda et al., 2003; Tamada et al., 2004; Wichmann et al., 2008). In addition, a number of studies have reported the presence of HEV in pig and wild boar meat products with sequences either similar or closely related to the ones found in humans (Feagins et al., 2007; Colson et al., 2010, 2012; Wenzel et al., 2011; Moal et al., 2012).

Geographically, human–swine co-exposure could be related to a higher incidence in humans (Bouquet et al., 2011). Alternatively, if the area with a high incidence of human cases is far from regions with high pig density, eating habits could be a likely explanation (Matsuda et al., 2003; Wibawa et al., 2004; Colson et al., 2010; Bouquet et al., 2011).

Compared to unexposed groups, the HEV antibody prevalence is higher in diverse population groups with higher occupational exposure to HEV. These groups include swine workers (butchers, farmers) and veterinarians. Regardless of exposure, no increase of associated hepatic disease was observed in these populations (Galiana et al., 2008; Chang et al., 2009; Pourpongorn et al., 2009; Krumbholz et al., 2012, 2014). HEV was detected in both the bile of slaughtered pigs and effluent from the slaughterhouse, indicating that pigs can shed HEV at the time of slaughter (Casas et al., 2011; dos Santos et al., 2011). Indeed, a hepatitis E case has already been reported in a slaughterhouse worker (Pérez-Gracia et al., 2007).

Role of Animals as HEV Reservoirs

The phylogenetic relationship of human zoonotic genotype HEV sequences with those of swine and wild boar (HEV-3 and HEV-4) suggests their involvement in the transmission cycle of HEV infection in humans. Rabbits may also represent a reservoir of HEV for humans (Izopet et al., 2012). In addition, cynomolgus macaques and pigs have been experimentally infected with rabbit HEV (Cossaboom et al., 2012; Liu et al., 2013). It is important to note that human

HEV does not formally need a reservoir as faecal–oral transmission is effective in maintaining the infection within a human population, as occurs in non-industrialized regions. However, secondary reservoirs in pigs and wild boar contribute to the maintenance of the infection (HEV genotypes 3 and 4) in developed countries with a high sanitary level. In addition, the presence of the virus in other wild species such as deer may contribute to the maintenance of the virus in the natural environment.

Rodents have long been believed to be a potential reservoir of human HEV. However, the susceptibility of rats to human HEV genotypes is very controversial. HEV-C1 does not infect rhesus monkeys (Purcell et al., 2011), and laboratory rats do not appear to be susceptible to genotypes 1, 3 and 4 (Li et al., 2013a,c), although one study reported partial genotype 3 sequences in rat liver specimens (Lack et al., 2012). Viruses found in birds could not be transmitted experimentally to primates (Huang et al., 2004). The transmission of rat or avian HEV to humans cannot be completely ruled out, but these species are not currently considered to be reservoirs of human HEV. The possibility that bats may play a role as a reservoir of HEV in mammals, as reported for many viruses such as coronaviruses or paramyxoviruses, was examined. Phylogenetic analysis suggested that viruses found in bats belong to the Hepeviridae family and seem to be the most divergent mammalian hepeviruses described so far. Therefore, it is unlikely that bats transmit the virus to humans (Drexler et al., 2012). It is also unlikely that the transmission from trout to humans occurs due to the phylogenetic gaps found between HEV and CTV sequences. The human susceptibility for moose and dromedary camel HEV-related viruses is still unknown and transmission to humans cannot be excluded.

Hypothesis on HEV Origin

The origin of HEV in animals and in humans is still unknown. The presence of animal reservoirs can be considered at two non-mutually exclusive levels: animals as reservoirs for hepevirus ancestors of human HEV or current reservoirs interacting with human populations for zoonotic transmission.

The role played by animals in the emergence of HEV in humans is still uncertain. If the ancestor of genotypes 1–4 is hypothesized to be a human virus transmitted from humans to suids, animals would be the recent onset reservoirs with a role of maintenance of infection and reinfection of other mammals including humans. For instance, the presence of HEV more specific to wild boar (Sato et al., 2011; Takahashi et al., 2011) may be indicative of the existence of a specific viral evolution, reflecting the maintenance of viral infection in this animal population.

The difference between HEV sequences from wild boars and domestic pigs might be related to a dissimilarity in the structure of the two animal populations that could be explained by a higher turnover in domestic pig populations than in wild boar, despite a possible conservation of viruses in reproductive pig herds in sows and boars. This might lead to a lower capacity of the virus to evolve in the domestic swine population. Instead, environmental and behavioural differences of the wild boar may allow a greater stabilization of the virus in this population and promote selection and maintenance of new viruses. A similar evolution may have occurred with the rabbit strain, starting from a related genotype 3 ancestor, but with a separate evolution in the rabbit population. The higher HEV prevalence in domestic swine than in wild animals could be explained by the continuous exchange of viruses between the human and the swine populations. In addition, the intensive contact among confined populations or farmed swine may increase the potential for infection.

The roots of sequences from genotypes HEV-1 to HEV-4 and HEV-C1 rat were calculated (Fig. 4), and results suggested the ancestor to be of animal origin (Purdy and Khudyakov, 2010). This Bayesian analysis considered neither recombination events nor host species evolution. However, hosts of *Orthohepevirus C* variants have been detected from Carnivora, Rodentia and Soricomorpha, and *Orthohepevirus A* variants have been detected from Artiodactyla, Carnivora, Lagomorpha and Primates. Such diversification of host orders suggests that HEV did not co-evolve with its hosts, but is more likely an opportunistic pathogen (Smith et al., 2014). The division that might have led to the ancestors of human and swine hepevirus occurred at about the same time. The appearance of the HEV-C1 suggests that mammalian HEV could have been adapted to different mammalian species over time (Purdy and Khudyakov, 2010). There is evidence that genotype 1 or an anthropotropic ancestor of genotype 1 has been responsible for acute hepatitis infections among adults since the last decade of the 18th century (Teo, 2012). This indicates that either estimates for the time for the most recent common ancestor for genotype 1 are underestimated or genotype 1 has gone through an evolutionary bottleneck and the ancestor is a survivor of that bottleneck. The further discovery of other mammalian HEV-related viruses may help to improve the understanding of *Hepeviridae* evolution. However, the lack of fossil viruses, preventing a confirmation of statistical analyses conducted so far (Purdy and Khudyakov, 2010), poses a challenge regarding the elucidation of the HEV (and HEV-related viruses) origin. Therefore, *Hepeviridae* origin analysis will remain speculative but allows a clarification of the current situation.

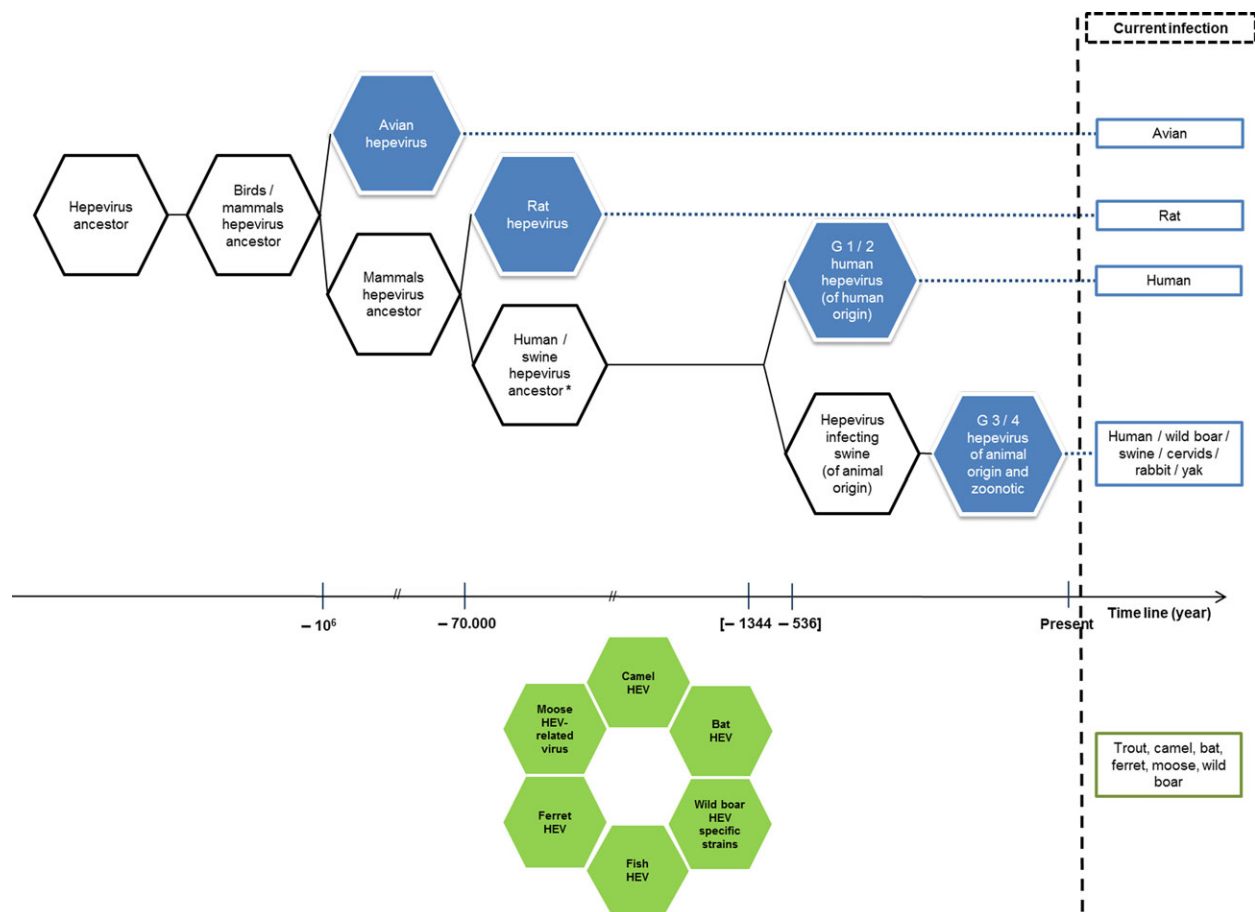


Fig. 4. From hepevirus ancestors to current hepeviruses. In blue, viruses currently responsible for infections. In green, viruses currently responsible for infections, but not time classified. Based on data adapted from Purdy and Khudyakov (2010), Drexler et al. (2012) and Smith et al. (2013, 2014). This figure does not consider any recombinational event. *Infecting mammals of unknown species.

Conclusion

Since the first characterized hepatitis E epidemic in 1955, several outbreaks have been described and the discovery of HEV-related viruses has increased significantly during the last 15 years. Rather than representing a true emergence, this trend is probably due to the increasing interest in public health and food safety as well as the use of improved diagnostic tools. As their discovery, the taxonomy of the *Hepeviridae* family has been in perpetual evolution due to the introduction of newly identified viruses.

The high HEV prevalence in animals worldwide raises the question of transmission to humans. Indeed, studies have shown transmission of HEV via deer, swine and wild boar meat in Europe and Japan. High seroprevalence rates and similarities between the nucleotide sequences studied also raise the question of possible transmission between pigs and wild boar; particularly, when contact between these animals is possible, for example in the context of out-

door breeding pigs. Even if zoonotic transmission from different animal species is accepted in non-endemic regions, strong molecular evidence is scarce and the human susceptibility for bat, rat, ferret, dromedary camel and moose HEV-related viruses is still unknown.

Origins of the virus and pathways of spread through time are still largely unknown due, among other things, to the lack of fossil records. Research to date cannot show the exact roles of humans and animals in *Hepeviridae* evolutionary history.

Acknowledgements

We thank Annette Dougall and Louisa Ludwig for the careful English correction of the manuscript. D. Thiry is supported by the Belgium Federal Public Service, Health, Food Chain Safety and Environment and E.F. Oliveira-Filho by CNPq (Brazilian National Council for Scientific and Technological Development).

Disclaimer

This information is distributed solely for the purpose of pre-dissemination peer review under applicable information quality guidelines. It has not been formally disseminated by the Centers for Disease Control and Prevention/Agency for Toxic Substances and Disease Registry. It does not represent and should not be construed to represent any agency determination or policy. Use of trade names is for identification only and does not imply endorsement by the U.S. Department of Health and Human Services, the Public Health Service, or the Centers for Disease Control and Prevention. The findings and conclusions in this report are those of the authors and do not necessarily represent the views of the Centers for Disease Control and Prevention. The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Adlhoeh, C., A. Wolf, H. Meisel, M. Kaiser, H. Ellerbrok, and G. Pauli, 2009: High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet. Microbiol.* 139, 270–278.
- Aggarwal, R., and S. Naik, 2009: Epidemiology of hepatitis E: current status. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 24, 1484–1493.
- Arankalle, V. A., M. K. Goverdhan, and K. Banerjee, 1994: Antibodies against hepatitis E virus in old world monkeys. *J. Viral Hepat.* 1, 125–129.
- Arankalle, V. A., M. V. Joshi, A. M. Kulkarni, S. S. Gandhe, L. P. Chobe, S. S. Rautmare, A. C. Mishra, and V. S. Padbidri, 2001: Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral Hepat.* 8, 223–227.
- Aye, T. T., T. Uchida, X. Z. Ma, F. Iida, T. Shikata, H. Zhuang, and K. M. Win, 1992: Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986–1988) of China. *Nucleic Acids Res.* 20, 3512.
- Batts, W., S. Yun, R. Hedrick, and J. Winton, 2011: A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (*Oncorhynchus clarkii*). *Virus Res.* 158, 116–123.
- Billam, P., F. F. Huang, Z. F. Sun, F. W. Pierson, R. B. Duncan, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng, 2005: Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J. Virol.* 79, 3429–3437.
- Billam, P., T. LeRoith, R. S. Pudupakam, F. W. Pierson, R. B. Duncan, and X. J. Meng, 2009: Comparative pathogenesis in specific-pathogen-free chickens of two strains of avian hepatitis E virus recovered from a chicken with Hepatitis-Splenomegaly syndrome and from a clinically healthy chicken. *Vet. Microbiol.* 139, 253–261.
- Boadella, M., M. Casas, M. Martín, J. Vicente, J. Segalés, J. de la Fuente, and C. Gortázar, 2010: Increasing contact with hepatitis E virus in red deer, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1994–1996.
- Bodewes, R., J. van der Giessen, B. L. Haagmans, A. D. Osterhaus, and S. L. Smits, 2013: Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J. Virol.* 87, 7758–7764.
- Bouquet, J., S. Tessé, A. Lunazzi, M. Eloit, N. Rose, E. Nicand, and N. Pavio, 2011: Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2018–2025.
- Bradley, D. W., K. Krawczynski, E. H. Cook, K. A. McCaustland, C. D. Humphrey, J. E. Spelbring, H. Myint, and J. E. Maynard, 1987: Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 84, 6277–6281.
- Bradley, D., A. Andjaparidze, E. H. Cook, K. McCaustland, M. Balayan, H. Stetler, O. Velazquez, B. Robertson, C. Humphrey, and M. Kane, 1988: Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J. Gen. Virol.* 69, 731–738.
- de Carvalho, L. G., R. S. Marchevsky, D. R. Dos Santos, J. M. de Oliveira, V. S. de Paula, L. M. Lopes, W. H. Van der Poel, J. E. González, M. S. Munné, J. Moran, A. C. Cajaraville, M. Pelajo-Machado, O. G. Cruz, and M. A. Pinto, 2013: Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect. Dis.* 13, 495.
- Casas, M., R. Cortés, S. Pina, B. Peralta, A. Allepuz, M. Cortey, J. Casal, and M. Martín, 2011: Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet. Microbiol.* 148, 27–34.
- (CDC), C. f. D. C. a. P., 2013: Investigation of hepatitis E outbreak among refugees – Upper Nile, South Sudan, 2012–2013. *MMWR Morb. Mortal. Wkly Rep.* 62, 581–586.
- Chang, Y., L. Wang, J. Geng, Y. Zhu, H. Fu, F. Ren, L. Li, X. Wang, and H. Zhuang, 2009: Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): a study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatol. Res.* 39, 1153–1158.
- Clayson, E. T., B. L. Innis, K. S. Myint, S. Narupiti, D. W. Vaughn, S. Giri, P. Ranabhat, and M. P. Shrestha, 1995: Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 53, 228–232.
- Clemente-Casares, P., S. Pina, M. Buti, R. Jardi, M. Martín, S. Bofill-Mas, and R. Girones, 2003: Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9, 448–454.
- Colson, P., P. Borentain, B. Queyriaux, M. Kaba, V. Moal, P. Gallian, L. Heyries, D. Raoult, and R. Gerolami, 2010: Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 202, 825–834.
- Colson, P., P. Romanet, V. Moal, P. Borentain, R. Purgus, A. Benezech, A. Motte, and R. Gerolami, 2012: Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1361–1364.
- Cossaboom, C. M., L. Córdoba, B. A. Dryman, and X. J. Meng, 2011: Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2047–2049.
- Cossaboom, C. M., L. Córdoba, B. J. Sanford, P. Piñeyro, S. P. Kenney, B. A. Dryman, Y. Wang, and X. J. Meng, 2012: Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain

- of hepatitis E virus isolated in the United States. *J. Gen. Virol.* 93, 1687–1695.
- Crossan, C., P. J. Baker, J. Craft, Y. Takeuchi, H. R. Dalton, and L. Scobie, 2012: Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 2085–2087.
- Dai, X., C. Dong, Z. Zhou, J. Liang, M. Dong, Y. Yang, J. Fu, H. Tian, S. Wang, J. Fan, J. Meng, and M. A. Purdy, 2013: Hepatitis E virus genotype 4, Nanjing, China, 2001–2011. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1528–1530.
- de Deus, N., B. Peralta, S. Pina, A. Allepuz, E. Mateu, D. Vidal, F. Ruiz-Fons, M. Martín, C. Gortázar, and J. Segalés, 2008: Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet. Microbiol.* 129, 163–170.
- Donia, D., M. C. Dell'Amico, A. R. Petrinca, I. Martinucci, M. Mazzei, F. Tolari, and M. Divizia, 2012: Presence of hepatitis E RNA in mussels used as bio-monitors of viral marine pollution. *J. Virol. Methods* 186, 198–202.
- Dremsek, P., J. J. Wenzel, R. John, M. Ziller, J. Hofmann, M. H. Groschup, S. Werdermann, U. Mohn, S. Dorn, M. Motz, M. Mertens, W. Jilg, and R. G. Ulrich, 2012: Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 189–200.
- Drexler, J. F., A. Seelen, V. M. Corman, A. Fumie Tateno, V. Cottontail, R. Melim Zerbinati, F. Gloza-Rausch, S. M. Klose, Y. Adu-Sarkodie, S. K. Oppong, E. K. Kalko, A. Osterman, A. Rasche, A. Adam, M. A. Müller, R. G. Ulrich, E. M. Leroy, A. N. Lukashev, and C. Drosten, 2012: Bats worldwide carry hepatitis E-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.* 86, 9134–9147.
- Easterbrook, J. D., J. B. Kaplan, N. B. Vanasco, W. K. Reeves, R. H. Purcell, M. Y. Kosoy, G. E. Glass, J. Watson, and S. L. Klein, 2007: A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol. Infect.* 135, 1192–1199.
- Emerson, S., D. Anderson, A. Arankalle, X.-J. Meng, M. Purdy, G. Schlauder, and R. Purcell, 2005: Hepevirus. In: Fauquet, C., Mayo, M., Maniloff, J., Desselberger, U. and Ball, L. A. (eds), *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. pp. 853–857. Elsevier/Academic Press, London.
- Engle, R. E., C. Yu, S. U. Emerson, X. J. Meng, and R. H. Purcell, 2002: Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4576–4580.
- Favorov, M. O., M. Y. Kosoy, S. A. Tsarev, J. E. Childs, and H. S. Margolis, 2000: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.* 181, 449–455.
- Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng, 2007: Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J. Gen. Virol.* 88, 912–917.
- Forgách, P., N. Nowotny, K. Erdélyi, A. Boncz, J. Zentai, G. Szucs, G. Reuter, and T. Bakonyi, 2010: Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet. Microbiol.* 143, 106–116.
- Francis, D. P., and J. E. Maynard, 1979: The transmission and outcome of hepatitis A, B, and non-A, non-B: a review. *Epidemiol. Rev.* 1, 17–31.
- Galiana, C., S. Fernández-Barredo, A. García, M. T. Gómez, and M. T. Pérez-Gracia, 2008: Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78, 1012–1015.
- Geng, Y., C. Zhao, A. Song, J. Wang, X. Zhang, T. J. Harrison, Y. Zhou, W. Wang, and Y. Wang, 2011: The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China. *Infect. Genet. Evol.* 11, 476–482.
- Graff, J., H. Nguyen, C. Yu, W. R. Elkins, M. St Claire, R. H. Purcell, and S. U. Emerson, 2005: The open reading frame 3 gene of hepatitis E virus contains a cis-reactive element and encodes a protein required for infection of macaques. *J. Virol.* 79, 6680–6689.
- Graff, J., U. Torian, H. Nguyen, and S. U. Emerson, 2006: A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.* 80, 5919–5926.
- Grodzki, M., J. Schaeffer, J. C. Piquet, J. C. Le Saux, J. Chévê, J. Ollivier, J. Le Pendu, and F. S. Le Guyader, 2014: Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 4269–4276.
- Guan, D., W. Li, J. Su, L. Fang, N. Takeda, T. Wakita, T. C. Li, and C. Ke, 2013: Asian musk shrew as a reservoir of rat hepatitis E virus, China. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1341–1343.
- Guo, H., E. M. Zhou, Z. F. Sun, X. J. Meng, and P. G. Halbur, 2006: Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J. Gen. Virol.* 87, 217–223.
- Gupta, H., Y. K. Joshi, A. Varma, S. Shenoy, S. Sriramchari, B. Iyenger, and B. N. Tandon, 1990: Transmission of enteric non-A, non-B hepatitis virus in *Macaca mulatta* monkeys by intraportal route: subsequent passages of HEV virus. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 5, 608–615.
- Han, J., H. Zeng, L. Wang, P. Liu, L. Liu, J. Xia, Y. Zhang, and H. Zhuang, 2014: Hepatitis E virus infection in farmed rabbits and swine in the Eastern Chinese city Lianyungang: showing no potential interspecies transmission. *J. Med. Virol.* 86, 1898–1904.
- Haqshenas, G., H. L. Shivaprasad, P. R. Woolcock, D. H. Read, and X. J. Meng, 2001: Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *J. Gen. Virol.* 82, 2449–2462.
- Haqshenas, G., F. F. Huang, M. Fenaux, D. K. Guenette, F. W. Pierson, C. T. Larsen, H. L. Shivaprasad, T. E. Toth, and X. J. Meng, 2002: The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J. Gen. Virol.* 83, 2201–2209.
- Hedrick, R. P., S. Yun, and W. H. Wingfield, 1991: A small RNA virus isolated from salmonid fishes in

- California, USA. *Can. J. Fish Aquat. Sci.* 48, 99–104.
- Hirano, M., X. Ding, T. C. Li, N. Takeda, H. Kawabata, N. Koizumi, T. Kadosaka, I. Goto, T. Masuzawa, M. Nakamura, K. Taira, T. Kuroki, T. Tanikawa, H. Watanabe, and K. Abe, 2003a: Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 27, 1–5.
- Hirano, M., X. Ding, H. T. Tran, T. C. Li, N. Takeda, T. Sata, S. Nakamura, and K. Abe, 2003b: Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infect. Dis.* 56, 8–11.
- Holla, R. P., I. Ahmad, Z. Ahmad, and S. Jameel, 2013: Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin. Liver Dis.* 33, 3–14.
- Hsieh, S. Y., X. J. Meng, Y. H. Wu, S. T. Liu, A. W. Tam, D. Y. Lin, and Y. F. Liaw, 1999: Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.* 37, 3828–3834.
- Hsu, I. W., and H. J. Tsai, 2014: Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 149–151.
- Hu, G. D., and X. Ma, 2010: Detection and sequences analysis of bovine hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region. *Bing Du Xue Bao* 26, 27–32.
- Huang, C. C., D. Nguyen, J. Fernandez, K. Y. Yun, K. E. Fry, D. W. Bradley, A. W. Tam, and G. R. Reyes, 1992: Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191, 550–558.
- Huang, F. F., G. Haqshenas, H. L. Shivaprasad, D. K. Guenette, P. R. Woolcock, C. T. Larsen, F. W. Pierson, F. Elvinger, T. E. Toth, and X. J. Meng, 2002: Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4197–4202.
- Huang, F. F., Z. F. Sun, S. U. Emerson, R. H. Purcell, H. L. Shivaprasad, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng, 2004: Determination and analysis of the complete genomic sequence of avian hepatitis E virus (avian HEV) and attempts to infect rhesus monkeys with avian HEV. *J. Gen. Virol.* 85, 1609–1618.
- Ijaz, S., B. Said, E. Boxall, E. Smit, D. Morgan, and R. S. Tedder, 2014: Indigenous hepatitis E in England and Wales from 2003 to 2012: evidence of an emerging novel phylotype of viruses. *J. Infect. Dis.* 209, 1212–1218.
- Izopet, J., M. Dubois, S. Bertagnoli, S. Lhomme, S. Marchandeau, S. Boucher, N. Kamar, F. Abravanel, and J. L. Guérin, 2012: Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1274–1281.
- Jiménez de Oya, N., E. Escibano-Romero, A. B. Blázquez, and J. C. Saiz, 2007: Hepatitis E virus: zoonotic implications. *Gastroenterol. Hepatol.* 30, 408–418.
- Johne, R., A. Plenge-Bönig, M. Hess, R. G. Ulrich, J. Reetz, and A. Schielke, 2010: Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.* 91, 750–758.
- Johne, R., P. Dremsek, E. Kindler, A. Schielke, A. Plenge-Bönig, H. Gregersen, U. Wessels, K. Schmidt, W. Rietschel, M. H. Groschup, S. Guenther, G. Heckel, and R. G. Ulrich, 2012: Rat hepatitis E virus: geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Infect. Genet. Evol.* 12, 947–956.
- Kabrane-Lazizi, Y., J. B. Fine, J. Elm, G. E. Glass, H. Higa, A. Diwan, C. J. Gibbs, X. J. Meng, S. U. Emerson, and R. H. Purcell, 1999: Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 61, 331–335.
- Kaur, M., K. C. Hyams, M. A. Purdy, K. Krawczynski, W. M. Ching, K. E. Fry, G. R. Reyes, D. W. Bradley, and M. Carl, 1992: Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 89, 3855–3858.
- Khuroo, M. S., 2008: Hepatitis E virus. *Curr. Opin. Infect Dis.* 21, 539–543.
- Khuroo, M. S., 2011: Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.* 161, 3–14.
- Koff, R. S., 2007: Review article: vaccination and viral hepatitis - current status and future prospects. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 26, 1285–1292.
- Koonin, E. V., A. E. Gorbalenya, M. A. Purdy, M. N. Rozanov, G. R. Reyes, and D. W. Bradley, 1992: Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 89, 8259–8263.
- Krog, J. S., S. Breum, T. H. Jensen, and L. E. Larsen, 2013: Hepatitis E virus variant in farmed mink, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 2028–2030.
- Krumbholz, A., U. Mohn, J. Lange, M. Motz, J. J. Wenzel, W. Jilg, M. Walther, E. Straube, P. Wutzler, and R. Zell, 2012: Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 239–244.
- Krumbholz, A., S. Joel, P. Dremsek, A. Neubert, R. Johne, R. Dürrwald, M. Walther, T. H. Müller, D. Kühnel, J. Lange, P. Wutzler, A. Sauerbrei, R. G. Ulrich, and R. Zell, 2014: Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med. Microbiol. Immunol.* 203, 273–282.
- Kwon, H. M., H. W. Sung, and X. J. Meng, 2012: Serological prevalence, genetic identification, and characterization of the first strains of avian hepatitis E virus from chickens in Korea. *Virus Genes* 45, 237–245.
- Lack, J. B., K. Volk, and R. A. Van Den Bussche, 2012: Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1268–1273.
- Lewis, H. C., O. Wichmann, and E. Duizer, 2010: Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol. Infect.* 138, 145–166.

- Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda, and T. Miyamura, 2005: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958–1960.
- Li, T. C., T. Miyamura, and N. Takeda, 2007: Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 170–172.
- Li, T. C., Y. Ami, Y. Suzaki, N. Takeda, and W. Takaji, 2013a: No evidence for hepatitis E virus genotype 3 susceptibility in rats. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 1343–1345.
- Li, T. C., Y. Ami, Y. Suzaki, S. P. Yasuda, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, N. Takeda, and W. Takaji, 2013b: Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 115–118.
- Li, T. C., S. Yoshizaki, Y. Ami, Y. Suzaki, S. P. Yasuda, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, N. Takeda, and T. Wakita, 2013c: Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet. Microbiol.* 163, 54–61.
- Li, W., D. Guan, J. Su, N. Takeda, T. Wakita, T. C. Li, and C. W. Ke, 2013d: High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet. Microbiol.* 165, 275–280.
- Li, T. C., T. Yang, Y. Ami, Y. Suzaki, M. Shirakura, N. Kishida, H. Asanuma, N. Takeda, and W. Takaji, 2014: Complete genome of hepatitis E virus from laboratory ferrets. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 709–712.
- Li, T. C., K. Yonemitsu, Y. Terada, N. Takeda, T. Wakita, and K. Maeda, 2015: Ferret hepatitis E virus infection in Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* 68, 60–62.
- Lin, J., H. Norder, H. Uhlhorn, S. Belák, and F. Widén, 2013: Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *J. Gen. Virol.* 95, 557–570.
- Liu, P., Q. N. Bu, L. Wang, J. Han, R. J. Du, Y. X. Lei, Y. Q. Ouyang, J. Li, Y. H. Zhu, F. M. Lu, and H. Zhuang, 2013: Transmission of hepatitis E virus from rabbits to cynomolgus macaques. *Emerg. Infect. Dis.* 19, 559–565.
- Liu, B., Q. Zhao, Y. Sun, X. Wang, J. Zhao, T. Du, C. Wang, S. Xiao, Y. Mu, G. Zhang, J. Luo, W. H. Hsu, and E. M. Zhou, 2014: Development of a blocking ELISA for detection of antibodies against avian hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 204, 1–5.
- Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn, 2006: Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5–36.
- Maneerat, Y., E. T. Clayson, K. S. Myint, G. D. Young, and B. L. Innis, 1996: Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 48, 121–128.
- Martelli, F., A. Caprioli, M. Zengarini, A. Marata, C. Fiegna, I. Di Bartolo, F. M. Ruggeri, M. Delogu, and F. Ostanello, 2008: Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet. Microbiol.* 126, 74–81.
- Mast, E. E., M. A. Purdy, and K. Krawczynski, 1996: Hepatitis E. *Baillieres Clin. Gastroenterol.* 10, 227–242.
- Matsuda, H., K. Okada, K. Takahashi, and S. Mishihiro, 2003: Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 188, 944.
- Matsuura, Y., M. Suzuki, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, I. Takashima, M. Yokoyama, H. Igota, K. Yamauchi, S. Ishida, D. Fukui, G. Bando, M. Kosuge, H. Tsunemitsu, C. Koshimoto, K. Sakae, M. Chikahira, S. Ogawa, T. Miyamura, N. Takeda, and T. C. Li, 2007: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild Sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch. Virol.* 152, 1375–1381.
- McCaustland, K. A., K. Krawczynski, J. W. Ebert, M. S. Balayan, A. G. Andjaparidze, J. E. Spelbring, E. H. Cook, C. Humphrey, P. O. Yarbough, M. O. Favorov, D. Carson, D. W. Bradley, and B. H. Robertson, 2000: Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis. *Arch. Virol.* 145, 1909–1918.
- Meng, X. J., 2010a: Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 140, 256–265.
- Meng, X. J., 2010b: Recent advances in Hepatitis E virus. *J. Viral Hepat.* 17, 153–161.
- Meng, X. J., 2011: From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161, 23–30.
- Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson, 1997: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 94, 9860–9865.
- Meng, X. J., D. A. Anderson, V. A. Arankalle, S. U. Emerson, T. J. Harrison, S. Jameel, and H. Okamoto, 2011: Family Hepeviridae. In: King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B., and Lefkowitz, E. J. (eds), *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, 1st edn. Elsevier, San-Diego, USA.
- Moal, V., R. Gerolami, and P. Colson, 2012: First human case of co-infection with two different subtypes of hepatitis E virus. *Intervirology* 55, 484–487.
- Mochizuki, M., A. Ouchi, K. Kawakami, T. Ishida, T. C. Li, N. Takeda, H. Ikeda, and H. Tsunemitsu, 2006: Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet. Rec.* 159, 853–854.
- Mushahwar, I. K., 2008: Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* 80, 646–658.
- Nakamura, M., K. Takahashi, K. Taira, M. Taira, A. Ohno, H. Sakugawa, M. Arai, and S. Mishihiro, 2006: Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatol. Res.* 34, 137–140.
- Oliveira-Filho, E. F., M. König, and H. J. Thiel, 2013: Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.* 165, 148–154.
- Oliveira-Filho, E. F., B. R. Bank-Wolf, H. J. Thiel, and M. König, 2014: Phylogenetic analysis of hepatitis E virus in domestic swine and wild boar in Germany. *Vet. Microbiol.* 174, 233–238.
- Panda, S. K., D. Thakral, and S. Rehman, 2007: Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 17, 151–180.

- Pavio, N., X. J. Meng, and C. Renou, 2010: Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.* 41, 46.
- Payne, C. J., T. M. Ellis, S. L. Plant, A. R. Gregory, and G. E. Wilcox, 1999: Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.* 68, 119–125.
- Peralta, B., M. Biarnés, G. Ordóñez, R. Porta, M. Martín, E. Mateu, S. Pina, and X. J. Meng, 2009: Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet. Microbiol.* 137, 31–36.
- Pérez-Gracia, M. T., M. L. Mateos, C. Galiana, S. Fernández-Barredo, A. García, M. T. Gómez, and V. Moreira, 2007: Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 77, 893–896.
- Pourpongorn, P., K. Samransurp, P. Rojanasang, S. Wiwattanagul, and S. Srisurapanon, 2009: The prevalence of anti-hepatitis E in occupational risk groups. *J. Med. Assoc. Thai.* 92, 38–42.
- Purcell, R. H., R. E. Engle, M. P. Rood, Y. Kabrane-Lazizi, H. T. Nguyen, S. Govindarajan, M. St Claire, and S. U. Emerson, 2011: Hepatitis E virus in rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2216–2222.
- Purdy, M. A., and Y. E. Khudiyakov, 2010: Evolutionary history and population dynamics of hepatitis E virus. *PLoS ONE* 5, e14376.
- Raj, V. S., S. L. Smits, S. D. Pas, L. B. Provacia, H. Moorman-Roest, A. D. Osterhaus, and B. L. Haagmans, 2012: Novel hepatitis E virus in ferrets, the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 18, 1369–1370.
- Renou, C., A. M. Afonso, and N. Pavio, 2014: Foodborne transmission of hepatitis e virus from raw pork liver sausage, france. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1945–1947.
- Reuter, G., D. Fodor, P. Forgách, A. Kátai, and G. Szucs, 2009: Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol.* 44, 277–281.
- Reyes, G. R., M. A. Purdy, J. P. Kim, K. C. Luk, L. M. Young, K. E. Fry, and D. W. Bradley, 1990: Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247, 1335–1339.
- Riveiro-Barciela, M., B. Mínguez, R. Gironés, F. Rodríguez-Frías, J. Quer, and M. Buti, 2015: Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.* 49, 165–168.
- Rutjes, S. A., F. Lodder-Verschoor, W. J. Lodder, J. van der Giesen, H. Reesink, M. Bouwknegt, and A. M. de Roda Husman, 2010: Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J. Virol. Methods* 168, 197–206.
- dos Santos, D. R., V. S. de Paula, J. M. de Oliveira, R. S. Marchevsky, and M. A. Pinto, 2011: Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet. Microbiol.* 149, 236–241.
- Sato, Y., H. Sato, K. Naka, S. Furuya, H. Tsukiji, K. Kitagawa, Y. Sonoda, T. Usui, H. Sakamoto, S. Yoshino, Y. Shimizu, M. Takahashi, S. Nagashima, T. Nishizawa, Jirintai, and H. Okamoto, 2011: A nationwide survey of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars in Japan: identification of boar HEV strains of genotypes 3 and 4 and unrecognized genotypes. *Arch. Virol.* 156, 1345–1358.
- Scharschmidt, B. F., 1995: Hepatitis E: a virus in waiting. *Lancet* 346, 519–520.
- Skaug, K., I. J. Hagen, and B. von der Lippe, 1994: Three cases of acute hepatitis E virus infection imported into Norway. *Scand. J. Infect. Dis.* 26, 137–139.
- Smith, D. B., M. A. Purdy, and P. Simmonds, 2013: Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J. Virol.* 87, 4161–4169.
- Smith, D. B., P. Simmonds, S. Jameel, S. U. Emerson, T. J. Harrison, X. J. Meng, H. Okamoto, W. H. Van der Poel, and M. A. Purdy, 2014: Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 95, 2223–2232.
- Sonoda, H., M. Abe, T. Sugimoto, Y. Sato, M. Bando, E. Fukui, H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto, 2004: Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5371–5374.
- Sreenivasan, M. A., V. A. Arankalle, A. Sehgal, and K. M. Pavri, 1984: Non-A, non-B epidemic hepatitis: visualization of virus-like particles in the stool by immune electron microscopy. *J. Gen. Virol.* 65, 1005–1007.
- Sun, Z. F., C. T. Larsen, A. Dunlop, F. F. Huang, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng, 2004a: Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J. Gen. Virol.* 85, 693–700.
- Sun, Z. F., C. T. Larsen, F. F. Huang, P. Billam, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng, 2004b: Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J. Clin. Microbiol.* 42, 2658–2662.
- Takahashi, M., T. Nishizawa, H. Miyajima, Y. Gotanda, T. Iita, F. Tsuda, and H. Okamoto, 2003: Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.* 84, 851–862.
- Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe, and S. Mishiro, 2004: Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330, 501–505.
- Takahashi, M., T. Nishizawa, H. Sato, Y. Sato, S. Nagashima, Jirintai, and H. Okamoto, 2011: Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* 92, 902–908.
- Tamada, Y., K. Yano, H. Yatsuhashi, O. Inoue, F. Mawatari, and H. Ishibashi, 2004: Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J. Hepatol.* 40, 869–870.

- Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, and S. Mishiro, 2003: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Teo, C. G., 2012: Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. *Epidemiol. Infect.* 140, 767–787.
- Thiry, D., A. Mauroy, C. Saegerman, I. Thomas, M. Wautier, C. Miry, G. Czaplicki, D. Berkvens, N. Praet, W. van der Poel, R. Cariolet, B. Brochier, and E. Thiry, 2014: Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium. *Vet. Microbiol.* 172, 407–414.
- Tichehurst, J., L. L. Rhodes, K. Krawczynski, L. V. Asher, W. F. Engler, T. L. Mensing, J. D. Caudill, M. H. Sjogren, C. H. Hoke, and J. W. LeDuc, 1992: Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus from Mexico. *J. Infect. Dis.* 165, 835–845.
- Tsarev, S. A., S. U. Emerson, G. R. Reyes, T. S. Tsareva, L. J. Legters, I. A. Malik, M. Iqbal, and R. H. Purcell, 1992: Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A* 89, 559–563.
- Tsarev, S. A., T. S. Tsareva, S. U. Emerson, S. Govindarajan, M. Shapiro, J. L. Gerin, and R. H. Purcell, 1997: Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine* 15, 1834–1838.
- Viswanathan, R., 1957: Epidemiology. *Indian J. Med. Res.* 45, 1–29.
- Vital, C. L., M. A. Pinto, L. L. Lewis-Ximenez, Y. E. Khudyakov, D. R. dos Santos, and A. M. Gaspar, 2005: Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 100, 117–122.
- Wang, Y., and X. Ma, 2010: Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50, 937–941.
- Wang, Y., R. Ling, J. C. Erker, H. Zhang, H. Li, S. Desai, I. K. Mushahwar, and T. J. Harrison, 1999: A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 80, 169–177.
- Wang, Y. C., H. Y. Zhang, N. S. Xia, G. Peng, H. Y. Lan, H. Zhuang, Y. H. Zhu, S. W. Li, K. G. Tian, W. J. Gu, J. X. Lin, X. Wu, H. M. Li, and T. J. Harrison, 2002: Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J. Med. Virol.* 67, 516–521.
- Wenzel, J. J., J. Preiss, M. Schemmerer, B. Huber, A. Plentz, and W. Jilg, 2011: Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J. Clin. Virol.* 52, 50–54.
- WHO, 2013: Hepatitis E. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> (accessed 23 January 2014).
- Wibawa, I. D., D. H. Muljono, Mulyanto, I. G. Suryadarma, F. Tsuda, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto, 2004: Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J. Med. Virol.* 73, 38–44.
- Wichmann, O., S. Schimanski, J. Koch, M. Kohler, C. Rothe, A. Plentz, W. Jilg, and K. Stark, 2008: Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect. Dis.* 198, 1732–1741.
- Widén, F., L. Sundqvist, A. Matyi-Toth, G. Metreveli, S. Belák, G. Hallgren, and H. Norder, 2011: Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 139, 361–371.
- Woo, P. C., S. K. Lau, J. L. Teng, A. K. Tsang, M. Joseph, E. Y. Wong, Y. Tang, S. Sivakumar, J. Xie, R. Bai, R. Wernery, U. Wernery, and K. Y. Yuen, 2014: New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1044–1048.
- Xu, F., Y. Pan, A. R. Baloch, L. Tian, M. Wang, W. Na, L. Ding, and Q. Zeng, 2014: Hepatitis e virus genotype 4 in yak, north-western china. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 2182–2184.
- Yin, S., R. H. Purcell, and S. U. Emerson, 1994: A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions. *Virus Genes* 9, 23–32.
- Yu, C., C. Zimmerman, R. Stone, R. E. Engle, W. Elkins, G. A. Nardone, S. U. Emerson, and R. H. Purcell, 2007: Using improved technology for filter paper-based blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 142, 143–150.
- Zhang, M., S. U. Emerson, H. Nguyen, R. E. Engle, S. Govindarajan, J. L. Gerin, and R. H. Purcell, 2001: Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine* 20, 853–857.
- Zhang, W., Q. Shen, J. Mou, G. Gong, Z. Yang, L. Cui, J. Zhu, G. Ju, and X. Hua, 2008a: Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health* 55, 291–298.
- Zhang, W., Q. Shen, J. Mou, Z. B. Yang, C. L. Yuan, L. Cui, J. G. Zhu, X. G. Hua, C. M. Xu, and J. Hu, 2008b: Cross-species infection of hepatitis E virus in a zoo-like location, including birds. *Epidemiol. Infect.* 136, 1020–1026.
- Zhao, C., Z. Ma, T. J. Harrison, R. Feng, C. Zhang, Z. Qiao, J. Fan, H. Ma, M. Li, A. Song, and Y. Wang, 2009: A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *J. Med. Virol.* 81, 1371–1379.
- Zhao, Q., Y. N. Sun, S. B. Hu, X. J. Wang, Y. H. Xiao, W. H. Hsu, S. Q. Xiao, C. B. Wang, Y. Mu, J. A. Hiscox, and E. M. Zhou, 2013: Characterization of antigenic domains and epitopes in the ORF3 protein of a Chinese isolate of avian hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.* 167, 242–249.

Supporting Information [Correction added on 20 June 2015, after first online publication: Legend of Table S1 has been corrected.]

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Detection of HEV or HEV-related viruses in animals.

Supplementary table 1: Detection of HEV or HEV-related viruses in animals

Animal species	Country	Genotype	Reference
Domestic pig	China	3	Ning <i>et al.</i> , 2007
			Zhang <i>et al.</i> , 2008
		3, 4	Li <i>et al.</i> , 2009
		4	Zheng <i>et al.</i> , 2006
			Yan <i>et al.</i> , 2008
			Li <i>et al.</i> , 2008
			Jinshan <i>et al.</i> , 2010
			Geng <i>et al.</i> , 2010
			Geng <i>et al.</i> , 2011
			Geng <i>et al.</i> , 2011
			Wang <i>et al.</i> , 2002
			Chang <i>et al.</i> , 2009
	Japan	3	Tanaka <i>et al.</i> , 2004
			Sakano <i>et al.</i> , 2009
		3, 4	Takahashi <i>et al.</i> , 2003
	Taiwan	3	Takahashi <i>et al.</i> , 2005
			Hsieh <i>et al.</i> , 1999
	India	4	Wu <i>et al.</i> , 2000
			Arankalle <i>et al.</i> , 2003
			Vivek and Kang, 2011
	Korea	3	Begum <i>et al.</i> 2010
			Yu <i>et al.</i> , 2008
	Thailand	3	Lee <i>et al.</i> , 2009
	Mongolia	3	Siripanyaphinyo <i>et al.</i> , 2009
	Indonesia	3	Lorenzo <i>et al.</i> , 2007
		4	Utsumi <i>et al.</i> , 2011
	New Caledonia	3	Wibawa <i>et al.</i> , 2004
	New Zealand	3	Kaba <i>et al.</i> , 2011
	Australia	3	Garkavenko <i>et al.</i> , 2001
	USA	3	Genbank (AF521653)
			Meng <i>et al.</i> , 1997
	Canada	3	Huang <i>et al.</i> , 2002
	Mexico	3	Ward <i>et al.</i> , 2008
	Costa Rica	3	Cantú-Martine <i>et al.</i> 2013
	Cuba	3	Kase <i>et al.</i> 2008
	Argentina	3	Villalba <i>et al.</i> 2013
	Brazil	3	Munné <i>et al.</i> , 2006
	Bolivia	3	dos Santos <i>et al.</i> , 2011
	Cameroon	3	Dell'Amico <i>et al.</i> , 2011
	Congo	3	De Paula <i>et al.</i> 2013
	Madagascar	3	Kaba <i>et al.</i> , 2010a
	Nigeria	3	Temmam <i>et al.</i> , 2013
	Austria	3	Olajide <i>et al.</i> , 2014
	Belgium	3	Zwettler <i>et al.</i> 2012
		3, 4	Thiry <i>et al.</i> , 2014
	Croatia	3	Hakze-van der Honing <i>et al.</i> , 2011
	Czech Republic	3	Lipej <i>et al.</i> 2013
	Denmark	3, 4	Vasickova <i>et al.</i> , 2009
	England	3	Breum <i>et al.</i> 2010
			McCreary <i>et al.</i> , 2008

	France	3	Kaba <i>et al.</i> , 2009
			Rose <i>et al.</i> , 2011
	Germany	3	Baechlein <i>et al.</i> , 2010
	Hungary	3	Reuter <i>et al.</i> , 2009
			Forgách <i>et al.</i> , 2010
	Italy	3	Di Bartolo <i>et al.</i> , 2008
			Martelli <i>et al.</i> , 2010
			Di Bartolo <i>et al.</i> , 2011
		3, 4	Monne <i>et al.</i> , 2014
	Portugal	3	Berto <i>et al.</i> , 2012
	The Netherlands	3	Hakze-van der Honing <i>et al.</i> , 2011
	Spain	3	Jiménez de Oya <i>et al.</i> , 2011
			Fernández-Barredo <i>et al.</i> , 2006
			de Deus <i>et al.</i> , 2007
	Sweden	3	Widén <i>et al.</i> , 2011
Wild boar	Japan	3	Sonoda <i>et al.</i> , 2004
			Nishizawa <i>et al.</i> , 2005
			Sakano <i>et al.</i> , 2009
		3, 4	Sato <i>et al.</i> , 2011
		Specific strains	Takahashi <i>et al.</i> , 2011
			Sato <i>et al.</i> , 2011
	France	3	Kaba <i>et al.</i> , 2010
	Germany	3	Adlhoch <i>et al.</i> , 2009
			Kaci <i>et al.</i> , 2008
	Hungary	3	Reuter <i>et al.</i> , 2009
	Italy	3	Martelli <i>et al.</i> , 2008
	Spain	3	de Deus <i>et al.</i> , 2008
Deer	Sweden	3	Widén <i>et al.</i> , 2011
	Thailand	3	Wiratsudakul <i>et al.</i> 2012
	Japan	3	Tei <i>et al.</i> , 2003
	The Netherlands	3	Rutjes <i>et al.</i> , 2010
	Hungary	3	Reuter <i>et al.</i> , 2009
			Forgach <i>et al.</i> , 2009
Bovids	Spain	3	Boadella <i>et al.</i> , 2010
	China	3	Zhang <i>et al.</i> , 2007
Moose	China	4	Hu <i>et al.</i> , 2010
			Wang <i>et al.</i> , 2010
			Xu <i>et al.</i> , 2014
Dromedary camel	Sweden	/	Lin <i>et al.</i> , 2013
	Dubai	/	Woo <i>et al.</i> , 2014
Rabbit	China	3	Zhao <i>et al.</i> , 2009
			Geng <i>et al.</i> , 2011
	USA	3	Cossaboom <i>et al.</i> , 2011
	France	3	Izopet <i>et al.</i> , 2012
Rat	Vietnam	C1	Li <i>et al.</i> , 2013
	Germany	C1	Johne <i>et al.</i> , 2010
	USA	C1	Lack <i>et al.</i> , 2012
	China	C1	Li <i>et al.</i> , 2013
	Indonesia	C1	Mulyanto <i>et al.</i> , 2013
Asian musk shrew	China	/	Guan <i>et al.</i> , 2013
Ferret	The Netherlands	C2	Raj <i>et al.</i> , 2012
	USA	C2	Li <i>et al.</i> , 2014
	Japan	C2	Li <i>et al.</i> , 2014

Mink	Denmark	/	Krog <i>et al.</i> , 2013
Fox	The Netherlands	/	Bodewes <i>et al.</i> , 2013
Mongoose	Japan	3	Nakamura <i>et al.</i> , 2006
Bat	Germany	/	Drexler <i>et al.</i> , 2012
	Bulgaria	/	
	Ghana	/	
	Panama	/	
Bird	Australia	/	Payne <i>et al.</i> , 1999
	USA	/	Sun <i>et al.</i> , 2004
	Taiwan	/	Hsu <i>et al.</i> , 2014
	China	/	Zhao <i>et al.</i> , 2013
	Korea	/	Kwon <i>et al.</i> , 2012
	Spain	/	Peralta <i>et al.</i> , 2009
	Hungary	/	Bányai <i>et al.</i> , 2012
	Russia	/	Sprygin <i>et al.</i> , 2012
Cutthroat trout	USA	/	Batts <i>et al.</i> , 2011

1.4 Le virus de l'hépatite E chez l'Homme

1.4.1 Répartition géographique

Outre les génotypes zoonotiques abordés en détail dans l'article de revue ci-dessus, deux génotypes se retrouvent exclusivement chez l'homme. Il s'agit des génotypes HEV-1 et 2. Même si, selon les régions et les situations socio-économiques, les génotypes retrouvés diffèrent, la distribution du HEV chez l'homme est mondiale. Plus spécifiquement, les génotypes HEV-1 et 2 se retrouvent essentiellement dans les pays dits en voie de développement, le génotype HEV-4 principalement en Asie et le génotype HEV-3 dans les régions dites développées du globe (Figure 2). La répartition géographique de ces différents génotypes est expliquée par le mode de transmission du virus qui est principalement dû au manque d'hygiène et à l'accès réduit à l'eau potable dans les régions où les génotypes HEV-1 et 2 sont endémiques (Asie, Afrique, Amérique du Sud), contrairement au mode de contamination zoonotique des génotypes HEV-3 et 4. Cependant, des cas sporadiques de HEV-1, 2 ou 4 sont régulièrement détectés dans les régions développées mais sont, pour la plupart, des cas importés (Kamar *et al.*, 2012).

1.4.2 Pathogénie et aspects cliniques

Le virus de l'hépatite E est identifié comme l'agent principal d'épidémies d'hépatites aiguës dans les pays en voie de développement et comme responsable de cas sporadiques d'hépatites aiguës dans les pays industrialisés chez des patients n'ayant pas d'antécédents de voyage en zone endémique (Meng, 2010). Le taux de mortalité dû à l'hépatite E est estimé de 0,1 à 4 % (Mast *et al.*, 1996). Les hépatocytes semblent être le site primaire de réplication du HEV. Le mécanisme d'altération hépatique est peu connu mais les lésions hépatiques seraient dues à la réponse immune et non à un effet cytopathogène du HEV (Rehermann and Nascimbeni *et al.*, 2005 ; Krawczynski *et al.*, 2011). La période d'incubation de l'infection varie de 3 à 6 semaines. Quatre semaines après l'infection apparaissent les IgM anti-HEV ; les IgG anti-HEV arrivent peu de temps après et le virus est indétectable dans le sang à partir de 6 semaines post-infection et dans les matières fécales à partir de 8 semaines (Bendall *et al.*, 2008). L'infection par le virus HEV peut prendre plusieurs formes chez l'homme. Tout d'abord, l'infection peut être asymptomatique, d'autre part, l'infection peut être symptomatique avec un tropisme plus élevé pour les adolescents, les jeunes adultes et la femme enceinte dans les pays dits en voie de développement et pour les individus masculins

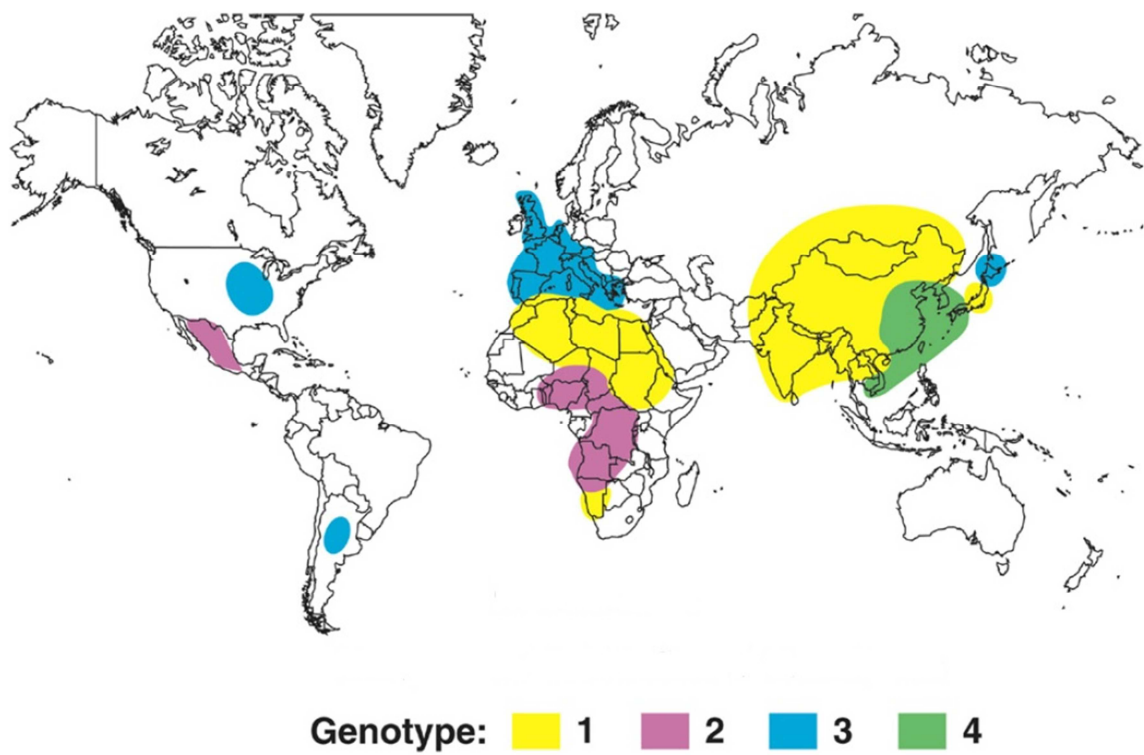


Figure 2. Répartition géographique des génotypes humains du virus de l'hépatite E (Purcell *et al.*, 2008)

d'âge mûr dans les pays développés (Mallet, 2015). Le tableau clinique chez le patient souffrant d'une hépatite aiguë causée par le HEV est similaire aux autres hépatites virales aiguës. Elle débute par une phase prodromique d'une dizaine de jours durant laquelle un syndrome pseudo-grippal peut apparaître. Durant la phase d'état, on retrouve de l'asthénie, de l'anorexie, des douleurs abdominales, de la fièvre, de l'hépatomégalie voire de la splénomégalie et de l'ictère. La guérison survient après 2 à 5 semaines. Au niveau du système porte hépatique, des infiltrats de lymphocytes, de plasmocytes, d'histiocytes, de neutrophiles et d'éosinophiles sont observés lors d'infection. Des agrégats de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages sont également observés dans le parenchyme hépatique (Malcolm *et al.*, 2007 ; Peron *et al.*, 2007). Des formes sévères avec des hépatites fulminantes peuvent cependant être observées, en particulier chez la femme enceinte durant le 3^{ème} trimestre de grossesse et le taux de mortalité peut alors atteindre 20 à 30 % chez ces femmes avec un risque de transmission verticale (1/3 des cas) et un taux de mortalité infantile de 10 à 15 %. Ces cas d'hépatites fulminantes n'ont été rapportés, jusqu'à présent, que dans les régions dans lesquelles sévissent, de façon majoritaire, les génotypes 1 et 2 (Turner *et al.*, 2010 ; Anty *et al.*, 2012). D'autre part, des formes chroniques d'hépatite E définies par la persistance d'une virémie pendant plus de 6 mois, sont possibles en cas d'immunodépression. Les personnes à risque de développer une infection chronique sont les patients ayant subi une transplantation rénale, pancréatique ou hépatique (Halleux *et al.*, 2011; Legrand-Abravanel *et al.*, 2011), ceux souffrant d'une pathologie hématologique telle qu'un lymphome ou une leucémie et les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine. Une évolution vers une cirrhose a également été décrite chez certains patients. Ces formes chroniques d'hépatite E sont principalement rencontrées dans les régions dites développées du globe (Aggarwal, 2011a; Miyamura, 2011). Le HEV a été associé à certains troubles neurologiques tels que le syndrome de Parsonage-Turner ou l'amyotrophie névralgique (Kamar *et al.*, 2012).

1.4.3 Situation en Belgique

Depuis 2008, l'Institut Scientifique de Santé Publique de Bruxelles (ISP, Centre National de Référence pour les hépatites virales) effectue le diagnostic d'infection par le HEV. Le nombre de demandes de diagnostic de cas d'infections au HEV est en augmentation ces dernières années (Figure 3). En 2014, 1104 sérums de patients ont été envoyés à l'ISP pour diagnostic d'hépatite E. L'hépatite E a pu être diagnostiquée chez 36 patients (3,3 %) par détection d'ARN et/ou d'IgM anti-HEV (ELISA + Western blot). Au total, 15, 12 et 9 cas ont été observés respectivement en Flandre, en Wallonie et à Bruxelles. Le génotype et le

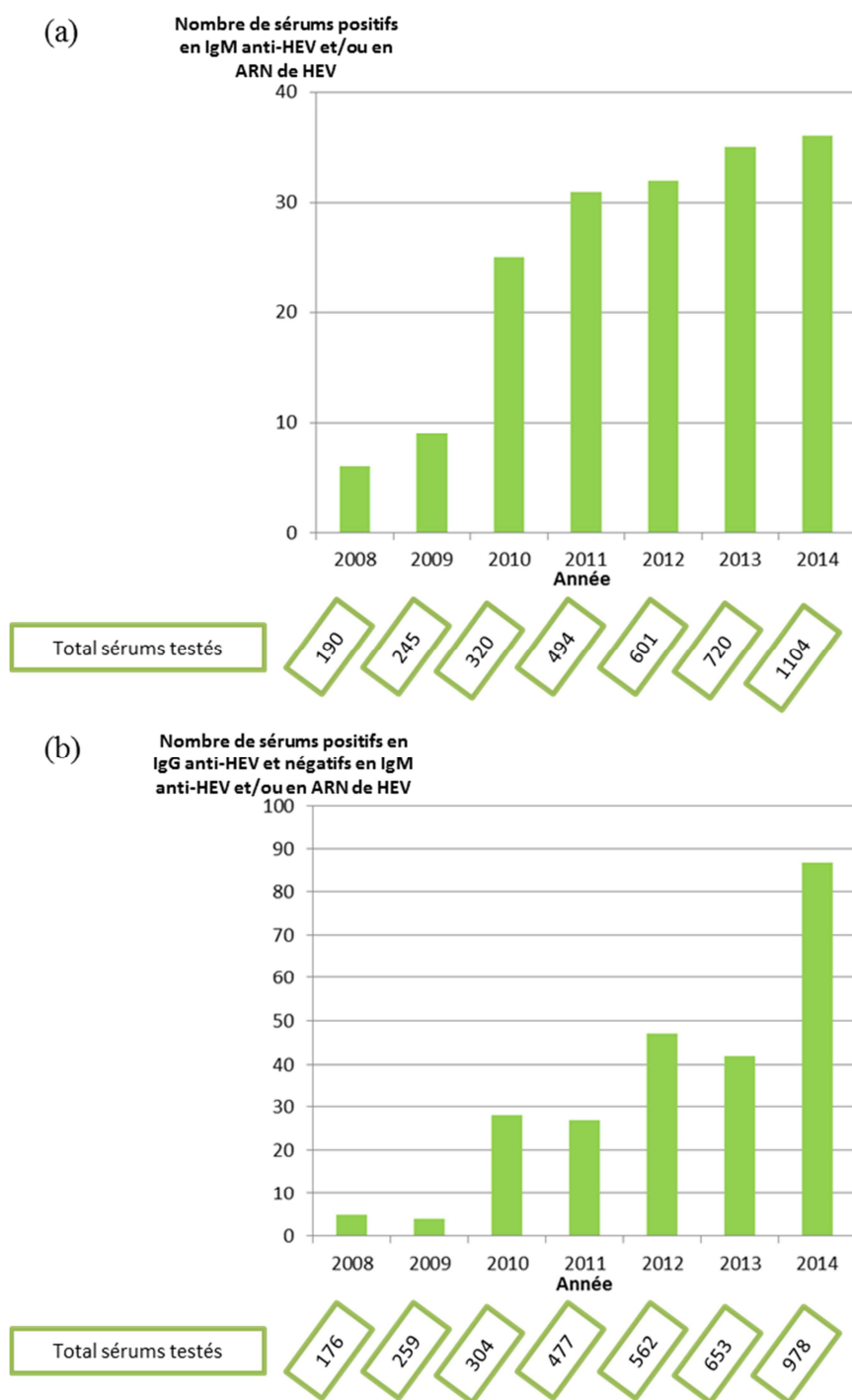


Figure 3. Evolution annuelle du nombre de cas d'hépatite E diagnostiqués à l'Institut Scientifique de Santé Publique.

(a) Infections récentes par détection d'ARN de HEV (PCR) et/ou d'IgM anti-HEV (ELISA + Western blot).

(b) Infections anciennes par détection d'IgG anti-HEV (ELISA) mais négatifs en IgM anti-HEV et/ou en ARN de HEV.

sous-type ont pu être déterminés par séquençage chez 15 de ces 36 cas. Les génotypes HEV-3b, 3c, 3e et 3f ont été identifiés chez respectivement 1, 4, 1 et 9 patients. En Belgique, aucune étude de séroprévalence n'a jusqu'ici été réalisée dans la population générale ou dans des groupes à risque. Mais à titre indicatif, en 2014, 87/ 978 (8,9 %) patients non atteints d'hépatite E récente (négatifs en IgM et/ou ARN viral) étaient positifs envers les IgG anti-HEV. Une seule étude rapporte des données de séroprévalence chez l'homme en Belgique : elle a été menée en Flandre Orientale et en Flandre Occidentale sur 50 patients hommes et 50 patientes femmes échantillonnés respectivement dans un service d'orthopédie et de gynécologie. La séroprévalence observée était de 14 % (Van Hoecke *et al.*, 2012). Même si ces données ne sont pas représentatives d'une prévalence de l'infection dans la population belge, elles représentent les seules valeurs dont nous disposons à l'heure actuelle. Malgré l'importance potentielle de la maladie en termes de santé publique, la surveillance de l'infection par le HEV en Belgique n'est pas organisée. De plus, elle présente un biais important car les infections asymptomatiques ne sont pas détectées et les résultats obtenus par l'ISP sont dépendants des échantillons que les médecins et laboratoires envoient. Au vu du manque de données de prévalence exploitables en Belgique, il est impossible, actuellement, de savoir si une différence existe entre les régions du pays en termes d'infection humaine.

1.5 Diagnostic de laboratoire

Chez l'homme, la première étape du diagnostic consiste à réaliser un screening sérologique à l'aide d'un test immuno-enzymatique (ELISA). Les cas positifs en ELISA sont ensuite confirmés par Western blot afin de détecter les Immunoglobulines G (IgG) et les IgM anti-HEV dans le sérum et de différencier les infections précoces des anciennes (Figure 4). Une attention particulière doit être donnée aux individus immunodéprimés chez qui la sensibilité des tests sérologiques peut être diminuée (Izopet *et al.*, 2015). Une détection moléculaire est également effectuée à l'aide de techniques de RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*) capables de détecter les différents génotypes du virus et un génotypage est ensuite effectué par séquençage. Un patient infecté par le HEV est défini comme positif en IgM anti-HEV et/ou positif en RT-PCR. Un algorithme diagnostique d'une hépatite E aiguë a été proposé par Izopet et collaborateurs (Figure 5) (Izopet *et al.*, 2015). Des données cliniques et épidémiologiques sont récoltées pour chaque patient telles que les antécédents de voyages en région hyperendémique, de transfusion sanguine, de

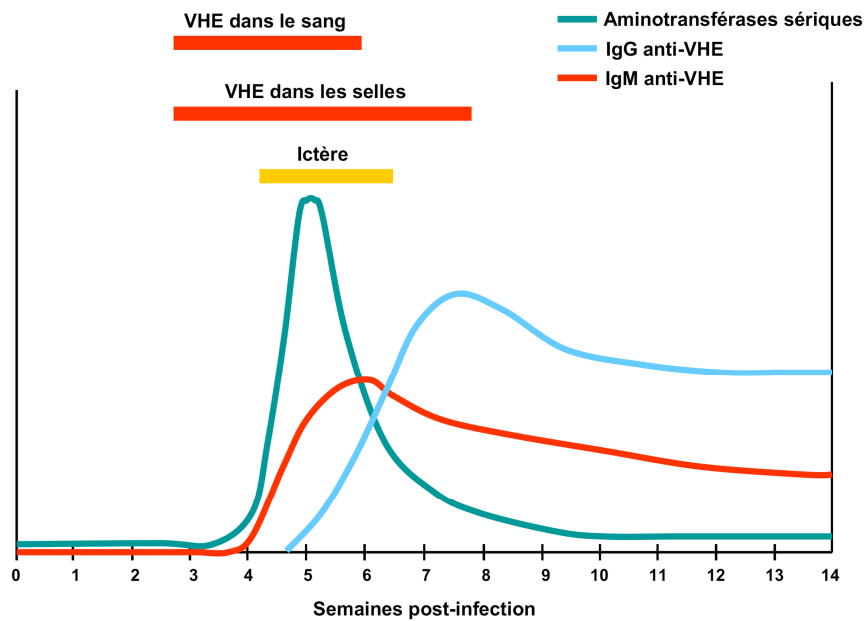


Figure 4. Profil sérologique d'une infection par le virus de l'hépatite E chez l'homme (Izopet *et al.*, 2015)

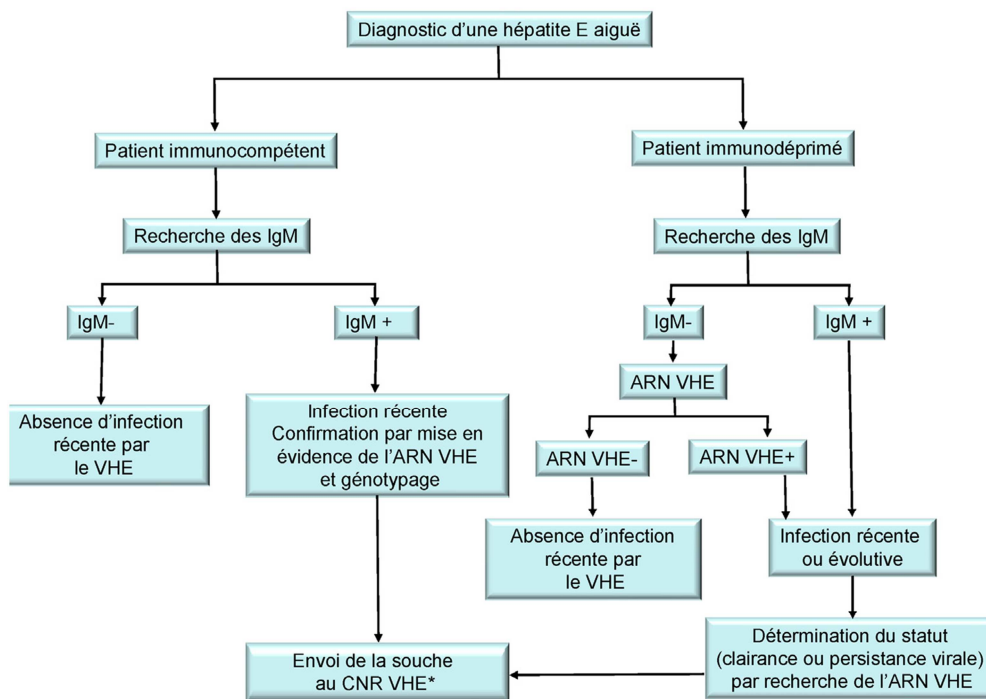


Figure 5. Algorithme diagnostique d'une hépatite E aiguë (Izopet *et al.*, 2015)

transplantation d'organe, de dialyse, la profession, l'ingestion de denrées alimentaires à base de foie de suidé et l'accomplissement d'activités telles que la chasse.

1.6 Traitement - Prophylaxie

Les patients atteints d'une hépatite E guérissent généralement spontanément lorsqu'elle est aiguë. En cas de signes cliniques, le traitement est essentiellement symptomatique. Certaines molécules anti-virales telles que la ribavirine ou l'interféron pégylé ont été testées sur des cas chroniques (Aggarwal, 2011b). Même si le mécanisme d'action de la ribavirine sur le HEV n'est pas encore connu, quatre hypothèses ont été proposées : la modulation du pool des nucléotides intracellulaires, l'inhibition de la polymérase virale, l'accumulation de mutations diminuant l'infectiosité dans le génome viral et l'amélioration de la réponse immune de l'individu (Izopet *et al.*, 2015). Cette molécule représente donc le traitement de choix en cas d'infection chronique ou de manifestations extra-hépatiques (neurologiques, rénales, hématologiques) liées au HEV (Kamar *et al.*, 2015).

En ce qui concerne la prévention, cuire la viande de porc, de cerf ou de sanglier à 191°C durant 5 minutes ou la faire bouillir inactive le virus (Feagins *et al.*, 2008a). Une autre étude indique qu'il faut chauffer la viande de porc à 71°C à cœur et pendant 20 minutes pour inactiver complètement le virus (Barnaud *et al.*, 2012). Les règles d'hygiène élémentaires personnelles permettent de prévenir un grand nombre d'infections. Une désinfection avec des désinfectants usuels pour les virus entériques est également efficace (hypochlorite de sodium, glutaraldéhyde).

En ce qui concerne la vaccination, deux vaccins ont passé avec succès les phases 2 et 3 de développement des vaccins. Jusqu'à il y a peu, ces vaccins n'étaient pas commercialisés faute, certainement, d'attrait commercial. Une firme chinoise (Xiamen Innovax Biotech) distribue depuis le mois de mars 2012 un vaccin sous le nom de Hecolin (Kamili, 2011 ; Zhu *et al.*, 2010). L'administration de ce vaccin se fait en 3 doses à 0, 1 et 6 mois. Même si aucune étude n'a encore été réalisée en ce sens, il est possible que ce vaccin confère une protection croisée contre les virus des 4 géotypes humains (WHO, 2015).

Chapitre 2. Objectifs

Les *Hepeviridae* forment une famille de virus largement répandus à travers le monde. L'homme peut être infecté par différents génotypes (HEV-1, 2, 3 et 4), les HEV-1 et 2 (non étudiés dans le cadre de ce travail), sont endémiques dans les pays en voie de développement et peuvent être responsables de cas importés en Europe. L'homme peut également être infecté par les génotypes indigènes HEV-3 et plus rarement 4. Le caractère zoonotique des génotypes HEV-3 et 4 est avéré et la faune sauvage (cervidés et sangliers) et le porc domestique sont particulièrement mis en cause. La question du rôle joué par certaines espèces animales (essentiellement les suidés et cervidés) comme réservoir dans nos régions trouve donc tout son sens. Ces données soulignent l'importance d'étudier cette infection virale chez ces différentes espèces.

Dans ce cadre, le travail de thèse a consisté à étudier le rôle des suidés domestiques et sauvages et des cervidés comme réservoir de HEV, impliqués dans la transmission du virus à l'homme. La transmission via les denrées alimentaires est décrite mais la question reste posée en ce qui concerne la transmission non alimentaire. En effet, le caractère zoonotique est vraisemblablement sous-estimé du fait que les animaux ne présentent pas de signes cliniques lors de l'infection et que de nombreuses infections humaines sont inapparentes.

Le premier objectif de ce travail a été d'étudier l'infection par le HEV dans les espèces animales susceptibles de transmettre le virus à l'homme dans nos conditions et de comparer, phylogénétiquement, les souches obtenues chez l'homme en Belgique aux souches animales. Ce premier volet a permis de préciser le rôle que représentent l'espèce porcine et les animaux de la faune sauvage dans la transmission zoonotique du HEV à l'homme.

Ce premier objectif comprend trois composantes : l'infection dans la faune sauvage, chez le porc domestique et chez l'homme. Les souches de HEV circulant chez l'homme et les animaux en Belgique ont été caractérisées génétiquement et le rôle joué par la faune sauvage en termes de portage et de réservoir a été analysé par des études de prévalence sérologique et virologique.

Le deuxième objectif de ce travail a consisté à étudier le comportement de souches de HEV isolées au cours des études épidémiologiques réalisées sur la faune sauvage et le porc domestique dans un modèle porcin *in vivo*.

Afin de mieux comprendre cet aspect zoonotique, un modèle porcin d'infection expérimentale par le HEV a été utilisé pour étudier la pathogénie d'une souche sauvage de HEV de sanglier inoculée par voie intraveineuse. Ce modèle a également été utilisé dans un second temps pour étudier et comparer la pathogénie d'une souche sauvage de HEV de sanglier, d'une souche de HEV de sanglier préalablement passée en modèle porcin (via inoculation intraveineuse) et d'une souche de HEV de porc inoculée par voie orale, voie représentant la transmission naturelle du virus. Ces expériences *in vivo* ont permis de mesurer les charges virales présentes dans les différents tissus et organes de porcs se retrouvant dans les denrées alimentaires.

L'étude de l'infection de populations animales par le HEV a contribué à caractériser les dangers auxquels s'exposent les populations humaines, particulièrement celles à risque (femmes enceintes, individus immunodéprimés ou avec hépatopathie sous-jacente) en Belgique.

Chapitre 3. Section expérimentale

3.1 Mise au point des techniques

Ce premier point aborde la présentation des principales techniques qui ont été utilisées de manière régulière dans le chapitre 3.

La RT-PCR nichée utilisant les couples d'amorces 3156/3157 et 3158/3159 (Huang *et al.*, 2002a ; Cooper *et al.*, 2005) a été choisie pour les études épidémiologiques car elle a donné les meilleurs résultats après différents essais sur échantillons de statut connu. L'optimisation de cette RT-PCR aurait été idéale si les tests avaient été réalisés sur des échantillons animaux, mais ceux-ci faisant défaut au début du projet, la mise au point a été basée sur des échantillons humains positifs envers le HEV. Elle a, de plus, été utilisée dans différentes études sur des porcs (Bouwknegt *et al.*, 2009; van der Poel *et al.*, 2001). Cette RT-PCR nichée amplifie une séquence de 348 pb dans l'ORF2. Cette dernière permet la classification des virus détectés en génotype et sous-type. Cette technique a donc été préférée à la RT-PCR en temps réel pour les analyses épidémiologiques. Chaque réaction consistait en une étape de RT à 45 °C pendant 45 min, suivie d'une étape de dénaturation initiale de 2 min à 94 °C puis de la PCR : 40 cycles de 1 min à 94 °C de dénaturation, de 45 s à 47 °C d'hybridation, suivie par 45 s d'élongation à 68 °C et d'une étape d'élongation finale de 7 min à 68 °C. La seconde PCR consistait en une étape de dénaturation initiale de 2 min à 94 °C, suivie par 40 cycles de 1 min à 94 °C, 45 s à 47 °C et 45 s à 72 °C. Cette PCR se terminait avec une élongation finale de 7 min à 72 °C.

Une RT-PCR en temps réel amplifiant un fragment de 69 pb dans l'ORF3 (Jothikumar *et al.*, 2006) a été, par la suite, optimisée et utilisée dans le cadre des expériences *in vivo* où une quantification était nécessaire. Chaque réaction consistait en une étape de RT à 50 °C pendant 10 min, suivie d'une étape de dénaturation initiale de 5 min à 95 °C puis de la PCR : 40 cycles de 10 s à 95 °C de dénaturation et de 30 s à 60 °C d'hybridation et d'élongation. Une courbe standard à ADN a été réalisée à partir d'un plasmide pGEMtEasy contenant une séquence de 69 pb d'un HEV isolé durant cette étude à partir d'un foie de sanglier. La transcription inverse nécessaire à l'obtention de l'ADN viral complémentaire et les étapes d'amplification se faisaient successivement au sein d'un même puits, grâce à l'élaboration d'un milieu réactionnel contenant les constituants indispensables au déroulement de ces deux étapes. Le kit utilisé était l'« iScript One Step RT-PCR » de Biorad®.

Afin de contrôler les étapes d'extraction d'ARN, un contrôle interne a été inséré. Pour cela, des stocks de la souche WU20 du norovirus murin ont été produits et 10 µl de ce virus ont été ajoutés à chaque échantillon avant chaque extraction réalisée dans cette étude. Comme

les *Hepeviridae* étaient anciennement classés au sein de la famille des *Caliciviridae* et partagent beaucoup de caractéristiques avec les norovirus, le norovirus murin constitue un excellent contrôle interne. Cependant, ce contrôle interne ne permet pas de tenir compte de l'effet de la matrice sur l'échantillon. La RT-PCR en temps réel utilisée amplifie un fragment d'environ 84 pb du début de l'ORF1 du génome du norovirus murin (Mathijs *et al.*, 2010).

Concernant les ELISA, deux trousse ont montré des performances similaires dans le cadre de leur utilisation avec des sérums de suidés aimablement fournis par le Professeur W. Van der Poel de l'Université de Wageningen et provenant d'une expérience *in vivo*. La trousse retenue pour ce travail a déjà été utilisée par d'autres équipes avec succès, ce qui n'avait pas été décrit pour l'autre test (Bouwknegt *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2008 ; Rutjes *et al.*, 2010). Ces trousse avaient d'abord été optimisées pour la sérologie humaine (Hu *et al.*, 2008; Yarbough *et al.*, 1994) et leur utilisation a été par la suite étendue à un usage vétérinaire. L'ELISA utilisé est un ELISA sandwich double antigène qui ne requiert pas l'utilisation d'un anticorps anti-Ig et permet donc son usage chez le porc, le sanglier et le cerf sans distinction d'espèce. Le choix s'est porté sur le test de la firme MP Biomedical car il s'est révélé être plus rapide et plus simple d'utilisation avec une diminution du risque de contamination. De plus, ce test avait déjà été utilisé dans d'autres travaux (Rutjes *et al.*, 2010 ; Bouwknegt *et al.*, 2009 ; Hu *et al.*, 2008).

Un Western blot (WB) commercial (recomLine HEV IgG / IgM, Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany) a été adapté. L'analyse des strips donne un score compris entre 0 et 11 (≤ 2 = négatif ; 3 = douteux ; ≥ 4 = positif). Tous les scores ont été calculés à l'aveugle par le même chercheur. Chaque strip contient une bande de contrôle de réaction, une bande de contrôle de la classe d'anticorps et une bande seuil. Il a été utilisé dans ce travail pour préciser le moment de la commutation isotypique au cours d'expériences *in vivo* et pour réévaluer les valeurs de séroprévalences obtenues par le test ELISA dans les populations animales étudiées. Le WB est utilisé comme test de confirmation dans les analyses sérologiques chez l'homme étant donné sa spécificité plus élevée. Il a été précédemment utilisé pour estimer la séroprévalence réelle dans des populations humaines avec différents degrés d'exposition aux porcs (Bouwknegt *et al.*, 2008a). Aussi, dans notre étude, le WB a également été utilisé comme test de confirmation. En effet, au cours de l'étude, les séroprévalences très élevées, observées en particulier chez le porc, ont nécessité une validation supplémentaire du test ELISA qui n'avait, jusqu'à présent, été étudiée de manière

critique que par Rutjes et collaborateurs (2010) en adaptant le seuil de positivité. Ce Western blot est conçu à la base pour détecter des antigènes de HEV de géotypes HEV-1 et 3 chez l'homme. Des tests d'adaptation ont été réalisés préalablement à son utilisation chez les suidés avec différentes dilutions d'un conjugué fabriqué à partir d'anticorps polyclonaux secondaires de chèvre couplés à la peroxydase et dirigés contre les IgG ou IgM de porc (Abcam, Cambridge, Royaume-Uni) sur des sérums séropositifs obtenus de porcs infectés expérimentalement par le Professeur Van der Poel de l'Université de Wageningen et des sérums provenant de porcelets exempts d'organismes pathogènes spécifiques (EOPS) (Dr Cariolet, Anses, Ploufragan). Une fois adapté aux suidés, le test a permis la détection d'anticorps dirigés contre le géotype HEV-3 mais aussi le HEV-4 chez le porc, ce qui est vraisemblablement dû à des réactions croisées avec la partie C-terminale de la protéine de capsid de virus de géotypes 1 et 3. Des IgG dirigées contre les Ig de cervidés et couplées à la peroxydase ont été utilisées (KPL, Gaithersburg, Maryland, USA), l'absence de disponibilité de sérums de cervidés de référence n'a pas permis la vérification de leur spécificité.

3.2 Etude 1 :

Estimation de la séroprévalence du virus de l'hépatite E (HEV)
chez le porc par ELISA et Western blot et comparaison de séquences
de HEV porcines et humaines détectées en Belgique

PREAMBULE

La transmission zoonotique du HEV est particulièrement mise en cause dans les pays développés dans lesquels la transmission via les eaux usées est beaucoup moins fréquente que dans les pays en voie de développement. Des séroprévalences élevées sont observées chez certaines espèces animales dans plusieurs pays européens. Les buts de cette première étude étaient d'obtenir des données quant à la séroprévalence et la viroprévalence du HEV chez le porc et de comparer la phylogénie des séquences obtenues chez l'homme et le porc en Belgique.

Pour cela, 420 sérums de porcs âgés de plus de 1 an ont été échantillonnés en vue de réaliser les analyses sérologiques. Un autre échantillon de 420 sérums de porcelets de moins de 6 mois a été constitué pour les analyses virologiques.

Une séroprévalence obtenue suite au screening par ELISA de 73 % (95 % CI 68,8 – 77,5) a été observée chez les porcs en Belgique et une proportion de ces sérums séropositifs ont été également testés par Western blot. Une analyse par courbe ROC a également été réalisée et différents scénarios faisant varier la spécificité de l'ELISA par rapport au WB ont été analysés. Les séroprévalences estimées en fonction des différents scénarios étaient comprises entre 69 et 81 % et sont en accord avec les degrés élevés d'exposition au HEV au sein des populations porcines en Europe. Les séquences de HEV porcines ont été génétiquement comparées à celles retrouvées chez l'homme en Belgique et une prédominance de génotype 3 sous-type f a été observée chez ces deux espèces.

La séroprévalence élevée détectée chez le porc et les relations phylogénétiques étroites existant entre les séquences de HEV retrouvées chez le porc et chez l'homme représentent des arguments supplémentaires quant à la transmission zoonotique du HEV entre ces deux espèces.

Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium

Veterinary Microbiology (2014)

Damien Thiry ⁽¹⁾, Axel Mauroy ⁽¹⁾, Claude Saegerman ⁽¹⁾, Isabelle Thomas ⁽²⁾, Magali Wautier ⁽²⁾, Cora Miry ⁽³⁾, Guy Czaplicki ⁽⁴⁾, Dirk Berkvens ⁽⁵⁾, Nicolas Praet ⁽⁵⁾, Wim van der Poel ⁽⁶⁾, Roland Cariolet ⁽⁷⁾, Bernard Brochier ⁽²⁾, Etienne Thiry ⁽¹⁾

(1) University of Liège, Liège, Belgium

(2) Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

(3) Dierengezondheidszorg Vlaanderen, Torhout, Belgium

(4) Regional Agency for Animal Health and Identification, Loncin, Belgium

(5) Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

(6) Central Veterinary Institute, Wageningen University Research, AB Lelystad, the Netherlands

(7) ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Ploufragan, France



Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium



Damien Thiry^a, Axel Mauroy^a, Claude Saegerman^b, Isabelle Thomas^c, Magali Wautier^c, Cora Miry^d, Guy Czaplicki^e, Dirk Berkvens^f, Nicolas Praet^f, Wim van der Poel^g, Roland Cariolet^h, Bernard Brochier^c, Etienne Thiry^{a,*}

^a Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

^b Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Science (UREAR-ULg), Department of Infectious and Parasitic Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium

^c National Reference Centre for Hepatitis viruses, Viral Diseases, Operational Directorate Communicable and Infectious Diseases, Scientific Institute of Public Health, B-1050 Brussels, Belgium

^d Veterinary Pathology, Dierengezondheidszorg Vlaanderen, B-8820 Torhout, Belgium

^e Department of Animal Health, Regional Agency for Animal Health and Identification, B-4431 Loncin, Belgium

^f Unit of Veterinary Helminthology, Department of Biomedical Sciences, Institute of Tropical Medicine, B-2000 Antwerp, Belgium

^g Division Virology, Central Veterinary Institute, Wageningen University Research, NL-8200 AB Lelystad, the Netherlands

^h Department of Production of Specific Pathogen-Free Decontaminated Pigs and Experimentation, Ploufragan/Plouzané Laboratory, Anses, BP 53, F-22440 Ploufragan, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 22 February 2014

Received in revised form 26 May 2014

Accepted 3 June 2014

Keywords:

Hepatitis E virus

Swine

Belgium

Prevalence

Phylogeny

Zoonosis

ABSTRACT

Zoonotic transmission of hepatitis E virus (HEV) is of special concern, particularly in high income countries where waterborne infections are less frequent than in developing countries. High HEV seroprevalences can be found in European pig populations. The aims of this study were to obtain prevalence data on HEV infection in swine in Belgium and to phylogenetically compare Belgian human HEV sequences with those obtained from swine. An ELISA screening prevalence of 73% (95% CI 68.8–77.5) was determined in Belgian pigs and a part of the results were re-evaluated by Western blot (WB). A receiver operating characteristic curve analysis was performed and scenarios varying the ELISA specificity relative to WB were analysed. The seroprevalences estimated by the different scenarios ranged between 69 and 81% and are in agreement with the high exposure of the European pig population to HEV. Pig HEV sequences were genetically compared to those detected in humans in Belgium and a predominance of genotype 3 subtype f was shown in both swine and humans. The high HEV seroprevalence in swine and the close phylogenetic relationships between pig and human HEV sequences further support the risk for zoonotic transmission of HEV between humans and pigs.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Hepatitis E virus (HEV) belonging to the family *Hepeviridae*, genus *Hepevirus*, is a small, non-enveloped

virus with a single-stranded, positive sense RNA genome of approximately 7.2 kb (Emerson and Purcell, 2003).

There are four genotypes of HEV recognized and only one serotype (Engle et al., 2002 and Emerson et al., 2004). The genetic variability of HEV is revealed by the presence of quaspecies and recombinants (van Cuyck et al., 2005

* Corresponding author. Tel.: +32 0 43664263; fax: +32 0 43664261.
E-mail address: etienne.thiry@ulg.ac.be (E. Thiry).

and Lhomme et al., 2012). Genotypes 1 and 2 include only human strains, while genotypes 3 and 4 have been detected in humans and animals like swine. Furthermore hepeviruses are being detected in an increasing number of animal species (Meng, 2011). Genotypes 1 and 2 are mainly present in developing countries; genotype 3 is mostly present in industrialized countries and genotype 4 in Asian countries. Direct zoonotic transmission of symptomatic HEV from infected meats to human being was documented only two times (Tei et al., 2003 and Li et al., 2005). However, numerous indirect evidences of zoonotic transmission of HEV exist and transmission between pigs, wild boar or deer and humans is of particular concern (Teo, 2010 and Meng, 2011). Belgium represents a European federal country with a high density of swine (207/km²) concomitant with a high density of inhabitants (355/km²). In 2010 and 2011, respectively 23 out of 320 sera and 30 out of 494 sera submitted for HEV diagnosis to the National Reference Laboratory were detected seropositive (unpublished data). In a sample of one hundred patients presenting at the gynecological or orthopedic clinics in Belgium, the anti-HEV IgG seroprevalence was found to be 14% (Van Hoecke et al., 2012). In 2009, the Belgian swine population was 6,321,055 distributed between 6,161 farms. In that year, the Flemish Region had 5,933,238 pigs and the Walloon Region only 387,815 pigs. In surrounding countries like the Netherlands, Germany and France, the presence of HEV has already been documented. A French study of 6,565 sera samples from pigs at the age of slaughter sampled in 186 farms indicated farm and individual seroprevalences of respectively 65% and 31% (Rose et al., 2011). In Germany, an individual seroprevalence of 49.8% was shown in 1,072 sera samples from pigs (Baechlein et al., 2010), another study showed an individual seroprevalence of 46.9% in 2200 sera (Krumbholz et al., 2013), while another study in the Netherlands showed an individual seroprevalence of 68% (88/130), using the same kit as the one in the present study (HEV ELISA kit 4.0 V, MP Biomedicals, Illkirch, France) (Rutjes et al., 2010). In Northern Italy, a survey showed an individual seroprevalence of 87% (40/46) (Di Bartolo et al., 2011).

This study aims to investigate the HEV seroprevalence as well as to detect and genotype HEV in the Belgian swine population and to genetically compare the sequences identified in animals with contemporary human ones. In the absence of a reference test assessing HEV antibodies, two tests, ELISA and Western blot (WB), are usually used for human samples (Haagsman et al., 2007). In veterinary medicine, only one ELISA test is usually applied as a screening test because it is performed on large animal populations, especially here in pigs. Therefore, the second aim of this study is the assessment of the ELISA results with WB and the analysis of different scenarios varying ELISA specificity relative to WB.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

Sampling was carried out in the pig serum banks made by the regional animal health laboratories in Belgium

between September 2010 and October 2011. Sampled farms were selected based on the availability of 6 sera from fattening pigs weighing less than 80 kg (for an age estimate of between 2 and 6 months) and 6 sera from lactating sows (aged over one year). A total of 50 and 20 farms were selected respectively in the Flemish Region (September and October 2010) and in the Walloon Region (November 2010–October 2011) as the distribution of the swine population is heterogeneous between the two regions.

In total, 420 serum samples of fattening pigs aged less than 6 months were used for virological studies and 420 serum samples of lactating sows for serological testing. The sample size ($N = 420$ pigs) was calculated by applying the binomial law (for an expected prevalence of 30% with an absolute error of 5% and a confidence interval of 95%) (Thrusfield et al., 2001).

For the measurement of seroprevalence, the case definition was a lactating sow possessing antibodies against HEV at a level detectable by the antibody ELISA described below.

Nine human positive serum samples, from the bank of serum of hepatitis E cases of the Belgian National Reference Center for hepatitis viruses, obtained between 2009 and 2011, were available in sufficient amount and used for genetic comparison with swine samples (Fig. 1).

2.2. Antibody ELISA

A double antigen sandwich ELISA (das-ELISA) was used. This ELISA is capable of detecting IgM, IgG and IgA directed against HEV in all animal species and was developed strictly for veterinary use (HEV ELISA kit 4.0 V, MP Biomedicals, Illkirch, France) (Hu et al., 2008; Bouwknecht et al., 2009; Rutjes et al., 2010). A total of 420 samples from lactating sows were tested. In addition, 25 samples of SPF (specific pathogen free) piglets aged 2 months and born in Biosafety Level 3 facilities, and 5 positive sera from experimental infections of pigs, were tested in duplicate as negative and positive controls, respectively. From the 5 positive control, 3 were strongly positive (1 genotype 4 and 2 genotype 3) and 2 were weakly positive (genotype 3) (categorisation based on optical densities obtained in ELISA performed in the providing laboratory).

2.3. Western blot

A WB for the detection of antibodies (Ab) against HEV in humans (recomLine HEV IgG/IgM, MIKROGEN DIAGNOSTIK, Neuried, Germany) was adapted for use with pigs by replacing the conjugate of the kit (anti-human IgG - peroxidase) with a conjugate made from a secondary goat polyclonal Ab, reactive against pig IgG and coupled to peroxidase (Abcam, Cambridge, United-Kingdom). Recombinant antigens used in this kit were: N-terminal and C-terminal parts of the open reading frame (ORF) 2, the entire ORF3 of genotypes 1 and 3, and the middle part of the ORF2 genotype 1. Analysis of the test strips gave a score of between 0 and 11 (≤ 2 = negative; 3 = borderline; ≥ 4 = positive). All scores were blindly calculated by the same researcher. Each strip contained a reaction control band, an antibody class control band and a cut-off (CO)

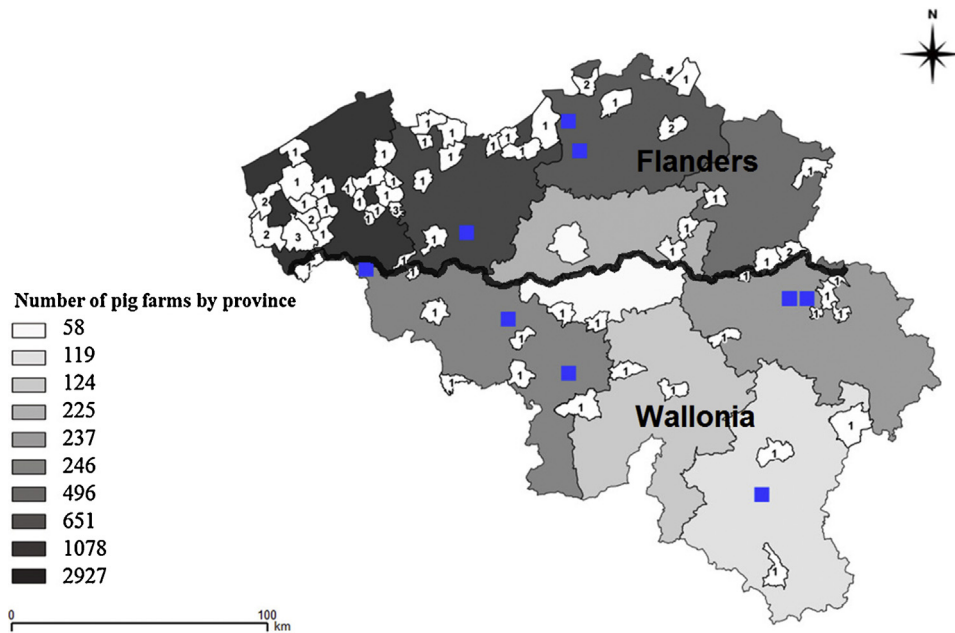


Fig. 1. Distribution of pig farms sampled in Belgium; 50 farms in the Flemish region and 20 farms in the Walloon region according to the swine population density.

Small white areas: commune where sampling were done with number of sampled pig farm.

■: Localisation of human cases.

(Map made with Quantum GIS–QGIS Development Team, 2012. QGIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>).

control band. Tests were performed with a 1/1000 dilution of conjugate. Three sera from infected pigs and 3 sera from SPF piglets were tested as positive and negative controls, respectively. A total of 98 sera from swine were tested with this IgG WB. Four classes were defined according to the optical density (OD) averages obtained by ELISA: the first class included an OD ranging from 0 to 0.15, the second an OD from 0.15 to 0.27, the third an OD from 0.27 to 1 and the fourth ≥ 1 (Table 1). One serum of each of the first 2 classes (ELISA negative) and 4 sera from each of the last 2 classes (ELISA positive) were selected in each of the 10 ELISA plates and were tested in WB. The tests were carried out on a ProfiBlot T48 (TECAN, Mechelen, Belgium).

Table 1
Hepatitis E virus IgG Western blot (WB) results in pigs classified according to 4 ranges of hepatitis E virus ELISA optical density.

Class ^a	OD ^b ELISA range	Western blot ^c			Total
		+	Borderline	–	
1	[0–0.15[1	1	7	9
2	[0.15–0.27[5	2	3	10
3	[0.27–1[25	4	10	39
4	[1–5[38	0	2	40
Total		69	7	22	98

^aClasses 1 and 2 = ELISA negative results; classes 3 and 4 = ELISA positive results.

^b Optical density.

^c Positive: WB result with a score ≥ 4 ; Borderline: WB result with a score of 3; Negative: WB result with a score ≤ 2 .

Sera giving negative or borderline results in IgG WB and positive results in ELISA were tested for IgM with the same kit adapted for use with pigs by replacing the conjugate of the kit (anti-human IgM - peroxidase) with a conjugate made from a secondary goat polyclonal Ab, reactive against pig IgM and coupled to peroxidase (Abcam, Cambridge, United-Kingdom).

2.4. PCR

RNA extractions were performed with the QIAamp Viral RNA kit mini kit (QIAGEN, Antwerpen, Belgium) according to the manufacturer's recommendations. Internal control extraction was added to each sample. The volume of each sample was then 130 μ l, to which 10 μ l of murine norovirus (10^5 plaque forming units/ μ l) was added and the extractions were considered as successful in the presence of positive PCR results with this norovirus. Two negative controls (water) were included in each run of 24 extractions performed.

Nested RT-PCR was performed according to a protocol adapted from Huang et al. (Huang et al., 2002 and Cooper et al., 2005) and using primers 3156 (5'-AATTATGCY-CAGTAYCGRGTTG-3'), 3157 (5'-CCCTTRTCYTGCTGMG-CATTCTC-3'), 3158 (5'-GTWATGCTYTGATWCATGGCT-3') and 3159 (5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3') targeting a 348-bp region within the ORF2 gene.

Reverse transcription (RT) and external PCR steps were performed in one step with the AccessQuickTM RT-PCR System (Promega, Leiden, the Netherlands). Internal PCR

Tableau supplémentaire 1 : profils d'immunomarquage de protéines recombinantes de HEV en Western blot (WB) avec des sérums de porcs

Bandes*	Profils de WB																				
O2N Gt1	+	+	+	+	+	+	+														
O2N Gt3	+	+	+					+	+												
O2C Gt1	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+	+	+						
O2C Gt3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			+	+				
O2M										+					+						
O3 Gt1	+			+				+			+							+			
O3 Gt3	+	+		+	+		+				+	+				+		+			
Résultats en WB	+																Douteux		-		
Nombres de sérums	2	4	7	1	2	2	1	1	5	1	1	9	21	1	1	1	9	1	6	2	20

*Protéines recombinantes : extrémités N-terminales et C-terminales du cadre ouvert de lecture (ORF) 2 (O2N et O2C), de l'entièreté de l'ORF3 (O3) des génotypes 1 et 3 (Gt1 et Gt3), et de la partie centrale de l'ORF2 du génotype 1 (O2M)

was performed using the Taq DNA Polymerase kit with ThermoPol Buffer (New England BioLabs, Bioké, Leiden, the Netherlands).

Each reaction consisted of a RT step at 45 °C for 45 min, followed by an initial denaturation step of 2 min at 94 °C, followed by PCR: 40 cycles of 1 min denaturation at 94 °C, hybridization of 45 s at 47 °C, followed by 45 s of elongation at 68 °C and a final elongation step of 7 min at 68 °C. The second PCR consisted of an initial step of 2 min at 94 °C, followed by 40 cycles of 1 min at 94 °C, 45 s at 47 °C and 45 s at 72 °C. The PCR ended with a final extension of 7 min at 72 °C. Both RT and PCR reactions were performed on a thermocycler T3000 (Biometra, Goettingen, Germany).

2.5. Sequencing and phylogeny studies

The PCR products were analysed by electrophoresis on 2% agarose gel and were revealed by ethidium bromide staining under UV light. Bands at the expected molecular weight (348-bp) were excised and purified with the High Pure PCR Products Purification Kit (Roche Applied Science, Vilvoorde, Belgium). Positive amplicons were purified and cloned into pGEMt Easy vector (Promega, Leiden, the Netherlands) in order to have an optimal sequencing reaction. Sequencing reactions of one clone from each amplicon were carried out by GATC Biotech (Konstanz,

Germany) with the BigDye Terminator kit version 3.1 (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA) and resolved with an ABI 3730xl automatic capillary sequencer (AppliedBiosystems, Foster City, CA, USA). Nucleotide sequences were analysed and aligned with the ClustalW method within the BioEdit Sequence Editor version 7.0 software (Hall, 1999). Nucleotide similarity with the NCBI genetic database was assessed using the BLAST tool (available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Phylogenetic relationships were inferred with the MEGA version 5 software package (Tamura et al., 2011) with the maximum-likelihood method based on the Tamura-Nei substitution model (Tamura and Nei, 1993) and 1500 bootstrap replicates.

We deposited 9 HEV sequences from human in GenBank under accession no. KC961251 (BeHu1), KC961252 (BeHu2), KC961253 (BeHu3), KC961254 (BeHu4), KC961255 (BeHu5), KC961256 (BeHu6), KC961257 (BeHu7), KC961258 (BeHu8), KC989557 (BeHu9) and 4 HEV sequences from swine under accession numbers KC802217 (BeSwA78), KC802218 (BeSwB26), KC802219 (BeSwB27) and KC802220 (BeSwC52). Human and swine HEV RNA sequences of 302 nucleotides were analysed by using BioEdit and MEGA5, with a set of sequences available from GenBank, to determine genotypes and subtypes according to the classification of Lu et al. (2006).

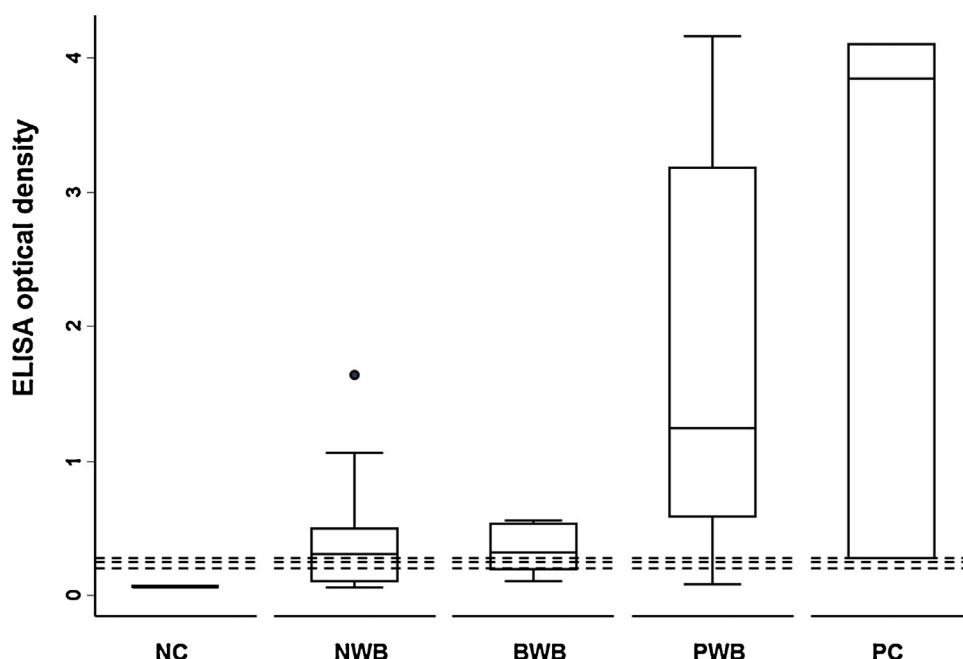


Fig. 2. Distribution of ELISA optical density value of serum samples classified according to the Western blot results.

NC: negative controls.

NWB: negative in Western blot.

BWB: borderline in Western blot.

PWB: positive in Western blot.

PC: positive controls.

—: The lower line represents the optimal cut off of 0.20 estimated by the ROC curve. The two upper lines are the 95 CI of the average of the cut offs calculated for 10 plates according to the producer (i.e. 0.27; 95% CI 0.26–0.29).

2.6. Statistical analysis

A 95% confidence interval (CI) of prevalence was estimated using an exact binomial distribution. Seroprevalences between the Flemish and Walloon Regions were compared using a χ^2 test. Three Receiver Operating Characteristic (ROC) curves with WB considered as the reference test were obtained, the first with the exclusion of the WB borderline data, the second including WB borderline data as positive results and the third with WB borderline data as negative results (StataCorp. 2011. Stata Statistical Software: Release 12. College Station, TX: StataCorp LP).

3. Results

3.1. ELISA screening prevalence of HEV infection in swine

The presence of HEV-specific antibodies was demonstrated by ELISA, using the cut off (CO) value obtained following the manufacturer's instructions and calculated for each plate. An individual seroprevalence of 73% (95% CI 68.8–77.5) was found in Belgium. The individual seroprevalence was significantly different between the two regions ($\chi^2 = 4.83$; 1 degree of freedom (df); $P = 0.03$): 66% (95% CI 56.6–74.2) in the Walloon Region and 76% (95% CI 71.1–81) in the Flemish Region. Moreover, 93% (95% CI 89–100) of the tested herds were found to contain at least one seropositive pig. All the SPF pig sera tested were negative. Of the 5 positive controls, the 3 previously determined strongly positive samples were positive and the 2 previously determined weakly positive ones were negative in our ELISA conditions.

3.2. Western blot analysis

A collection of 98 pig sera already analysed by ELISA and distributed in 4 classes was further analysed by a WB against IgG. The results are presented in Table 1 and Fig. 2. The 3 positive control sera were positive (genotype 3 and 4) and the 3 negative control sera were negative. The 16 out of 98 sera showing discrepant results (positive results with the ELISA and negative or borderline results with the IgG WB) were tested with the IgM WB, and all the results

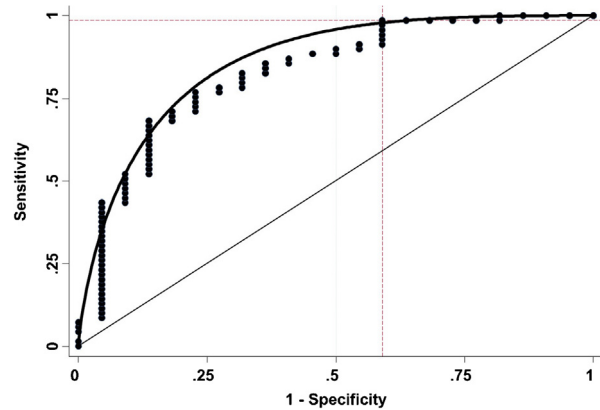


Fig. 3. Receiver operating characteristic-curve (ROC-curve) of the ELISA data versus Western blot as reference test after exclusion of the borderline data. Area under curve = 0.8590; standard error (area) = 0.0997; .: Fitted ROC curve;

•: Observed values of the ROC curve; —: Intersection between horizontal and vertical lines is the optimal cut off (0.20) (based on observed data).

were negative. These data were obtained in order to use WB as a reference test in the following ROC curve analysis.

3.3. ROC curve analysis

The high ELISA screening prevalence in the pig population needed to be carefully assessed. Therefore the CO value was re-evaluated by a ROC curve analysis using WB as the reference test, and different scenarios were analysed. Three ROC curves were compared depending on the inclusion of WB borderline data as positive or negative or after exclusion of these data. No significant difference was shown between the three ROC curves (data not shown). The ROC curve using the WB data after exclusion of the borderline data is shown in Fig. 3 and the optimal CO point is at 0.20. Table 2 gives the results of an analysis of different scenarios either using the CO values obtained by the ROC curve or by the ELISA, or varying ELISA specificity relative to WB. Whatever the scenario, the seroprevalence remained high, from 58 to 77% for the

Table 2

Estimation of hepatitis E virus seroprevalence in the Belgian pig population. Analysis of 3 scenarios varying ELISA specificities relative to WB. The two first lines show the parameters estimated for the optimal cut off obtained by the ROC curve (first line) and the average ELISA cut off (second line).

Cut off	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Estimated ELISA screening prevalence (%) ^a	Estimated serorevalence after confirmation by WB (%) ^b
0.20	40.91	98.55	76.90	68.61
0.27	40.91	92.75	74.76	72.07
0.34	50.00	95.00	71.43	72.55
0.58	75.00	75.50	66.19	76.88
1.10	90.00	50.00	57.62	80.97

With: Number of true positive animals in ELISA = number of animals positive in ELISA \times (number of positive animals both in ELISA and in WB/number of positive animals in ELISA) and number of false negative animals in ELISA = number of animals negative in ELISA \times (number of animals negative in ELISA but positive in WB/number of negative animals in ELISA).

^a ELISA screening prevalence (%) = (number of positive results in ELISA/number of animals tested by ELISA) \times 100.

^b Prevalence after confirmation by WB (%) = [(number of true positive animals in ELISA + number of false negative animals in ELISA)/total number of animals] \times 100.

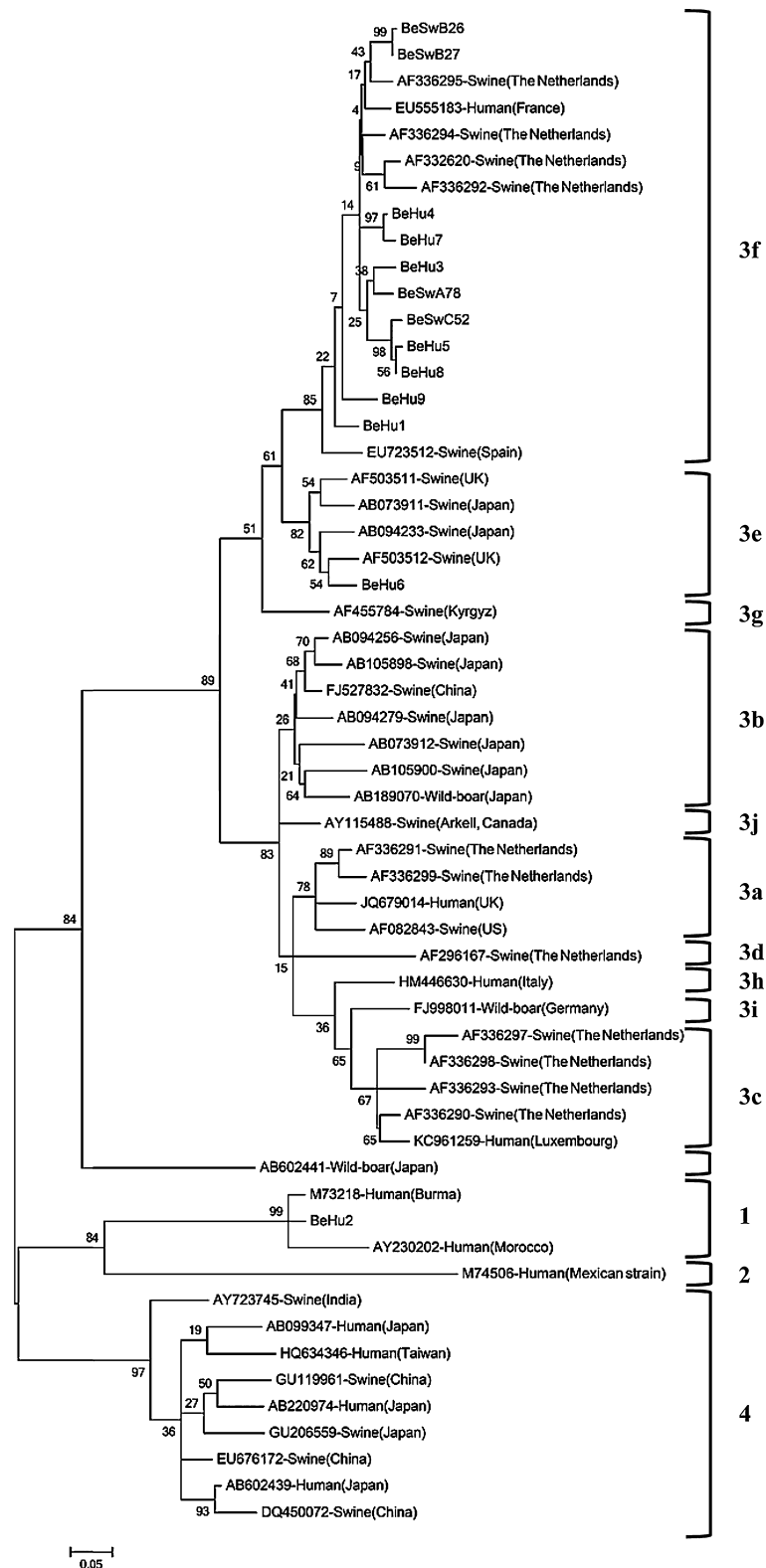


Fig. 4. Maximum-likelihood phylogenetic tree on 57 sequences of 302 bp in HEV open reading frame 2; subtyping classification according to Lu et al. (24). GenBank accession numbers are shown for each HEV strain used in the phylogenetic analysis. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site.

ELISA seroprevalence and from 69 to 81% after confirmation by WB. These results further support that HEV seroprevalence remains high in the investigated pig population whatever the selected scenario.

3.4. Detection of HEV RNA in swine and comparison with human strains

In addition to the investigation of the high HEV seroprevalence in pigs, the risk of zoonotic transmission of the infection was approached by comparing viral sequences identified during this study in pigs and humans in Belgium. Four out of 420 pig sera were detected positive for HEV RNA by conventional nested RT-PCR. These 4 sera came from pigs aged between 3 and 4 months. All sequences from the 4 positive sera belonged to genotype 3, subtype f. The BLAST analysis revealed that the 4 Belgian sequences were close to swine and human HEV sequences identified in different countries (France, Italy, The Netherlands and Thailand).

From the 9 human strains, 8 sequenced fragments belonged to the genotype 3 and one to genotype 1. Seven out of the 8 genotype 3 belonged to subtype 3f like all the HEV pig fragments, although, one belonged to 3e (Fig. 4).

Phylogenetic analysis was performed on the 13 fragments obtained from these 9 human and 4 swine samples. The nucleotide sequences were compared with other HEV strains sequences deposited in GenBank (Fig. 4). Human and swine HEV sequences have 75–97% of nucleotide homology. Within subtype 3f, all swine HEV isolates showed a high nucleotide homology (87–97%) with human HEV sequences.

4. Discussion

A high HEV ELISA screening prevalence was observed in Belgian pigs (73%; 95% CI 68.8–77.5) and the viruses identified in pig samples fall into genotype 3 subtype f together with most of the investigated human samples. These results are in agreement with the major findings in other European countries (Rose et al., 2011 and Rutjes et al., 2009), except for one genotype 4 virus found in Belgium (Hakze-van der Honing et al., 2011) and another one found in Italy (Monne et al., 2014). However, from an epidemiological point of view, this high HEV ELISA screening prevalence has to be confirmed, particularly in terms of the future assessment of possible human exposure. Indeed, the high values obtained in this study and in other countries in Europe were obtained with an ELISA adapted for pig samples, but it is unknown yet whether these figures correspond to the true epidemiological situation. Therefore, the ELISA results were re-evaluated by adapting a WB method and analysing scenarios varying the ELISA specificity relative to WB. The estimated seroprevalences fall between 69 and 81% depending on the different scenarios. Therefore their values remained high and are in agreement with the situation observed in the European pig population.

WB is used as a confirmatory test in human HEV serological analyses. It was previously used to estimate the true HEV seroprevalence in human populations with

different levels of exposure to pigs (Bouwknegt et al., 2008). In our study, WB was used as the reference test for ROC curve analysis. The misclassification of some sera, ELISA positive but WB negative, could be consistent with a lower specificity of ELISA relative to WB. This result does not dismiss ELISA that is better suited than WB for mass screening of large pig populations. The WB used in the present study is validated to detect antibodies recognizing different epitopes of HEV genotypes 1 and 3. However, the WB also led to the detection of antibodies directed to genotype 4 belonging to one of the positive controls. This result could be explained by the fact that all HEV fall into one serotype. The WB used here, although primarily designed for human sera, was considered as a specific method allowing the detection of swine HEV genotype 3 antibodies. The discrepancy between the 16 sera positive in ELISA and negative or borderline in WB could be due to the single presence of anti-HEV IgA not detected by WB. Anti-HEV IgA are indeed present in the human sera up to 5 months after infection (Osterman et al., 2013). Further work should be performed to validate WB as a confirmatory test with pig sera.

The relative low detection of HEV RNA (4 out of 420 pig sera) can be explained by the age of the sampled pigs which were less than 6 months but probably older than 2–4 months old when the peak of viraemia is usually observed (Takahashi et al., 2005; de Deus et al., 2008; Kaba et al., 2009). It can also be explained by the fact that viremia is transient and usually low in absence of hepatic cytolysis. As the same extraction control was systematically performed (data not shown), extraction step failure can be excluded. However, inappropriate storage of the sample sera or a lack of sensitivity of the nested RT-PCR cannot be completely ruled out.

The phylogenetic study was performed on a 302 bp fragment corresponding to the 5' end of ORF2, this region is representative of the divergence observed within the whole genome (Lu et al., 2006). Almost all sequences detected in available human samples mainly clustered in subtype 3f, as did the porcine strains with a close nucleotide homology, indicating the possible zoonotic potential of HEV in Belgium. In addition, the existence of other HEV genotypes or subtypes circulating in pigs in Belgium cannot be excluded, as highlighted by the detection of genotype 4 subtype b in a previous survey (Hakze-van der Honing et al., 2011).

Further work needs to investigate the apparent discrepancy between the high HEV seroprevalence in pigs and the relatively low human seroprevalence in most areas of Western European countries (Dalton et al., 2013). Several hypotheses like area characteristics, occupational or professional pork exposure, eating habits have been put forward to explain this discrepancy (Colson et al., 2010 and Krumbholz et al., 2012). It is of utmost importance that we gain a better understanding of the zoonotic potential of HEV, taking into account a possible underestimate of HEV human infection due to a potential high number of asymptomatic cases (Mansuy et al., 2011). These results raise the question as to whether there is a clustering and a difference in human prevalence by region. Indeed, as observed in the present study, the significant difference in

seroprevalence between the Flemish and the Walloon pig populations would lead to further investigate the relationships between human and animal HEV infection in these regions.

Acknowledgements

We thank Sophie Quoilin (Belgian Institute of Public Health) and Edmilson F. Oliveira-Filho (University of Liège) for the careful reading of the manuscript. We also thank the Higher Institute for Modern Languages of the University of Liège for the English correction. This research was supported by the Belgium Federal Public Service, Health, Food Chain Safety and Environment (Project HEVEA, RF10/6236).

References

- Baechlein, C., Schielke, A., Johne, R., Ulrich, R.G., Baumgaertner, W., Grummer, B., 2010. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet. Microbiol.* 144, 187–191.
- Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M.M., Widdowson, M.A., Worm, H.C., Koopmans, M.P., Frankena, K., de Roda Husman, A.M., De Jong, M.C., van der Poel, W.H., 2008. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in the Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 136, 567–576.
- Bouwknegt, M., Rutjes, S.A., Reusken, C.B., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M.C., de Roda Husman, A.M., van der Poel, W.H., 2009. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.* 5, 7.
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., Heyries, L., Raoult, D., Gerolami, R., 2010. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.* 202, 825–834.
- Cooper, K., Huang, F.F., Batista, L., Rayo, C.D., Bezanilla, J.C., Toth, T.E., Meng, X.J., 2005. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J. Clin. Microbiol.* 43, 1684–1688.
- Dalton, H.R., Hunter, J.G., Bendall, R., 2013. Autochthonous hepatitis E in developed countries and HEV/HIV coinfection. *Semin. Liver Dis.* 33, 50–61.
- de Deus, N., Casas, M., Peralta, B., Nofrarias, M., Pina, S., Martin, M., Segales, J., 2008. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet. Microbiol.* 132, 19–28.
- Di Bartolo, I., Ponterio, E., Castellini, L., Ostanello, F., Ruggeri, F.M., 2011. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet. Microbiol.* 149, 330–338.
- Emerson, S.U., Purcell, R.H., 2003. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13, 145–154.
- Emerson, S.U., Anderson, D., Arankalle, A., Meng, X.J., Purdy, M., Schlauder, G.G., Tsarev, S.A., 2004. Hepatitis E virus. In: Fauquet, C.M., Mayo, M.A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L.A. (Eds.), *Virus Taxonomy: Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, London, pp. 851–855.
- Engle, R.E., Yu, C., Emerson, S.U., Meng, X.J., Purcell, R.H., 2002. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.* 40, 4576–4580.
- Haagsman, A., Reuter, G., Duizer, E., Nagy, G., Herremans, T., Koopmans, M., Szucs, G., 2007. Seroepidemiology of hepatitis E virus in patients with non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary. *J. Med. Virol.* 79, 927–930.
- Hakze-van der Honing, R.W., van Coillie, E., Antonis, A.F., van der Poel, W.H., 2011. First isolation of hepatitis e virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One* 6 (August) e22673. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0022673>.
- Hall, T.A., 1999. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hu, W.P., Lu, Y., Precioso, N.A., Chen, H.Y., Howard, T., Anderson, D., Guan, M., 2008. Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1151–1157.
- Huang, F.F., Haqshenas, G., Guenette, D.K., Halbur, P.G., Schommer, S.K., Pierson, F.W., Toth, T.E., Meng, X.J., 2002. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1326–1332.
- Kaba, M., Davoust, B., Marie, J.L., Barthet, M., Henry, M., Tamalet, C., Raoult, D., Colson, P., 2009. Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France. *J. Med. Virol.* 81, 1750–1759.
- Krumbholz, A., Mohn, U., Lange, J., Motz, M., Wenzel, J.J., Jilg, W., Walther, M., Straube, E., Wutzler, P., Zell, R., 2012. Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med. Microbiol. Immunol.* 201, 239–244.
- Krumbholz, A., Joel, S., Neubert, A., Dremsek, P., Durrwald, R., Johne, R., Hlinak, A., Walther, M., Lange, J., Wutzler, P., Sauerbrei, A., Ulrich, R.G., Zell, R., 2013. Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Vet. Microbiol.* 167, 394–402.
- Lhomme, S., Abravanel, F., Dubois, M., Sandres-Saune, K., Rostaing, L., Kamar, N., Izopet, J., 2012. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J. Virol.* 86, 10006–10014.
- Li, T.C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N., Miyamura, T., 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958–1960.
- Lu, L., Li, C., Hagedorn, C.H., 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5–36.
- Mansuy, J.M., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Saune, K., Miedouge, M., Ellis, V., Rech, H., Destruel, F., Kamar, N., Dalton, H.R., Izopet, J., 2011. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 2309–2312.
- Meng, X.J., 2011. From Barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis e virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161, 23–30.
- Monne, I., Ceglie, L., Di Martino, G., Natale, A., Zamprogna, S., Morreale, A., Rampazzo, E., Cattoli, G., Bonfantini, L., 2014. Hepatitis E virus genotype 4 in a pig farm, Italy, 2013. *Epidemiol. Infect.* 1–5.
- Osterman, A., Vizoso-Pinto, M.G., Jung, J., Jaeger, G., Eberle, J., Nitschko, H., Baiker, A., 2013. A novel indirect immunofluorescence test for the detection of IgG and IgA antibodies for diagnosis of Hepatitis E Virus infections. *J. Virol. Methods* 191, 48–54.
- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F., Pavio, N., 2011. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 34, 419–427.
- Rutjes, S.A., Lodder, W.J., Lodder-Verschoor, F., van den Berg, H.H., Venema, H., Duizer, E., Koopmans, M., de Roda Husman, A.M., 2009. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 381–387.
- Rutjes, S.A., Lodder-Verschoor, F., Lodder, W.J., van der Giessen, J., Reesink, H., Bouwknegt, M., de Roda Husman, A.M., 2010. Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in the Netherlands. *J. Virol. Methods* 168, 197–206.
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Tanaka, T., Tsatsralt-Od, B., Inoue, J., Okamoto, H., 2005. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J. Gen. Virol.* 86, 1807–1813.
- Tamura, K., Nei, M., 1993. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S., 2011. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28, 2731–2739.
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., Mishiho, S., 2003. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Teo, C.G., 2010. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 24–32.
- Thrusfield, M., Ortega, C., de Blas, I., Noordhuizen, J.P., Frankena, K., 2001. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.* 148, 567–572.
- van Cuyck, H., Fan, J., Robertson, D.L., Roques, P., 2005. Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. *J. Virol.* 79, 9306–9314.
- Van Hoecke, F., Van Maerken, T., De Boule, M., Geerts, A., Vlierberghe, V., Colle, I., Padalko, H.E., 2012. Hepatitis E seroprevalence in east and west Flanders, Belgium. *Acta Gastroenterol. Belg.* 75, 322–324.

3.3 Etude 2 :

La faune sauvage belge comme réservoir potentiel du virus
de l'hépatite E

PREAMBULE

Après avoir établi que le porc représentait un réservoir du HEV, le rôle de la faune sauvage a été investigué en Belgique. En effet, l'aspect zoonotique du virus de l'hépatite E pourrait être en partie dû à la faune sauvage dans nos pays. Les premières certitudes de transmission zoonotique du virus ont été décrites au Japon à partir de viande de cerf.

Dans l'étude suivante, 383 sérums de sangliers ont été échantillonnés pour analyses sérologiques. Soixante-neuf sérums et 61 foies de marcassins ont également été échantillonnés en vue des analyses virologiques. D'autre part, un total de 189 et 235 sérums ont été collectés à partir de cerfs et de chevreuils respectivement pour les analyses sérologiques. Pour les analyses virologiques, 84 et 68 sérums ainsi que 29 et 27 foies provenant respectivement de cerfs et de chevreuils ont été échantillonnés.

Une séroprévalence apparente de 34 % (95 % CI 29,71 – 39,46) a été détectée chez les sangliers, de 1 % (95 % CI 0 – 2,4) chez les cerfs et de 3 % (95 % CI 0,8 – 4,2) chez les chevreuils. Afin d'évaluer la prévalence de screening par ELISA, des analyses par Western blot ont été réalisées, une analyse de courbe ROC a été faite et différents scénarios faisant varier la spécificité de l'ELISA relative au Western blot ont été analysés. La séroprévalence est restée élevée dans la population de sangliers quel que soit le scénario employé. Chez le sanglier, de l'ARN de HEV a été détecté dans 4 sérums sur 69 et 4 foies sur 61. Toutes les séquences obtenues à partir de sérums appartenaient au génotype HEV-3. De l'ARN de HEV-3 a été détecté dans 1 foie de cerf sur 29.

Les sangliers peuvent donc être considérés comme un hôte réservoir du virus en Belgique. Cependant, contrairement au rôle épidémiologique joué par les cervidés dans d'autres pays européens, les faibles séroprévalences observées dans cette étude montrent que les cervidés ne semblent pas être un réservoir du HEV dans notre pays. De futures études sont nécessaires afin de déterminer dans quelle situation les cervidés jouent un rôle de réservoir. Ces résultats posent la question de la dynamique d'infection du HEV dans la faune sauvage, les porcs domestiques et la population humaine.

Belgian wildlife as potential zoonotic reservoir of hepatitis E virus

Transboundary and Emerging Diseases (2015)

Damien Thiry ⁽¹⁾, Axel Mauroy ⁽¹⁾, Claude Saegerman ⁽¹⁾, Alain Licoppe ⁽²⁾, Thomas Fett ⁽¹⁾,
Isabelle Thomas ⁽³⁾, Bernard Brochier ⁽³⁾, Etienne Thiry ⁽¹⁾, Annick Linden ⁽¹⁾

(1) University of Liège, Liège, Belgium

(2) Public Service of Wallonia, Gembloux, Belgium

(3) Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

ORIGINAL ARTICLE

Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E VirusD. Thiry¹, A. Mauroy¹, C. Saegerman², A. Licoppe³, T. Fett⁴, I. Thomas⁵, B. Brochier⁵, E. Thiry¹ and A. Linden⁴¹ Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Fundamental and Applied Research for Animal Health Centre, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium² Research Unit of Epidemiology and Risk Analysis Applied to Veterinary Science (UREAR-ULg), Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium³ Natural and Agricultural Environmental Studies Department, DEMNA, Service Public de Wallonie, Gembloux, Belgium⁴ Wildlife Health and Pathology, Department of Infectious and Parasitic Diseases, FARA, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, Liège, Belgium⁵ Virology, Operational Directorate Communicable and Infectious Diseases, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium**Keywords:**

hepatitis E virus; wild boar; cervids; Belgium; prevalence; zoonosis

Correspondence:

E. Thiry. Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Fundamental and Applied Research for Animal Health Center, Faculty of Veterinary Medicine, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium. Tel.: +32(0) 43664250; Fax: +32(0)43664261; E-mail: etienne.thiry@ulg.ac.be

These results strongly support the high and the low levels of HEV circulation in wild boars and cervids, respectively, in Belgium.

Received for publication June 2, 2015

doi:10.1111/tbed.12435

Summary

Hepatitis E is an acute human liver disease in healthy individuals but may become chronic in immunocompromised patients. It is caused by the hepatitis E virus (HEV) and can have a zoonotic origin, particularly in high-income countries. In this study, 383 sera from wild boars were selected for serology; for virological analyses, 69 sera and 61 livers from young wild boars were used. A total of 189 and 235 sera of, respectively, red deer and roe deer were collected for serological analysis. For virological analyses, 84 and 68 sera and 29 and 27 livers from, respectively, red and roe deer were sampled. An apparent seroprevalence of 34% (95% CI 29.71–39.46) was found in wild boars, of 1% (95% CI 0–2.4) in red deer and 3% (95% CI 0.8–4.2) in roe deer. To assess the ELISA screening prevalence, Western blot (WB) analyses were carried out, a receiver operating characteristic curve analysis was performed and different scenarios with varying ELISA specificities relative to WB were analysed. Seroprevalence remained high whatever the scenario in the wild boar population. In wild boar, 4 of 69 sera and 4 of 61 livers were detected as positive for HEV RNA. All sequences obtained from sera belonged to genotype HEV-3. HEV RNA, belonging to genotype HEV-3, was detected in one of 29 red deer livers. Wild boar can be considered as a host reservoir of the virus in Belgium. However, in contrast to the epidemiological role played by them in other countries, the low prevalence in deer makes these species an unlikely reservoir. This evidence needs further investigation to determine in which situation deer can serve as reservoir. These results also raise the question of the dynamics of HEV infection between wild fauna, domestic pigs and humans.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV), belonging to the family *Hepeviridae*, genus *Orthohepevirus*, is a small, non-enveloped virus with a single-stranded, positive sense RNA genome of approximately 7.2 kb (Emerson and Purcell, 2003; Smith et al., 2014). The first human outbreak of hepatitis E

occurred in India during the winter of 1955–1956, and HEV was identified in pigs for the first time in 1997 (Meng et al., 1997). Since then, HEV and HEV-related viruses have been detected in an increasing number of animal species such as wild boar and deer (Thiry et al., 2015). According to a new proposed classification, the *Hepeviridae* family contains two genera, five species (*Orthohepevirus* A, B, C,

D and Piscihepevirus A) and nine genotypes (Smith et al., 2014). Genotypes HEV-1 and 2 include only human strains, while genotypes HEV-3 and 4 have also been detected in other species, especially in swine. HEV-1 and 2 are mainly present in developing countries (Aggarwal, 2011). In Asia, the Middle East and Africa, HEV is a major aetiological agent responsible for human epidemics of viral hepatitis (Nicand et al., 2009; Purcell and Emerson, 2010). The main transmission route in these regions is faecal–oral via contaminated drinking water (Borgen et al., 2008). In industrialized countries, HEV-3 is the mainly detected genotype and, although real transmission evidences have been poorly documented to date (Tei et al., 2003; Li et al., 2005; Okano et al., 2013; Renou et al., 2014; Riveiro-Barciela et al., 2014), the zoonotic transmission between pigs, wild boars or deer and humans is of particular concern (Teo, 2010; Meng, 2011).

Hepatitis E virus RNA and antibodies have been detected in wild boars in several countries (Meng, 2011). Most HEV strains detected in wild boars globally belong to genotype HEV-3 (Meng, 2010). However, HEV sequences belonging to a new HEV genotype have been detected in wild boars in Japan (Takahashi et al., 2011). In Germany, a HEV seroprevalence of 29.9% of 107 tested sera was reported (Adl-hoch et al., 2009). In the Netherlands, a seroprevalence of 12% of 1029 animals was shown (Rutjes et al., 2010). In France, a HEV seroprevalence of 14% was observed in sera from 421 wild boars (Carpentier et al., 2012). In Italy, an overall seroprevalence of 10.2% (226/2211) was found (Martinelli et al., 2013). In Spain, seroprevalences of 26.5% of 735 wild boars and 57.4% of 108 wild boars were reported in 2012 and 2015, respectively (Boadella et al., 2012; Kukielka et al., 2015). Few studies have been carried out to detect HEV infection in cervids. In Japan, low prevalences were observed in Sika deer which are considered an incidental host for HEV (Matsuura et al., 2007; Yu et al., 2007). In Europe, some studies on red deer (*Cervus elaphus*) and roe deer (*Capreolus capreolus*) showed that these animals could be reservoir hosts (Reuter et al., 2009; Rutjes et al., 2009). In Spain, an apparent seroprevalence of 10.4% was observed on 968 red deer (Boadella et al., 2010). A second study performed in Spain showed a seroprevalence of 12.85% in red deer in 2015 (Kukielka et al., 2015). In Italy, a total of 35 of 251 red deer sera were seropositive (Di Bartolo et al., 2015). However, other studies shows very low or no HEV antibody prevalence in cervids, in the Netherlands, 2 of 38 red deer and 0 of 8 roe deer were seropositive (Rutjes et al., 2010), and in Poland, no antibodies were detected on 118 red deer and 38 roe deer sera (Larska et al., 2015).

In 2003, zoonotic transmission was reported in Japan. Four human cases were linked to the consumption of uncooked wild boar liver and Sika deer meat. The transmission could only be confirmed for the deer as no wild boar

liver remained for testing (Matsuda et al., 2003; Tei et al., 2003). In 2004, another study showed a 99.7% homology between the full genome viral sequences found in wild boar and a deer hunted in the same forest as the Sika deer consumed by the four patients above (Takahashi et al., 2004). Another report from Japan, in 2005, demonstrated transmission of HEV via ingestion of uncooked wild boar meat (Li et al., 2005).

In several European countries, wild boar populations have consistently increased since the 1980s (Massei et al., 2014) and in Belgium the hunting bag statistics (number of wild boars annually harvested) reached a total of more than 25000 heads in 2012 in the southern part of the country (Walloon Region, 16 903 km²). The red and roe deer bag statistics showed lower numbers of around 5300 and 14 400, respectively, in 2012 in the same area (A. Licoppe & R. Walloon, unpublished data). In Belgium, four-fifths of the forests are in the Walloon Region, with a wooded expanse of 4952 km² representing 29% of its total area. Moreover, this region also presents a high human population density (210 people/km²) which could enhance contact possibilities between wildlife and the human population. These data highlight the need on pursuing studies about transmission routes in wildlife and on interspecies transmission opportunities between wildlife and human populations.

This study aims to investigate the presence and the spread of HEV infection in three different wild species in a region with high human population densities, to genotype the strains identified, to compare them to sequences previously detected from humans and swine in Belgium and to assess the potential for contact between wild fauna and pigs in the Walloon Region.

Materials and Methods

Sampling

In the frame of a targeted surveillance programme, wild boars were sampled by the surveillance network of wildlife diseases (Linden et al., 2011) during the hunting season from September 2010 to February 2011. The study was conducted in 31 of the 33 forest districts of the Walloon Region, and a two-stage cluster sampling was realized. Having selected hunting areas in each forest district, animals were then randomly sampled in each hunting area. All animals were necropsied in the field, within 2–3 h after being shot. Individual post-mortem examinations included the determination of sex, age, body weight and body condition. Age was determined on the basis of tooth eruption patterns and weight. Animals were classified as subjuveniles (<6 months old), juveniles (between 6 and 12 months old), subadults (between 1 and 2 years old) and adults (over 2 years old). By applying the binomial law, a sample size of 381 allows the detection of a seroprevalence of 50% with an

accepted error of 5% and a confidence level of 95%. A sampling of 383 sera from wild boars over 6 months belonging to 196 males, 184 females and three indeterminate genders was performed. They were divided into three age groups: 150 adults, 99 subadults and 133 juveniles. For one sample, the age could not be specified. For the virological study, all available samples from the subjuvenile wild boars were used, that is 69 sera and 62 associated livers. In addition, 25 sera from older wild boars (>6 months) were also tested.

Both serum and liver sampling from cervids was also performed by the surveillance network of wildlife diseases during the hunting season from October 2012 to December 2012 in the forest districts of the Walloon Region. The study was conducted in 28 of the 33 forest districts following the same methodology as described for wild boar. One hundred and eighty-nine and 235 sera were sampled for serological analyses in red deer and roe deer, respectively, allowing the theoretical detection of a seroprevalence of 10% and 15% with an accepted error of 5% and a confidence level of 95%. For the virological analyses, 84 red deer and 68 roe deer sera, corresponding to the available samples from animals <1 year old, were tested. Among these animals, 29 and 27 livers of red and roe deer, respectively, were also sampled for the virological study.

Serological analyses

A double antigen sandwich ELISA (das-ELISA) able to detect IgM, IgG and IgA directed against HEV in all animal species was used (HEV ELISA kit 4.0V; MP Biomedicals, Illkirch, France) (Bouwknegt et al., 2008; Hu et al., 2008; Rutjes et al., 2010; Thiry et al., 2014). A total of 383 wild boars, 189 red deer and 235 roe deer samples were tested in duplicate. In addition, 25 samples from specific-pathogen-free (SPF) piglets born in Biosafety Level 3 facilities, and five positive sera from experimental infections of pigs (one against genotype 4 and four against genotype 3 HEV), were tested in duplicate as negative and positive controls, respectively, in a previous study (Thiry et al., 2014).

A Western blot (WB) for the detection of antibodies (Ab) against HEV in humans (recomLine HEV IgG/IgM; Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany) was used as described previously (Thiry et al., 2014). It was adapted for use on wild boar sera by replacing the conjugate of the kit (anti-human IgG – peroxidase) with a conjugate made from a secondary goat polyclonal Ab, reactive against pig IgG and coupled to peroxidase (Abcam, Cambridge, UK) and for cervid sera, using a conjugate made from secondary rabbit polyclonal Ab, reactive against deer IgG and coupled with peroxidase (KPL, Gaithersburg, MD, USA). Tests were performed with conjugates at 1/1000 or 1/500 dilution for wild boar or cervid sera, respectively. Three sera from infected pigs were tested as positive controls, and three sera

from SPF piglets were tested as negative controls. A total of 77, 39 and 51 sera from wild boars, red deer and roe deer, respectively, corresponding to 20% of each species serological sampling, were randomly selected and tested with the IgG WB. Four categories were defined according to the optical density (OD) averages obtained by ELISA. For wild boar, the first category included an OD ranging from 0 to 0.15; the second, an OD from 0.15 to 0.26; the third, an OD from 0.26 to 1; and the fourth, ≥ 1 (Table 1a). For red and roe deer, the first category included an OD ranging from 0 to 0.15, the second an OD from 0.15 to 0.21, the third an OD from 0.21 to 1 and the fourth, ≥ 1 (Table 1b, c). The tests were carried out on a ProfiBlot T48 (TECAN, Mechelen, Belgium).

Virological analyses

To detect HEV RNA in the samples, virological analyses were performed according to the protocol used in a previous study (Thiry et al., 2014). Hepatitis E virus RNA sequences of 302 nucleotides in open reading frame 2 were analysed using BioEdit and MEGA version 6 (Hall, 1999; Tamura et al., 2013), with a set of sequences available from

Table 1. Hepatitis E virus IgG Western blot (WB) results in wild boars (a), red deer (b) and roe deer (c) classified according to four ranges of hepatitis E virus ELISA optical density

Class*	OD [†] ELISA range	Western blot [‡]			Total
		+	Borderline	—	
(a)					
1	[0–0.15]	9	3	30	42
2	[0.15–0.26]	2	1	4	7
3	[0.26–1]	7	0	5	12
4	[1–5]	14	1	1	16
Total		32	5	40	77
(b)					
1	[0–0.15]	1	0	36	37
2	[0.15–0.21]	0	0	0	0
3	[0.21–1]	1	0	0	1
4	[1–5]	0	0	0	0
Total		2	0	36	38
(c)					
1	[0–0.15]	3	1	41	45
2	[0.15–0.21]	0	0	0	0
3	[0.21–1]	0	0	2	2
4	[1–5]	1	0	1	2
Total		4	1	44	49

*Classes 1 and 2: ELISA negative results; classes 3 and 4: ELISA positive results.

[†]Optical density.

[‡]Positive: WB results with a score ≥ 4 ; Borderline: Western blot result with a score of 3; Negative: WB results with a score ≤ 2 . Score were given according to the manufacturer's instructions.

Tableau supplémentaire 1 : profils d'immunomarquage de protéines recombinantes de HEV en Western blot (WB) avec des sérums de sangliers (a), de chevreuils (b) et de cerfs (c)

(a)

Bandes*	Profils de WB											
O2N Gt1	+	+	+	+	+	+	+	+			+	
O2N Gt3	+	+									+	
O2C Gt1	+	+	+	+	+	+			+	+	+	+
O2C Gt3	+	+	+	+	+				+	+	+	
O2M												
O3 Gt1	+		+				+		+	+		
O3 Gt3	+		+	+				+	+			
Résultats en WB							+				Douteux	-
Nombres de sérums	2	2	1	1	1	5	1	1	4	1	8	5

(b)

Bandes*	Profils de WB		
O2N Gt1			+
O2N Gt3	+		+
O2C Gt1	+	+	
O2C Gt3	+	+	+
O2M			
O3 Gt1		+	
O3 Gt3			
Résultats en WB	+	Douteux	-
Nombres de sérums	1	1	2

(c)

Bandes*	Profils de WB	
O2N Gt1		
O2N Gt3		+
O2C Gt1	+	
O2C Gt3	+	
O2M		
O3 Gt1		
O3 Gt3		
Résultats en WB	+	-
Nombres de sérums	2	1

*Protéines recombinantes : extrémités N-terminales et C-terminales du cadre ouvert de lecture (ORF) 2 (O2N et O2C), de l'entièreté de l'ORF3 (O3) des génotypes 1 et 3 (Gt1 et Gt3), et de la partie centrale de l'ORF2 du génotype 1 (O2M)

GenBank and sequences previously detected in swine and humans in Belgium (Thiry et al., 2014), to determine genotypes and subtypes according to the classification of Lu et al. (2006). Phylogenetic relationships were inferred using the maximum likelihood method based on the Tamura-Nei substitution model chosen following the BIC and Akaike scores (Tamura and Nei, 1993) and 1000 bootstrap replicates. The tree with the highest log likelihood (−3406.4522) is shown. Bootstrap values are reported at each node. Initial tree(s) for the heuristic search were obtained by applying the neighbour-joining method to a matrix of pairwise distances estimated using the Maximum Composite Likelihood approach. A discrete Gamma distribution was used to model evolutionary rate differences among sites [five categories (+G, parameter = 0.5519)]. The analysis involved 44 nucleotide sequences. There were a total of 295 positions in the final data set. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 (Tamura et al., 2013).

We deposited eight HEV sequences originating from wild boar and one from red deer in GenBank under Accession no. KP296177 (BeWbS7), KP296178 (BeWbS24), KP296179 (BeWbS67), KP296180 (BeWbS68), KP296181 (BeWbL1), KP296182 (BeWbL24), KP296183 (BeWbL68), KP296184 (BeWbL67) and KR149812 (BeCL48).

Statistical analysis

A 95% confidence interval (CI) of prevalence was estimated using an exact binomial distribution. The receiver operating characteristic (ROC) curve with WB considered as reference test was performed to investigate the optimal cut-off (CO) point of the ELISA. Different scenarios with varying ELISA specificities relative to WB were analysed to measure the impact on HEV seroprevalence in wild boar (Table 2). For the wild boar analyses, a multivariate logistic regression was performed with the following explanatory variables: gender (female as reference), age of animals (adult as reference), density of animals expressed as number of shots/1000 ha of forest (lower density as reference) and area of sampling collection (administrative direction of Arlon as reference). The size of the chosen spatial unit is compatible with the regular spread of wild boar (Prevot and Morelle, 2012). In addition, to assess the collinearity, a backward elimination of variables was performed (Preux et al., 2005). If a variable induced a modification of the odds ratio of more than 20%, this variable was retained in the final model where the interaction was tested. All pairwise interactions between the variables in the final model were examined for significance. Goodness of fit was assessed using the Hosmer–Lemeshow goodness-of-fit test. Statistical analyses were performed using STATA/SE Acad. 12 (Stata Corp., College Station, TX, USA).

Table 2. Estimation of hepatitis E virus seroprevalence in the Belgian wild boar population. Analysis of three scenarios of varying ELISA specificities relative to WB (third to fifth lines). The two-first lines show the parameters estimated for the optimal cut-off obtained by the ROC curve (first line) and the average ELISA cut-off obtained according to the manufacturer instructions (second line)

Cut-off	Specificity (%)	Sensitivity (%)	Estimated ELISA screening prevalence (%)*	Estimated seroprevalence after confirmation by WB (%)†
0.30	87.50	65.63	31.59	40.40
0.26	85.00	65.63	34.46	40.56
0.85	50.00	87.00	64.23	34.16
0.15	75.00	71.88	46.48	42.01
0.39	90.00	59.38	27.68	40.27

*ELISA screening prevalence (%) = (number of positive results in ELISA/number of animals tested by ELISA) × 100.

†Prevalence after confirmation by WB (%) = [(number of true positive animals in ELISA + number of false-negative animals in ELISA)/total number of animals] × 100.

With: Number of true positive animals in ELISA = number of animals positive in ELISA × (number of positive animals both in ELISA and in WB/number of positive animals in ELISA) and number of false-negative animals in ELISA = number of animals negative in ELISA × (number of animals negative in ELISA but positive in WB/number of negative animals in ELISA).

Results

ELISA screening prevalence of HEV infection

The presence of HEV-specific antibodies was demonstrated by ELISA, using the CO value, obtained following the manufacturer's instructions and calculated for each plate. An overall apparent seroprevalence of 34% (95% CI 29.71–39.46) was found in wild boars, of 1% (95% CI 0–2.4) in red deer and 3% (95% CI 0.8–4.2) in roe deer.

Western blot analysis

To assess the ELISA screening prevalence, WB analyses against IgG were performed (Table 1a–c; Fig. 1). In wild boars, 22 of 77 sera showed discrepant results. The three sera from experimentally infected swine were positive; of these, two were infected with genotype 3 and one with genotype 4. The three SPF pig sera were all negative. Discrepant results were also detected for 1 of 38 and 7 of 49 sera in red deer and roe deer, respectively.

The data obtained following the WB analyses in wild boars were used for the conception of a ROC curve analysis with WB as reference test. Due to the extremely low seroprevalences obtained in red and roe deer, no ROC curve was made for these species.

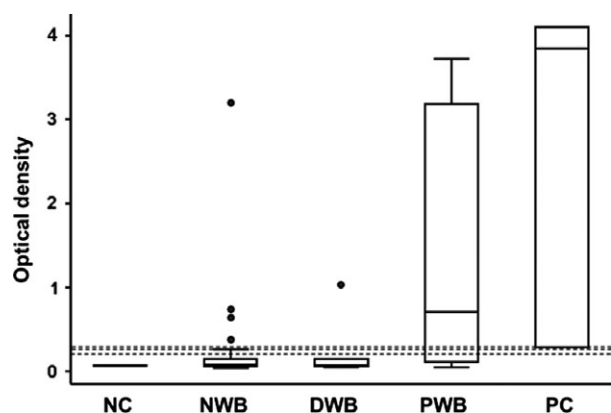


Fig. 1. Box plot. Distribution of wild boar serum samples according to the ELISA OD value classified following the Western blot results. NC = specific-pathogen-free pigs, NWB = negative in Western blot, DWB = doubtful in Western blot, PWB = positive in Western blot, PC = positive control (experimentally infected pigs), --- The three horizontal lines = optimal cut-off of 0.29 estimated by the ROC curve and 95% CI based on the computation of the cut-off according to producer based on the average of the calculated cut-off for nine plates (i.e. 0.26) (95% CI 0.24–0.28).

Virological results and comparison with swine and human strains

To complete the serological investigation in wild boars and cervids and to assess the role of these species in the potential transmission of the disease from wildlife to swine and humans, the different sequences obtained in this study were compared with those observed in swine and humans in the same region. In wild boar, 4 of 69 sera and 4 of 61 livers were detected as positive for HEV RNA. All sequences obtained from sera belonged to HEV genotype HEV-3, with three belonging to subtype 3f and one to 3c according to the classification of Lu et al. (2006). All sequences obtained from the livers were of genotype HEV-3 subtype f. They were compared with the human and swine strains belonging to genotype HEV-3. Most of these sequenced fragments also belonged to subtype 3f (Fig. 2). None of the sera of >6 months old wild boar was positive. HEV RNA was detected in 1 of 29 livers from red deer but not in roe deer. The detected sequence belongs to genotype 3f. No HEV RNA was detected in either red or roe deer sera.

ROC curve analysis in wild boar

According to the methodology used in a previous study (Thiry et al., 2014), seroprevalence results obtained by ELISA screening in wild boar were re-evaluated by a ROC curve analysis using WB as reference test after exclusion of the borderline data (Fig. 3). Different scenarios were analysed in Table 2. Different values of ELISA specificity relative

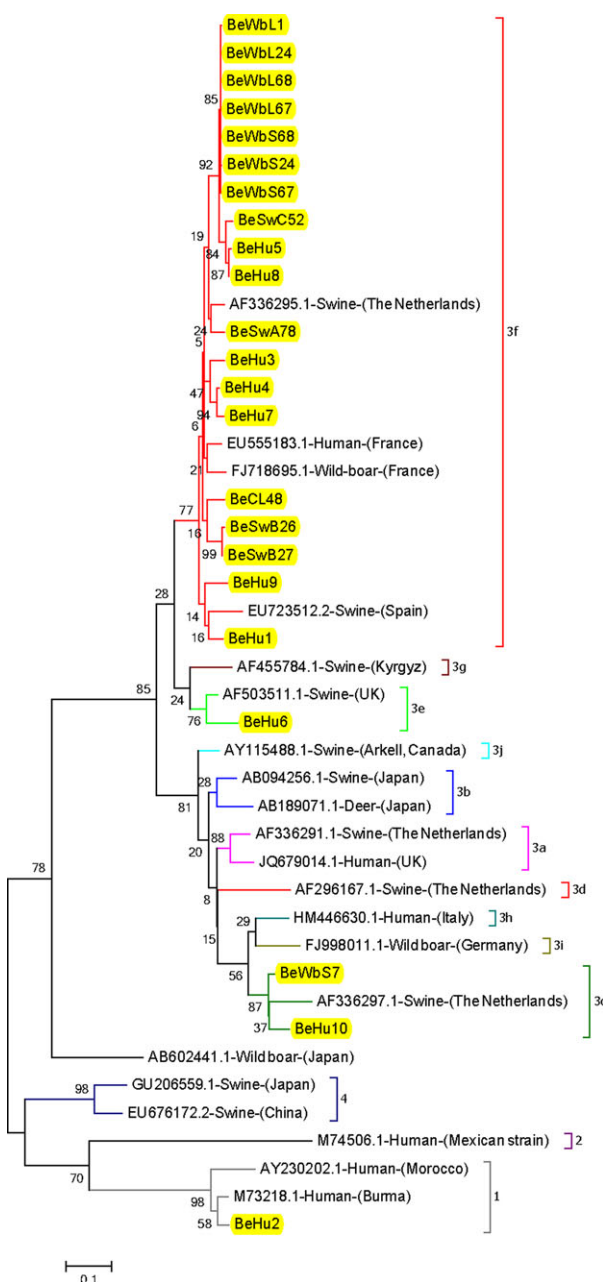


Fig. 2. Phylogenetic relationships on 44 302-bp-long sequences in open reading frame 2. GenBank Accession numbers are shown for each HEV strain used in the phylogenetic analysis. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. Belgian strains are underlined in yellow. BeHu, Belgian human; BeSw, Belgian swine; BeVbL = Belgian Wild boar liver; BeVbS = Belgian Wild boar serum; BeCL = Belgian Cervid Liver).

to WB and of CO (CO obtained by the ROC curve or by the ELISA) were assessed. Seroprevalence remained high whatever the scenario in the wild boar population. Indeed, it ranged from 27% to 64% for the ELISA screening prevalence and from 34% to 42% after confirmation by WB.

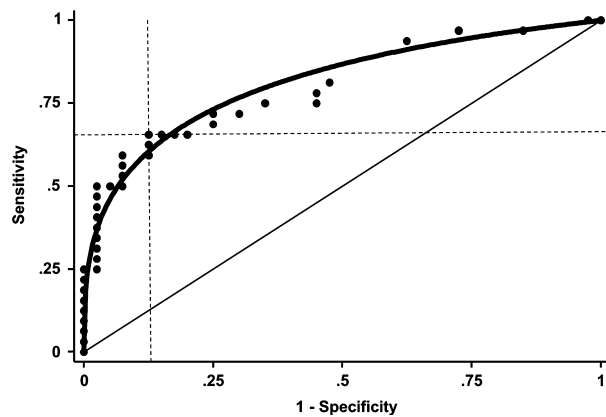


Fig. 3. Receiver operating characteristic curve (ROC curve) of the wild boar ELISA data versus Western blot as reference test after exclusion of the borderline data. Area under curve = 0.8148; standard error (area) = 0.0509. —: Fitted ROC curve; ●: Observed values of the ROC curve; ---: Intersection between horizontal and vertical lines is the optimal cut-off (0.30) (based on observed data).

Statistical analysis

Using a multivariate logistic regression and after a backward stepwise procedure, a model with three variables (age, density and direction) was retained. No interaction between variables was observed excluding collinearity between the variable density and the variable administrative direction. Next two different models were tested (age and density versus age and administrative direction), and the second model was retained based on the higher result of the Hosmer–Lemeshow test. A significant effect of age was observed. The number of seropositive juvenile (6 month to 1 year of age) and subadult wild boars was lower (OR = 0.46 with 95% CI: 0.27–0.76, P -value = 0.003 and OR = 0.57 with 95% CI: 0.33–0.99, P -value = 0.047, respectively) than adult animals taken as reference (Table 3). A significant effect of density was also observed. Area with density between 46.5 and 63.2 wild boars by 1000 ha (Fig. 4) contained less seropositive animals (OR = 0.36 with 95% CI: 0.13–0.985, P -value = 0.047) than the reference area with density between 0.3 and 16 wild boars by 1000 ha (Table 3). The Hosmer–Lemeshow test showed that the final model fits well with the data ($\chi^2 = 2.06$, df = 9, P -value = 0.96).

Discussion

A high HEV seroprevalence was observed in wild boars in a region where HEV is already known to be well distributed in domestic pigs. The combination of these two facts raises the question of HEV transmission between the domestic and wild population of suids. In wild boars, the HEV

seroprevalence was unevenly distributed between the age groups with a higher prevalence in older animals. Despite the high density of both deer and wild boar populations in the investigated region, a much lower prevalence was observed in cervids than in wild boars, raising the question of interspecies transmission and the main transmission routes for HEV in the considered areas. All strains detected in wild boars, cervids and pigs in the same region belonged to genotype HEV-3, most of them to subtype f.

Despite the high seroprevalence observed in wild boars, 34% (95% CI 29.71–39.46), it appears to be lower than that obtained in domestic pigs in the same region, using the same methodology (Thiry et al., 2014). The free-ranging behaviour of wild boars could induce a more progressive and slower circulation of the virus in this population compared to domestic pigs bred in an intensive production system. A significant difference was observed between HEV seroprevalences with regard to hunting bags, which are regarded as the best approximation to approach wildlife population size estimates (Hagen et al., 2014; Massei et al., 2014). The area with a density between 46.5 and 63.2 wild boars by 1000 ha contained less seropositive animals than the reference area with density between 0.3 and 16 wild boars by 1000 ha. The area with a lower number of seropositive wild boars is close to France where low seroprevalences were observed, especially in the north (7.3%) (Carpentier et al., 2012). The reference density area is close to Germany where a higher seroprevalence was observed (29.9%) (Adlhoeh et al., 2009). These results suggest that HEV seroprevalences in wild boars are linked to forest massifs crossed by national borders. These data support the need for supra-national studies to understand the spreading of the virus in the wild boar populations.

In cervids, a low seroprevalence was observed: 1% and 3% in red and roe deer, respectively. Despite this low seroprevalence, the circulation of the virus was confirmed by the detection of HEV RNA in red deer. Whereas a similar high seroprevalence, to that observed in this study, has been documented in wild boars in other European countries (Adlhoeh et al., 2009; Boadella et al., 2012), the low prevalences in cervids were unexpected. The differences could be explained by the fact that cervids have a more solitary behaviour compared to the social grouping of wild boars caused by their gregarious instinct. Nevertheless, the virus may be transmitted by faeces in a zone where cervids and wild boars interact, such as feeding sites. Indeed, in the Walloon Region, artificial feeding causes spatial aggregation of wild animals and could increase contact between cervids and wild boars (Gregoire et al., 2012). These two hypotheses could offer a better understanding of the virus transmission between these two species and suggest that cervids should be considered more as incidental hosts of HEV.

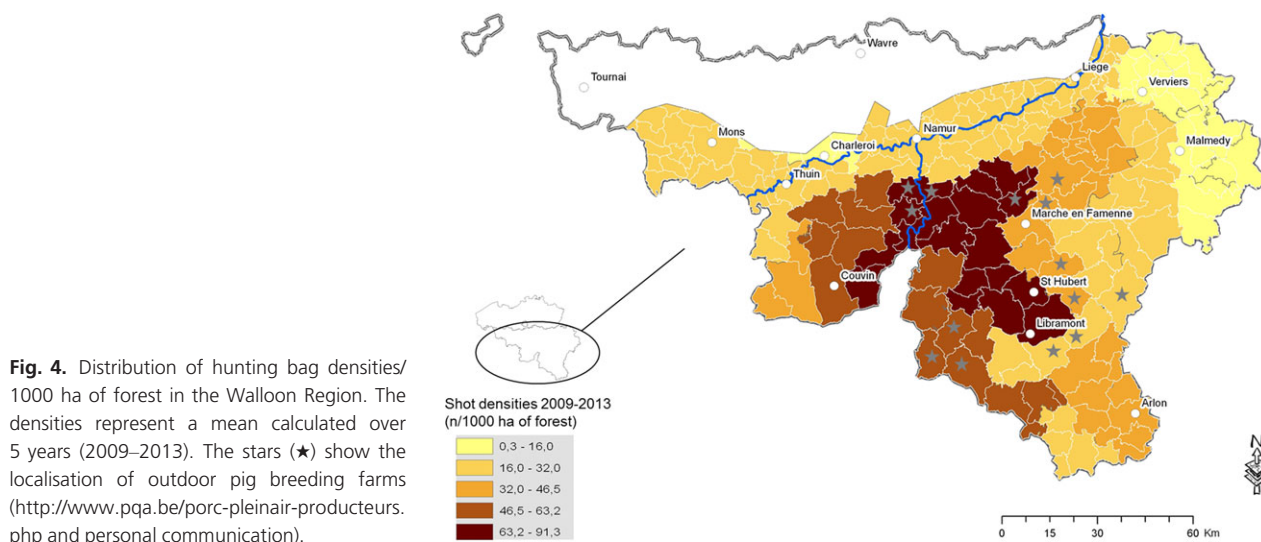


Fig. 4. Distribution of hunting bag densities/1000 ha of forest in the Walloon Region. The densities represent a mean calculated over 5 years (2009–2013). The stars (★) show the localisation of outdoor pig breeding farms (<http://www.pqa.be/porc-pleinair-producteurs.php> and personal communication).

Table 3. Risk factors related to the hepatitis E virus seroprevalence of wild boars using multivariate logistic regression

Variable	Modalities	OR (95% CI)	P-value
Age	Adult (>24 months)	Reference	–
	Subadult (12–24 months)	0.57 (0.33–0.99)	0.047*
	Juvenile (6–12 months)	0.46 (0.27–0.76)	0.003*
Density of animals (shots/1000 ha of forest)	0.362509–16.031017	Reference	–
	16.031018–32.039480	0.61 (0.25–1.48)	0.27
	32.039481–46.560416	0.78 (0.32–1.91)	0.59
	46.560417–63.278476	0.36 (0.13–0.99)	0.047*
	63.278477–91.321668	1.05 (0.44–2.51)	0.91

OR, odds ratio; CI, confidence interval.

*P-value < 0.05.

Due to the differences in wild boar and deer seroprevalences observed between Belgium and other European countries as well as with domestic pigs in Belgium, the ELISA screening prevalence obtained in wild animals was confirmed with a WB adapted to these two species. The analysis of scenarios performed on wild boar data showed that the estimated ELISA screening prevalence remained high and ranged between 27% and 65% whatever the ELISA specificity relative to WB. In cervids, despite the lack of concordance between ELISA and WB (Table 1b,c), the observations of positive results in both tests confirm that the virus circulates in this species despite the observed low seroprevalence. We cannot absolutely rule out a lack of sensitivity of the used ELISA. Discrepant result between ELISA and WB observed for some deer sera show that the serological tools should be refined for further analyses in deer populations. In the case of low seroprevalence, a combination of both ELISA and WB could enhance the sensitivity and the specificity of antibody detection in wildlife.

In the present study, all the viruses identified in wild boar and red deer samples fall into genotype HEV-3. The identified sequences have strong similarities between themselves and those found in pigs and humans in Belgium. This finding is of great importance in terms of human exposure. It raises concerns regarding the high rates of HEV circulation in the wild boar population with the risk of transmission to humans through direct or indirect contact (e.g. hunters) or through contaminated wild boar products (e.g. uncooked meat). Indeed, two cases of transmission from uncooked wild boar meat to humans were already described in Japan (Li et al., 2005; Okano et al., 2013). In Belgium, some outdoor pig breeding sites are located in regions with high densities of wild boars and, therefore, transmission between them cannot be excluded (Fig. 4). Hepatitis E virus transmission was recently evidenced between wild boars, swine and humans in Japan, Spain and France (Li et al., 2005; Renou et al., 2014; Riveiro-Barciela et al., 2014). These data are also supported by the high level of genetic relationships

observed between HEV strains from humans, pigs and wild boars in one region (Widen et al., 2011).

The phylogenetic study was performed on a 302-bp fragment corresponding to the 5' end of ORF2, which is highly conserved among all HEV isolates (Lu et al., 2006). Sequences detected in pigs and human samples mainly cluster with subtype 3f, as did most of the wild boar and red deer strains detected in this study. In wild boar, the sera and liver numbered 24, 67 and 68 belong to the same animals. These data support a zoonotic potential for HEV in Belgium. Further work needs to be carried out to investigate the discrepancy between the high prevalence in pigs and the lower amount of wild boar and red deer infections.

In Walloon Region, more than 20 000 wild boars are harvested annually since 2005 during game activities. As animals are directly eviscerated, hunters are thus directly exposed to blood and organs with risk of transmission of pathogens, including HEV. It is highly recommended for hunters to wear protective gloves for handling and evisceration in field conditions. Even though the consumption of uncooked wild boar meat is uncommon in this region, thorough cooking of meat is an essential recommendation to limit the risk of HEV transmission. In addition, preventive measures such as the setting up of double fences with a height of 1.2 m and maintaining sows indoors during heat (Gregoire et al., 2012) must be adopted by the outdoor pig farmers.

Wild boar can be considered as a host reservoir of HEV in Belgium. However, contrarily to the apparent epidemiological role of deer in other countries, the low prevalence in this species excludes it as a reservoir, establishing deer more as accidental hosts. Further investigations are needed to determine in which epidemiological situation deer can serve as reservoir. These results raise also the question of the dynamics of HEV infection between wildlife, domestic pigs and humans.

Acknowledgements

We are profoundly thankful to Louisa Ludwig for the English proofreading of the manuscript. We also thank Wim Van der Poel and Roland Cariolet for the generous provision of positive and negative control sera. This research was supported by the Belgium Federal Public Service, Health, Food Chain Safety and Environment (Project HEVEA, RF10/6236) and the Walloon Public Service.

References

- Adlhoch, C., A. Wolf, H. Meisel, M. Kaiser, H. Ellerbrok, and G. Pauli, 2009: High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet. Microbiol.* 139, 270–278.

- Aggarwal, R., 2011: Hepatitis E: historical, contemporary and future perspectives. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 26, 72–82.
- Boadella, M., M. Casas, M. Martin, J. Vicente, J. Segales, J. de la Fuente, and C. Gortazar, 2010: Increasing contact with hepatitis E virus in red deer, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1994–1996.
- Boadella, M., J. F. Ruiz-Fons, J. Vicente, M. Martin, J. Segales, and C. Gortazar, 2012: Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.* 59, 395–404.
- Borgen, K., T. Herremans, E. Duizer, H. Vennema, S. Rutjes, A. Bosman, A. M. de Roda Husman, and M. Koopmans, 2008: Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004–2006. *BMC Infect. Dis.* 8, 61.
- Bouwknegt, M., B. Engel, M. M. Herremans, M. A. Widdowson, H. C. Worm, M. P. Koopmans, K. Frankena, A. M. de Roda Husman, M. C. De Jong, and W. H. Van Der Poel, 2008: Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.* 136, 567–576.
- Carpentier, A., H. Chaussade, E. Rigaud, J. Rodriguez, C. Berthault, F. Boue, M. Tognon, A. Touze, N. Garcia-Bonnet, P. Choutet, and P. Coursaget, 2012: High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J. Clin. Microbiol.* 50, 2888–2893.
- Di Bartolo, I., E. Ponterio, G. Angeloni, F. Morandi, F. Ostanello, S. Nicoloso, and F. M. Ruggeri, 2015: Presence of hepatitis E virus in a red deer (*Cervus elaphus*) population in central Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12353 [Epub ahead of print].
- Emerson, S. U., and R. H. Purcell, 2003: Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13, 145–154.
- Gregoire, F., B. Mousset, D. Hanrez, C. Michaux, K. Walravens, and A. Linden, 2012: A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Vet. Res.* 8, 80.
- Hagen, R., M. Heurich, M. Kroschel, and M. Herdtfelder, 2014: Synchrony in hunting bags: reaction on climatic and human induced changes? *Sci. Total Environ.* 468–469, 140–146.
- Hall, T. A., 1999: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids Symp. Ser.* 41, 95–98.
- Hu, W. P., Y. Lu, N. A. Precioso, H. Y. Chen, T. Howard, D. Anderson, and M. Guan, 2008: Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin. Vaccine Immunol.* 15, 1151–1157.
- Kukiella, D., V. Rodriguez-Prieto, J. Vicente, and J. M. Sanchez-Vizcaino, 2015: Constant hepatitis E virus (HEV) circulation in wild boar and red deer in Spain: an increasing concern source of HEV zoonotic transmission. *Transbound Emerg. Dis.* doi: 10.1111/tbed.12311 [Epub ahead of print].
- Larska, M., M. K. Krzysiak, A. Jablonski, J. Kesik, M. Bednarski, and J. Rola, 2015: Hepatitis E virus antibody prevalence in wildlife in Poland. *Zoonoses Public Health* 62, 105–110.

- Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda, and T. Miyamura, 2005: Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1958–1960.
- Linden, A., M. Wirtgen, S. Volpe, A. Nahayo, J. Pirson, J. Pater-nostre, and F. Grégoire, 2011: Surveillance of wildlife diseases in Belgium. *Epidémiol. et santé anim.* 59–60, 213–215.
- Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn, 2006: Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.* 16, 5–36.
- Martinelli, N., E. Pavoni, D. Filogari, N. Ferrari, M. Chiari, E. Canelli, and G. Lombardi, 2013: Hepatitis E virus in wild boar in the central northern part of Italy. *Transbound. Emerg. Dis.* 62, 217–222.
- Massei, G., J. Kindberg, A. Licoppe, D. Gacic, N. Sprem, J. Kamler, E. Baubet, U. Hohmann, A. Monaco, J. Ozolins, S. Cellina, T. Podgorski, C. Fonseca, N. Markov, B. Pokorny, C. Rosell, and A. Nahlik, 2014: Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest Manag. Sci.* 71, 492–500.
- Matsuda, H., K. Okada, K. Takahashi, and S. Mishiro, 2003: Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 188, 944.
- Matsuura, Y., M. Suzuki, K. Yoshimatsu, J. Arikawa, I. Takashima, M. Yokoyama, H. Igota, K. Yamauchi, S. Ishida, D. Fukui, G. Bando, M. Kosuge, H. Tsunemitsu, C. Koshimoto, K. Sakae, M. Chikahira, S. Ogawa, T. Miyamura, N. Takeda, and T. C. Li, 2007: Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch. Virol.* 152, 1375–1381.
- Meng, X. J., 2010: Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.* 140, 256–265.
- Meng, X. J., 2011: From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety. *Virus Res.* 161, 23–30.
- Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson, 1997: A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 94, 9860–9865.
- Nicand, E., C. Bigaillon, and S. Tessé, 2009: Hépatite E: maladie émergente? *Pathol. Biol.* 57, 203–211.
- Okano, H., T. Nakano, K. Sugimoto, K. Takahashi, S. Nagashima, M. Takahashi, M. Arai, and H. Okamoto, 2013: A high genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *Hepatol. Res.* 44, 694–699.
- Preux, P. M., P. Odermatt, A. Perna, B. Marin, and A. Vergnengre, 2005: A. Qu'est-ce qu'une régression logistique? *Rev. Mal. Respir.* 22, 159–162.
- Prevot, C., and K. Morelle, 2012: Potentiel de dispersion du sanglier et historique de la colonisation de la plaine agricole en Wallonie. *Forêt wallonne* 121, 35–42.
- Purcell, R. H., and S. U. Emerson, 2010: Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.* 202, 819–821.
- Renou, C., A. M. Afonso, and N. Pavio, 2014: Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, france. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1945–1947.
- Reuter, G., D. Fodor, P. Forgach, A. Katai, and G. Szucs, 2009: Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol.* 44, 277–281.
- Riveiro-Barciela, M., B. Minguez, R. Girones, F. Rodriguez-Frias, J. Quer, and M. Buti, 2014: Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.* 49, 165–168.
- Rutjes, S. A., W. J. Lodder, F. Lodder-Verschoor, H. H. van den Berg, H. Vennema, E. Duizer, M. Koopmans, and A. M. de Roda Husman, 2009: Sources of hepatitis E virus genotype 3 in the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 381–387.
- Rutjes, S. A., F. Lodder-Verschoor, W. J. Lodder, J. van der Giesen, H. Reesink, M. Bouwknegt, and A. M. de Roda Husman, 2010: Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in the Netherlands. *J. Virol. Methods* 168, 197–206.
- Smith, D. B., P. Simmonds, S. Jameel, S. U. Emerson, T. J. Harrison, X. J. Meng, H. Okamoto, W. H. Van der Poel, and M. A. Purdy, 2014: Consensus proposals for classification of the family hepeviridae. *J. Gen. Virol.* 96, 1191–1192.
- Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe, and S. Mishiro, 2004: Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330, 501–505.
- Takahashi, M., T. Nishizawa, H. Sato, Y. Sato, D. Jirintai, S. Nagashima, and H. Okamoto, 2011: Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.* 92, 902–908.
- Tamura, K., and M. Nei, 1993: Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.* 10, 512–526.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, and S. Kumar, 2013: MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.
- Tei, S., N. Kitajima, K. Takahashi, and S. Mishiro, 2003: Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362, 371–373.
- Teo, C. G., 2010: Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin. Microbiol. Infect.* 16, 24–32.
- Thiry, D., A. Mauroy, C. Saegerman, I. Thomas, M. Wautier, C. Miry, G. Czaplicki, D. Berkvens, N. Praet, W. van der Poel, R. Cariolet, B. Brochier, and E. Thiry, 2014: Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium. *Vet. Microbiol.* 172, 407–414.

- Thiry, D., A. Mauroy, N. Pavio, M. A. Purdy, N. Rose, E. Thiry, and E. F. Oliveira-Filho, 2015: Hepatitis E virus and related viruses in animals. *Transbound. Emerg. Dis.* doi:10.1111/tbed.12351 [Epub ahead of print].
- Widen, F., L. Sundqvist, A. Matyi-Toth, G. Metreveli, S. Belak, G. Hallgren, and H. Norder, 2011: Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol. Infect.* 139, 361–371.
- Yu, C., C. Zimmerman, R. Stone, R. E. Engle, W. Elkins, G. A. Nardone, S. U. Emerson, and R. H. Purcell, 2007: Using improved technology for filter paper-based blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 142, 143–150.

3.4 Etude 3 :

Infection expérimentale de porcs, par voie intraveineuse ou orale, avec une souche du virus de l'hépatite E (HEV) de sanglier, une souche de HEV porcine et une souche de HEV de sanglier préalablement passée en modèle porcin

PREAMBULE

Les résultats obtenus au cours des deux précédentes études ont permis de montrer que le virus de génotype HEV-3 prédominait dans les populations de porcs et de sangliers en Belgique. L'étude suivante a donc porté sur la transmission potentielle au porc d'une souche de HEV provenant du sanglier (WbHEV) par inoculation intraveineuse ou par voie orale et sur l'étude des conséquences de l'infection du porc par une souche de WbHEV, une souche de WbHEV précédemment passée chez le porc et une souche porcine de HEV après inoculation orale.

Tout d'abord, une infection par voie intraveineuse a été réalisée au cours de laquelle cinq porcelets ont été répartis en deux groupes. Le premier était constitué de trois porcs inoculés avec du WbHEV et le second, de deux porcs inoculés avec un foie de porc négatif envers le HEV. Tous les porcs ont été euthanasiés et autopsiés 8, 9 et 10 jours après l'inoculation. Cette première expérience avait pour objectif d'obtenir suffisamment de virus en vue de réaliser les inoculations par voie orale. Elle a également permis d'étudier l'infectivité d'une souche de HEV-3 provenant du sanglier chez le porc. Ensuite, une infection par voie orale a été réalisée sur 12 porcelets répartis en 4 groupes inoculés respectivement avec une souche de WbHEV, une souche de WbHEV précédemment passée chez le porc, une souche porcine de HEV et un foie de porc HEV négatif. Cette expérience a duré 56 jours. Les échantillons récoltés ont ensuite été analysés par qRT-PCR, ELISA, Western blot et histopathologie.

Le nombre de porcs virémiques était plus faible après infection orale qu'après inoculation intraveineuse. Ce résultat contraste avec la présence du HEV dans les matières fécales des porcs au cours des deux expériences. Les résultats montrent également une propagation du virus dans différents organes après inoculation intraveineuse, mais pas après inoculation par voie orale.

Cette étude fournit la première preuve expérimentale de la propagation précoce du virus dans l'organisme après infection intraveineuse avec une souche de HEV provenant du sanglier et montre qu'une telle souche pourrait être naturellement transmise entre les sangliers et les porcs, mais aussi entre porcs et donc survivre dans la population porcine.

Productive infection in pigs experimentally inoculated intravenously or orally with a wild boar hepatitis E virus (HEV), a swine HEV and a wild boar HEV previously passed in swine

Thiry Damien ⁽¹⁾, Rose Nicolas ⁽²⁾, Mauroy Axel ⁽¹⁾, Paboeuf Frédéric ⁽²⁾, Dams Lorène ⁽¹⁾, Roels Stefan ⁽³⁾, Pavio Nicole ⁽⁴⁾, Thiry Etienne ⁽¹⁾

(1) University of Liège, Liège, Belgium

(2) ANSES - French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Ploufragan, France

(3) CERVA-CODA, Brussel, Belgium

(4) ANSES, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety, Maisons-Alfort, France

Productive infection in pigs experimentally inoculated intravenously or orally with a wild boar hepatitis E virus (HEV), a swine HEV and a wild boar HEV previously passed in swine

Thiry D.¹, Rose N.², Mauroy A.¹, Paboeuf F.³, Dams L.¹, Roels S.⁴, Pavio N.⁵, Thiry E.¹

Place where the work was carried out: ¹ and ²

¹ University of Liège, Faculty of Veterinary Medicine, Department of Infectious and Parasitic Diseases, Fundamental and applied Research for Animals and Health center Veterinary Virology and Animal Viral Diseases, B-4000 Liège, Belgium

² ANSES - Ploufragan/Plouzané Laboratory, Swine Epidemiology and Welfare unit, BP 53, F22440 Ploufragan, France

³ ANSES - Ploufragan/Plouzané Laboratory, SPF pig production for experimentation, BP 53, F22440 Ploufragan, France

⁴ CODA-CERVA, Surveillance, Orientation and Veterinary Support, Groeselenberg 99, B-1180, Brussel, Belgium

⁵ ANSES - UMR 1161 Virology, ANSES, Animal health laboratory, Maisons-Alfort, France ; UMR 1161 Virology, INRA, Maisons-Alfort, France ; UMR 1161 Virology, Alfort National Veterinary School, Maisons-Alfort, France

Corresponding author: Professor Etienne THIRY, etienne.thiry@ulg.ac.be

Abstract:

In Europe, Hepatitis E virus (HEV) genotype 3 strains mainly circulate in swine and wild boar populations and, due to close genetic relationships with human isolates, a zoonotic transmission is suspected. The aim of this study was to investigate the potential transmission of a wild boar-originating HEV strain (WbHEV) to swine by intravenous (IV) or oral inoculation and to study the consequences of infection of a WbHEV strain, a WbHEV strain previously passed in pig and a swine HEV strain after oral inoculation.

Firstly, an intravenous infection was performed in which five piglets were divided in two groups with three pigs inoculated with WbHEV and two pigs inoculated with a HEV-negative swine liver. All pigs were euthanized and necropsied 8, 9 and 10 days post-infection. Secondly, an oral infection was performed on 12 piglets divided on 4 groups inoculated respectively with a WbHEV strain, a WbHEV strain previously passed in swine, a swine HEV strain and a HEV-negative swine liver. This experiment lasted 56 days. Samples were analysed by qRT-PCR, ELISA, Western blot and histopathology.

The number of viraemic pigs was lower after oral infection than after intravenous inoculation. This results contrast with the presence of HEV in pig faeces during the two experiments. The results show also a spread of the virus in different organs after IV inoculation but not after oral inoculation.

This study first provides experimental evidence of the early spread of the virus throughout the organism after IV infection with a HEV strain originating from wild boar and secondly shows that such a strain could be transmitted by the natural route of infection between wild boar and pigs but also between pigs and therefore survive in the pig population.

Keywords : Hepatitis E virus, HEV, Wild boar, Swine, *in vivo*, Swine model, Intravenous, Oral

Introduction

Hepatitis E virus (HEV), belonging to the family *Hepeviridae*, genus *Orthohepevirus*, is a small, non-enveloped virus with a single-stranded, positive sense RNA genome of approximately 7.2 kb (Emerson & Purcell, 2003, Smith *et al.*). According to a new proposed classification, the *Hepeviridae* family contains 2 genera, 5 species (*Orthohepevirus* A, B, C, D and *Piscihepevirus* A) and 9 genotypes (Smith *et al.*, 2014). Genotypes HEV-1 and 2 include only human strains, while genotypes HEV-3 and 4 have also been detected in other species, especially in swine. HEV-1 and 2 are mainly present in developing countries (Aggarwal, 2011a). In Asia, the Middle East and Africa, HEV is a major aetiological agent responsible for human epidemics of viral hepatitis (Nicand, 2009 ; Purcell et Emerson, 2010). The main transmission route in these regions is faecal-oral via contaminated drinking water (Borgen *et al.*, 2008). Genotypes HEV-3 and 4 have been mostly detected in industrialized regions and Asian continent in both humans and animals. An increasing number of animal species have also been recognized as susceptible to HEV or HEV genetically-related viruses (Thiry *et al.*, 2015). Direct zoonotic transmission to human beings followed by symptomatic infections were several times documented with genotype HEV-3 strains infecting uncooked meats from wild boar, deer and pigs infected with HEV (Tei *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2005, Riveiro-Barciela *et al.*, 2014, Christophe *et al.*, 2014). The particular epidemiological role of wild boars in the HEV transmission route has recently been investigated (Schlosser *et al.*, 2014b). In Belgium, the pig breeding is essentially intensive and indoor but some outdoor breeding exists and contact between wild boar and swine is likely to happen.

The aim of this study was, firstly, to investigate the early consequences of intravenous infection of pig with a wild boar HEV strain (WbHEV) and secondly, to study and compare the pathogenicity of a HEV strain isolated from wild boar, a wild boar HEV strain previously passed in swine and a swine HEV strain after oral inoculation, which represents the natural route of infection. Briefly, this study reports experimental evidence of the early spread of the virus throughout the organism after infection with a WbHEV strain and of the capacity of the WbHEV to be transmitted in a natural context of infection.

Materials and methods

Inoculum

A HEV-3 subtype f isolated from the livers of two young wild boars hunted in the same Belgian forest during the same hunting and phylogenetically similar for the analysed sequences (Thiry *et al.*, 2015) was used for the production of inocula for the intravenous and the oral infections, respectively. A HEV negative swine liver collected from a specific pathogen free (SPF) pig was used for production of inocula for negative control groups. The livers were homogenized in an equal volume of PBS, centrifuged at 3000 RPM for 20 min at 4°C and filtrated through 0.45 µm microfilters. Before inoculation, viral particles were quantified by qRT-PCR after RNase treatment with RNaseA, followed by RNase inhibitor (QIAGEN), as previously described (Rogee *et al.*, 2013). This method allowed a better approximation of the number of infectious particles in the inoculum.

Experimental design

The piglets were obtained from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety's SPF pig herd. The herd is known to be HEV-free, thus lacking maternal antibodies against HEV. All piglets were tested free of HEV infection by qRT-PCR and ELISA at the time of inoculation. Experiments were conducted in compliance with the European standards of animal ethics in an approved facility for animal experimentation (C-22-745-1). Adequate measures were taken to minimize pain and discomfort of the animals.

Intravenous infection

The five eight-weeks-old piglets were divided in two groups (Figure 1A). Group 1 included three piglets (A, B and C) inoculated with a wild boar HEV strain (WbHEV). Group 2, representing a negative control, was composed of two piglets (D and E) inoculated with the HEV-free liver homogenate. The experiment was conducted over a period of ten days in biosafety level 3 animal facilities. Pigs were intravenously inoculated via the auricular vein at day 0 with 2 mL, containing either 8.4×10^6 genome equivalent/mL (ge/mL) (group 1) or 0 ge/mL (group 2). Faeces and sera were sampled at days 0, 4, 7, 8, 9 and 10; necropsies were performed at days 8, 9 and 10 post-infection (Table 1).

Oral infection

The 12 piglets were divided in four groups (Figure 1B). Group 3 included three piglets (F, G and H) inoculated with a swine HEV strain (SwHEV), group 4 included three piglets (I, J and K) inoculated with a wild boar HEV strain previously passed in swine (SwWbHEV), group 5 included three piglets (L, M and N) inoculated with a wild boar HEV strain (WbHEV) and group 6 was composed of three piglets (O, P, and Q) inoculated with the HEV-free liver homogenate representing a negative control. The experiment was conducted over a period of 56 days in biosafety level 3 animal facilities. Pigs were orally inoculated via an oesophageal tube at day 0 with 10 mL, containing 4×10^8 , 7×10^7 and 2×10^7 ge/mL respectively for group 3, 4 and 5 or 0 ge/mL for group 6. Sera were sampled at days 0, 8, 15, 22, 29, 36, 43, 50, 56 and faeces were sampled at days 0, 8, 12, 22, 29, 36, 43, 50, 54. Necropsies were performed at days 15 and 56 post-infection (Table 2).

Virological analysis

The qRT-PCR protocol was already described by Jotikhumar et al, 2006 and a standard curve was created from a WbHEV strain (WbHEVL68). A 69 bp fragment was cloned into pGEMt Easy vector (Promega, Leiden, the Netherlands) and the DNA plasmid concentration was measured using a NanoDrop1000 (ThermoScientific, Aalst, Belgium). The amount of molecules was inferred from the later measure using the Avogadro's number and specific molar weight of each of the constituting nucleotides. RNA extractions were performed with the QIAamp Viral RNA kit mini kit (QIAGEN, Antwerpen, Belgium) for the sera, the bile and the faeces and the RNeasy mini kit (QIAGEN, Antwerpen, Belgium) for the organs and tissues. Internal control extraction (10 µl of murine norovirus) was added to each sample. The limit of detection for the qRT-PCR was fixed at 5 ge/µl. Nucleotide homology was determined with the Bioedit software (Hall, 1999).

Serological analysis

Intravenous infection

Sera from days 0, 4, 8, 9 and 10 were analysed in duplicate with a double antigen sandwich ELISA strictly developed for veterinary use (HEV ELISA kit 4.0V, MP

Biomedicals, Illkirch, France) (Thiry *et al.*, 2014, Hu *et al.*, 2008, Rutjes *et al.*, 2010, Bouwknegt *et al.*, 2009).

Oral infection

Sera from days 0, 5, 12, 15, 19, 22, 26, 29, 33, 36, 40, 43, 47, 50 and 56 were analysed in duplicate with the same double antigen sandwich ELISA.

Sera from days 12, 15, 26, 36 and 47 were analysed with a Western blot for the detection of antibodies (Ab) against HEV in humans (recomLine HEV IgG / IgM, MIKROGEN DIAGNOSTIK, Neuried, Germany) and adapted for use with pigs sera by replacing the conjugate of the kit with a conjugate made from a secondary goat polyclonal Ab, reactive against pig IgG (or IgM) and coupled to peroxidase (Abcam, Cambridge, United-Kingdom). Recombinant antigens used in this kit were: N-terminal and C-terminal parts of the ORF2, the entire ORF3 of genotypes 1 and 3, and the middle part of the ORF2 genotype 1. Analysis of the test strips gave a score of between 0 and 11 (≤ 2 = negative; 3 = borderline; ≥ 4 = positive). All scores were blindly calculated by the same researcher. Each strip contained a reaction control band, an antibody class control band and a cut-off (CO) control band. Tests were performed with a 1/1000 or 1/500 dilution of conjugate for respectively IgG or IgM. Three sera from infected pigs and 3 sera from SPF piglets were tested as positive and negative controls, respectively. The tests were carried out on a ProfiBlot T48 (TECAN, Mechelen, Belgium).

Histopathology and biochemical analysis

Aspartate transaminase (AST) (reference value: 31-58 IU (45 ± 14)) and Alanine transaminase (ALT) (reference value: 32-84 IU (61 ± 26)) were measured at days 0, 4, 8, 9 and 10 by a laboratory of medical biology (Laboratoires des Villes Moisan, Ploufragan, France). Histopathology was performed on slices of liver, duodenum, jejunum and colon of all pigs after fixation and haematoxylin-eosin staining.

Results

Intravenous infection

HEV RNA was detected in serum, bile, liver, spleen, duodenum, jejunum, colon, lung, gastro-hepatic lymph nodes and faeces in all group 1 piglets (Table 1). The sequences (270 bp from ORF2) detected in the livers of the inoculated piglets (A, B and C) showed 100 %

nucleotide homology with the inoculum. Pigs from both groups remained seronegative until the end of the experiment.

Hepatic enzymes remained within the normal range. Furthermore, no clinical signs were observed. Histopathological lesions seen in livers from group 1 pigs showed multiple sites of focal infiltration of lymphocytes, plasma cells, eosinophils and macrophages in the portal triads and hepatic sinusoids (Fig. 2A). No histopathological differences were observed between the pigs of both groups in duodenum, jejunum and colon samples.

Oral infection

HEV RNA was detected in serum, bile, liver, gastro-hepatic lymph nodes and faeces in group 3, 4, 5 and in saliva of group 3 and 5 (Table 2). The antibody responses for each pig are showed in the figure 3. Most of HEV inoculated pigs became seropositive at day 15 post-inoculation and one Sw-WbHEV inoculated pig became seropositive at day 12. The ELISA used in this study is able to detect anti-HEV IgM, IgG and IgA without differentiation. In order to determine the time of appearance of IgG, Western blot were performed on sera from groups 3, 4 and 5 at days 12, 15, 26, 36 and 47. The results are shown in figure 3.

Hepatic enzymes remained within the normal range. Furthermore, no clinical signs were observed. HEV inoculated pigs showed infiltration of lymphocytes, plasma cells, eosinophils in the portal areas, interlobular septa and sinusoids. Additionally parenchymal aggregates of lymphocytes, plasma cells and macrophages could be noticed in the parenchyma of the livers (Fig. 2B). No histopathological differences were observed between pigs of both groups in duodenum, jejunum and colon samples.

Discussion

The pattern of infection in pigs was studied for HEV strains originating from wild boar using either intravenous or oral route. The former route allowed the investigation of the spread of these strains in pig organs and tissues. The latter one, mimicking the natural infection, provided data about the susceptibility of pigs for strains originating from wild boar and previously passed in swine.

A G3f HEV strain isolated from a wild boar was able to induce a productive infection in domestic pigs and to be orally transmitted between pigs and spread in a pig population. An especially high prevalence has often been observed in pigs and wild boars (Thiry *et al.*, 2014 ; Thiry *et al.*, 2015). This epidemiological situation, combined with the capacity of the virus to cross the wild boar - pig barrier, raises the question of natural transmission events occurring

between these animals, at least in the context of outdoor breeding. This study investigated the acute phase of infection and especially the distribution of viruses in pigs intravenously inoculated and the consequences of infection with a wild boar HEV strain, a wild boar HEV strain previously passed in swine and a swine HEV strain after oral inoculation. In this study, very low viraemia was observed despite the presence of HEV RNA in faeces after oral inoculation and in serum after intravenous inoculation. The virus was able to spread in different organs after intravenous but not after oral inoculation despite the fact that the inoculum titres were higher after oral than after intravenous infection.

These results allow a better understanding of the pathogenesis of WbHEV infection in pigs and especially complement the interesting data presented in a previous publication (Schlosser *et al.*, 2014a) in the following points.

Firstly, HEV RNA was detected in the serum of all intravenous inoculated pigs between days 8 and 10 in this study but only in one pig on day 11 in Schlosser *et al.* (2014). However, HEV RNA was detected only one time at day 29 in one serum after oral inoculation. This low detection is in agreement with previous studies in which the RNA detection in serum is very low or even not reported (Bouwknegt *et al.*, 2009, Schlosser *et al.*, 2014a, Andraud *et al.*, 2013). Otherwise, HEV RNA was detected in faeces of both intravenous and orally infected pigs.

Secondly, this experiment extends the virus distribution to lungs and gastro-hepatic lymph nodes among other organs in experimentally intravenously infected pigs. However, oral infection was not followed by a virus spread throughout the organism unlike the experiment of Schlosser *et al.* (2014) where HEV RNA was detected on caecum and colon. Nevertheless, HEV RNA was well detected in gastro-hepatic lymph nodes, bile and liver of most pigs. This suggests that viraemia occurred although transiently and with low titres.

The presence of virus in saliva offers a new way of sampling that needs further assessment. It follows closely the fecal excretion and could alternatively be explained by fecal contamination of the saliva.

No seroconversion was detected after intravenous inoculation assuming that a period of at least ten days is necessary to mount an antibody response against WbHEV in this model. Interestingly, seroconversion was observed from day 8 after oral inoculation and all HEV inoculated pigs became seropositive. In order to detect the time of occurrence of the IgG, the sera of pigs from the inoculated group were also tested in Western blot. The isotype switching occurred around day 15 for most of the pigs; anti-HEV IgMs were no longer detected on day

36. The anti-HEV IgM detection could be therefore suitable for the diagnosis of early infection in pigs like its current use in human HEV diagnostic.

Liver lesions that were observed 28 days after IV inoculation in a previous study (Schlosser *et al.*, 2014a), were already present on day 10 as shown after intravenous inoculation. Interestingly, microscopic hepatic lesions were associated with neither clinical signs nor any increase in hepatic enzymes, suggesting that asymptomatic WbHEV infections could be observed in swine up to 10 days after intravenous infection. The lesions are quite similar after either oral or intravenous inoculation.

HEV is considered as a threat for both food industry and public health. This study supports the role of wild boars in HEV transmission to pigs. Oral inoculation model better mimics the natural route of infection than an intravenous model and shows limited spread of the virus in the organism, low viraemia and weak presence of the virus in the organs. These points must be taken in consideration during risk assessment for human contamination in the context of pig product consumption.

Table 1

Hepatitis E virus (HEV) RNA detection in organs and tissues from pigs A, B, C (group 1, inoculated with a wild boar HEV strain) and D, E (group 2, negative controls) ('-': below the limit of detection ; '+': detection ; ND: not determined because euthanized ; DPI: days post-inoculation).

Tissue	DPI	Group 1			Group 2	
		A	B	C	D	E
Sera (ge/ml)	0	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-
	8	4x10 ³	1.2x10 ⁴	2.3x10 ³	-	-
	9	ND	5.4x10 ⁴	ND	-	-
	10	ND	ND	3.3x10 ⁴	-	-
Faeces (ge/g)	0	-	-	-	-	-
	4	6.2x10 ⁵	3.4x10 ⁵	1.8x10 ⁶	-	-
	7	5.8x10 ⁵	9.4x10 ⁵	8.2x10 ⁵	-	-
	8	2.9x10 ⁶	ND	ND	-	-
	9	ND	1.1x10 ⁶	ND	-	-
	10	ND	ND	4.5x10 ⁶	-	-
Liver (ge/g)	Necropsy	6.3x10 ⁶	4.9x10 ⁷	5.8x10 ⁶	-	-
Bile (ge/ml)		1.8x10 ⁶	4.5x10 ⁸	1.4x10 ⁶	-	-
Spleen (ge/g)		3.5x10 ⁴	2.5x10 ⁴	2.2x10 ³	-	-
Kidney		-	-	-	-	-
Brain		-	-	-	-	-
Diaphragmatic pillar		-	-	-	-	-
Femoral biceps		-	-	-	-	-
Psoas major		-	-	-	-	-
Duodenum		6.1x10 ³	5.9x10 ⁴	2.2x10 ⁵	-	-
Jejunum		1.4x10 ⁴	1.9x10 ⁵	7.9x10 ⁴	-	-
Colon		1.4x10 ⁴	8.3x10 ⁵	6.9x10 ⁶	-	-
Lung		3.1x10 ⁵	2.3x10 ⁵	1.3x10 ⁵	-	-
Heart		-	-	-	-	-
Mandibular salivar gland		-	-	-	-	-
Mesenteric lymph nodes		-	-	-	-	-
Gastro-hepatic lymph nodes (ge/g)		1.4x10 ⁵	3.5x10 ⁴	1.2x10 ⁴	-	-

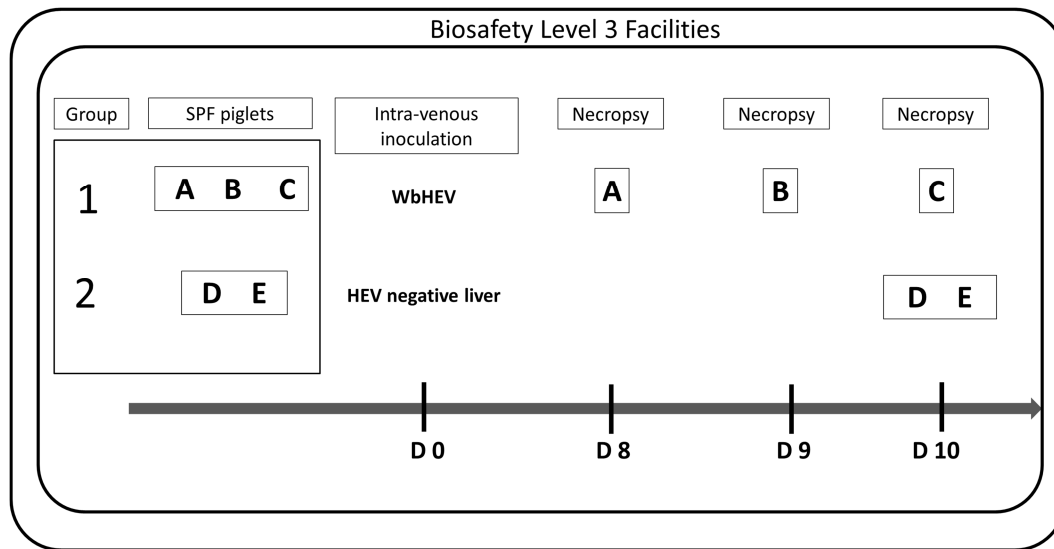
Table 2

Hepatitis E virus (HEV) RNA detection in organs and tissues from pigs F, G, H (group 3, inoculated with a swine HEV strain) ; I, J, K (group 4, inoculated with a wild boar HEV strain previously passed in swine); L, M, N (group 5, inoculated with a wild boar HEV strain) and O, P, Q (group 6, negative controls) ('-': below the limit of detection ; Nd: not determined because euthanized ; DPI: days post-inoculation).

Tissue	DPI	Group 3			Group 4			Group 5			Group 6		
		F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Sera (ge/ml)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	29	-	-	ND	-	1.8x10 ³	ND	-	ND	-	ND	-	-
	36	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	43	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	50	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	56	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
Faeces (ge/g)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	2.2x10 ³	-	-	-
	12	3.6x10 ³	2.5x10 ³	5.4x10 ⁴	-	1.2x10 ⁶	2x10 ⁶	1x10 ⁵	2x10 ⁵	3.2x10 ⁴	-	-	-
	22	-	-	ND	-	1x10 ³	ND	1.3x10 ³	ND	2x10 ³	ND	-	-
	29	-	-	ND	-	-	ND	1.4x10 ³	ND	-	ND	-	-
	36	-	2.7x10 ³	ND	-	-	ND	1.4x10 ³	ND	-	ND	-	-
	43	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	50	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	54	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
Saliva (ge/ml)	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	2.9x10 ³	7x10 ³	-	-	-	-	-	-	8.5x10 ³	-	-	-
	26	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	40	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-
	56	-	-	ND	-	-	ND	-	ND	-	ND	-	-

Tissue	DPI	Group 3			Group 4			Group 5			Group 6		
		F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q
Bile (ge/ml)	Necropsy	-	-	6×10^2	-	-	8.5×10^2	-	1.1×10^4	-	-	-	-
Liver (ge/g)		-	-	-	-	-	4.2×10^4	-	1.1×10^5	-	-	-	-
Gastro-hepatic lymph node (ge/g)		-	-	1.9×10^4	-	-	1.7×10^4	-	1.5×10^4	-	-	-	-
Spleen		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kidney		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brain		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Diaphragmatic pillar		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Femoral biceps		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Psoas major		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Duodenum		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Jejunum		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Colon		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lung		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Heart		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mandibular salivary gland		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mesenteric lymph node		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(A)



(B)

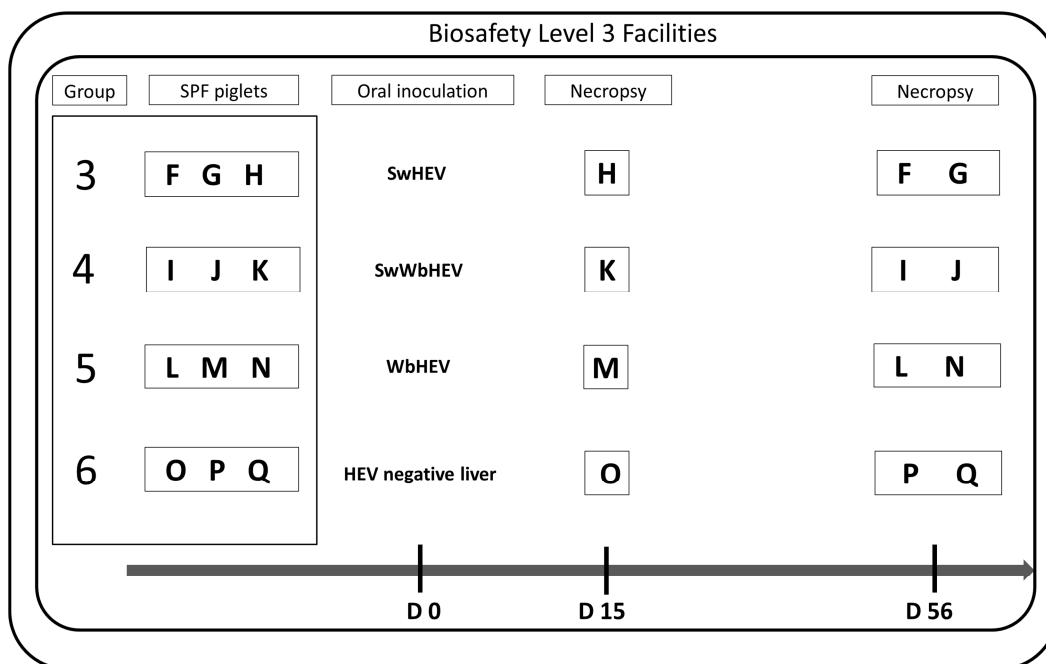


Figure 1. Protocol of the intravenous (A) and oral (B) inoculation experiments (SwHEV: HEV from swine, WbHEV: HEV from wild boar, SwWbHEV: HEV from wild boar previously passed in swine).

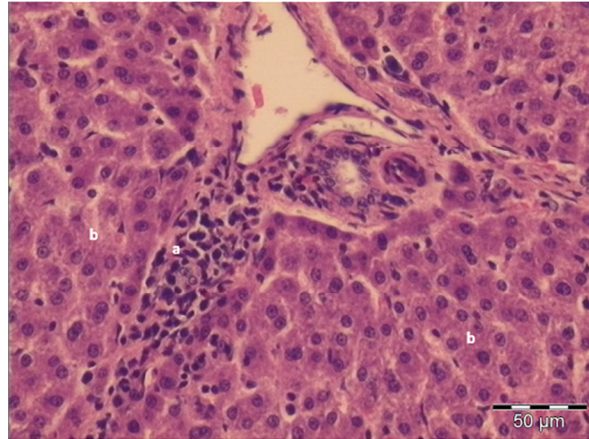
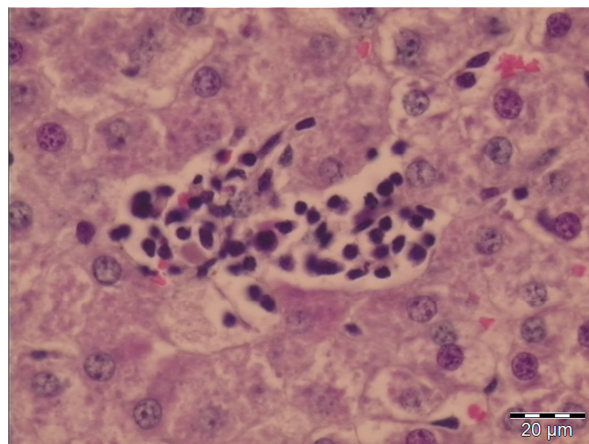
(A)**(B)**

Figure 2. Histopathological picture (haematoxylin-eosin staining) of the liver of a pig inoculated

(A) intravenously with a wild boar HEV strain : multiple sites of focal infiltration of lymphocytes, plasma cells, eosinophils and macrophages in the portal triads and hepatic sinusoids can be seen (a). Hepatocytes show some granular degeneration (b).

(B) orally with a wild boar HEV strain previously passed in swine, There are some multifocal aggregates of lymphocytes, plasma cells and macrophages in the hepatic parenchyme.

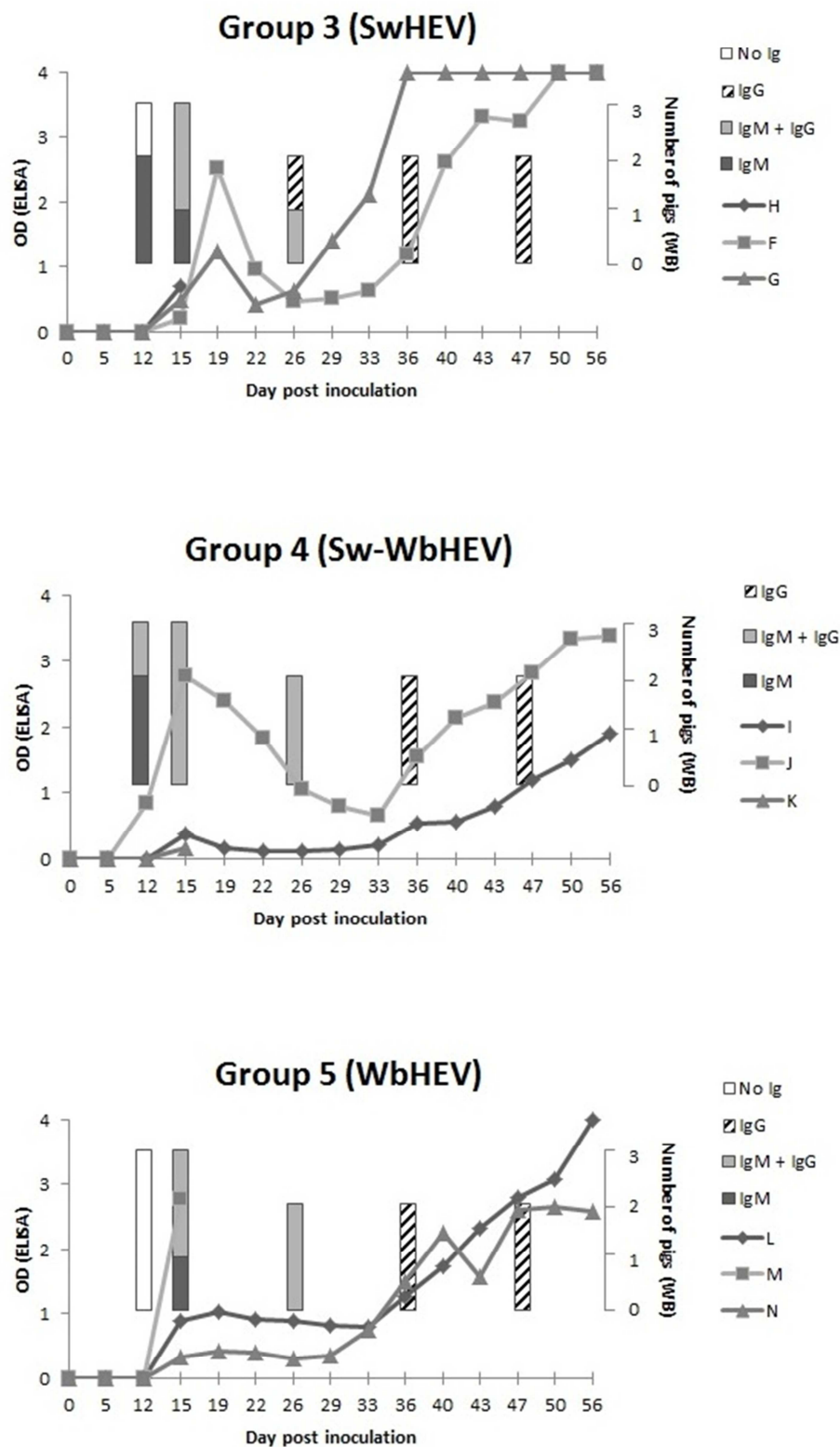


Figure 3. Antibody responses of pigs from groups 3, 4 and 5 after ELISA and Western blot (WB) analysis. Negative control pigs (O, P and Q) remained negative throughout the study. (OD : average optical density from duplicates).

Chapitre 4. Discussion générale

Les résultats de ce travail démontrent, pour la première fois en Belgique, une séroprévalence apparente envers le HEV très élevée chez le porc et élevée chez le sanglier. En outre, les virus identifiés actuellement chez le porc et le sanglier en Belgique sont de génotype HEV-3, à l'exception d'un virus de génotype HEV-4 récemment observé chez le porc dans une autre étude (Hakze-van der Honing *et al.*, 2011). Ces résultats sont à mettre en parallèle avec les virus identifiés de cas autochtones d'hépatite E humaine en Belgique (obtenus dans le cadre du projet HEVEA) qui montrent une prédominance des virus de génotype HEV-3. Ces données plaident en faveur d'un approfondissement de la recherche du caractère zoonotique de l'infection par le HEV chez le porc et le sanglier. La deuxième partie de cette thèse montre la transmission expérimentale du HEV du sanglier au porc. Afin de mieux comprendre cet aspect, le projet a étudié le comportement de souches virales de sanglier en modèle porcin d'infection expérimentale. Ce modèle a été utilisé pour étudier l'infectivité d'une souche sauvage de HEV de sanglier, d'une souche de HEV de sanglier préalablement passée en porc (via inoculation intraveineuse) et d'une souche de HEV de porc. Les deux expériences *in vivo* ont également permis de mesurer les charges virales présentes dans les différents tissus et organes de porcs.

4.1 Infection par le virus de l'hépatite E dans les populations de porcs, de sangliers et de cervidés en Belgique

Des valeurs élevées de séroprévalence ont été observées chez les suidés (porc domestique et sanglier) en Belgique et en Région Wallonne. En effet, 73 % (95 % CI 68,8 - 77,5) des sérums de porcs analysés par ELISA ont été révélés positifs en IgG et / ou IgM et / ou IgA anti-HEV. Chez le sanglier, une séroprévalence plus faible mais néanmoins très élevée de 34 % (95 % CI 29,71 - 39,46) a été observée avec la même méthodologie que celle utilisée pour le porc domestique. Chez les cervidés, contrairement aux suidés domestiques et sauvages, des séroprévalences très faibles ont été détectées, 1 % (95 % CI 0 – 2,4) chez le cerf et 3 % (95 % CI 0,8 – 4,2) chez le chevreuil.

Lorsque l'on compare ces séroprévalences à celles observées dans d'autres régions européennes, et malgré des méthodes d'échantillonnage très différentes, la situation est similaire chez le sanglier ainsi que chez le porc domestique. En effet, chez le porc

domestique, des séroprévalences d'élevage et individuelle de respectivement 65 % et 31 % ont été observées en France (Rose *et al.*, 2011). Les valeurs de séroprévalence individuelle suivantes ont été obtenues dans différents pays : de 49,8 % et 46,9 % en Allemagne (Baechlein *et al.*, 2010 ; Krumbholz *et al.*, 2013), de 68 % aux Pays-Bas (Rutjes *et al.*, 2010) et de 87 % en Italie (Di Bartolo *et al.*, 2011).

Chez le sanglier, les principales séroprévalences envers le HEV rapportées dans la littérature sont les suivantes : 29,9 % en Allemagne (Adlhoch *et al.*, 2009), 12 % aux Pays-Bas (Rutjes *et al.*, 2010), 14 % en France (Carpentier *et al.*, 2012), 10,2 % en Italie (Martinelli *et al.*, 2013), 26,5 % et 57,4 % en Espagne (Boadella *et al.*, 2012 ; Kukielka *et al.*, 2015). Une étude plus spécifique réalisée dans le sud-ouest de la France montre une séroprévalence générale dans la faune sauvage (sangliers, lapins sauvages et cerfs) de 3,3 % (8/246), ce qui est similaire à la séroprévalence relevée chez le porc dans la même région (Lhomme *et al.*, 2015).

La situation chez les cervidés en Belgique est, quant à elle, assez différente des observations réalisées dans les autres régions où la présence d'anticorps anti-HEV a été étudiée chez ces animaux. Au Japon, de faibles séroprévalences ont été observées chez le cerf Sika (*Cervus nippon*) qui est cependant considéré comme un hôte accidentel du HEV (Matsuura *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2007). En Europe, quelques études réalisées sur le cerf élaphe (*Cervus elaphus*) et le chevreuil (*Capreolus capreolus*) ont suggéré que ces animaux pouvaient constituer un hôte réservoir de HEV (Rutjes *et al.*, 2009 ; Reuter *et al.*, 2009). Chez le cerf élaphe, des séroprévalences de 10,4 % et 12,85 % en Espagne (Boadella *et al.*, 2010 ; Kukielka *et al.*, 2015), de 14 % en Italie (Di Bartolo *et al.*, 2015) et de 5 % aux Pays-Bas (Rutjes *et al.*, 2010) ont été observées. Aucun cerf ni aucun chevreuil séropositif n'a été mis en évidence en Pologne (Larska *et al.*, 2015). Malgré les différences existant entre les pays, il est important de tenir compte du fait que les protocoles des études ne sont pas semblables et que les tests utilisés peuvent présenter des différences en termes de sensibilité et de spécificité. Par ailleurs, les bornes supérieures des intervalles de confiance de la séroprévalence du HEV obtenus dans notre étude sont de 2,4 % chez le cerf et 4,2 % chez le chevreuil, valeurs s'approchant de la séroprévalence observée aux Pays-Bas.

L'ensemble de ces résultats, qu'ils soient élevés ou faibles, se devait d'être confirmé, d'un point de vue épidémiologique, par des analyses complémentaires afin de s'assurer que les observations actuelles correspondent à la situation épidémiologique réelle. Un Western blot (WB) destiné au diagnostic humain a donc été adapté pour utilisation chez ces différentes espèces afin de s'assurer que les résultats obtenus par ELISA correspondent à la situation réelle, autant dans notre étude que dans l'ensemble des études menées dans la littérature. Le WB est régulièrement utilisé comme test de confirmation et, en particulier, dans le cas du HEV chez l'homme. Dans le passé, il a été utilisé pour estimer la séroprévalence réelle chez l'homme après différents degrés d'exposition aux porcs (Bouwknegt *et al.*, 2008). Dans le cadre de notre étude, le WB a été utilisé comme test de référence pour l'analyse de courbes ROC chez le porc et le sanglier. Différentes analyses de scénarios faisant varier la spécificité de l'ELISA relative au WB ont également été proposées chez le sanglier et le porc.

Selon les différents scénarios analysés chez le porc, les séroprévalences estimées étaient comprises entre 69 et 81 %. Ces valeurs restent donc très élevées et correspondent à la situation observée dans les populations de porcs en Europe. Suite à l'analyse des courbes ROC réalisées selon ces différents scénarios, une classification erronée de quelques sérums, positifs en ELISA mais négatifs lors du WB, pourrait s'expliquer par la plus faible spécificité de l'ELISA par rapport au WB. Cependant, l'ELISA reste une méthode de choix pour le screening de masse dans de grandes populations telle que la population porcine en Belgique. Le WB utilisé dans cette étude a été validé pour détecter des anticorps reconnaissant différents épitopes du HEV des génotypes HEV-1 et 3 (RecomLine HEV IgG / IgM, Mikrogen Diagnostik, Neuried, Germany). Cependant, le WB s'est montré également capable de détecter les anticorps dirigés contre le génotype HEV-4 d'un contrôle positif. Ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les différents virus HEV appartiennent à un seul sérotype (Engle *et al.*, 2002). La très haute séroprévalence observée chez le porc domestique pourrait être expliquée par différents facteurs. En effet, le mode d'élevage intensif, l'entrée de nouveaux animaux (reproducteurs) dans les exploitations ainsi que la résistance du HEV dans le milieu extérieur et donc son maintien dans les loges entre les lots pourraient favoriser la transmission du virus entre individus. Une autre cause pourrait être la transmission verticale ou horizontale du virus de la mère au fœtus ou au porcelet qui peut lui-même, par après, transmettre le virus à ses congénères (De Deus *et al.* 2008a ; Hosmillo *et al.* 2010). Cependant, la transmission verticale est controversée : une étude expérimentale ne l'a pas

mise en évidence suite à l'inoculation intraveineuse de truies gestantes (Kasorndorkbua *et al.* 2003).

Les analyses de scénarios réalisées chez le sanglier ont permis de montrer que la séroprévalence estimée par l'ELISA restait élevée quelle que soit la spécificité de l'ELISA relative au WB. En effet, ces séroprévalences étaient comprises entre 27 et 65 %.

Une différence significative a été observée entre les taux de séroprévalence de HEV selon les données de tirs qui sont considérées comme les meilleures approximations des tailles de population en faune sauvage (Hagen *et al.*, 2014 ; Massei *et al.*, 2014). La zone avec une densité comprise entre 46,5 et 63,2 sangliers par 1000 ha contenait moins d'animaux séropositifs que la zone de référence avec une densité comprise entre 0,3 et 16 sangliers par 1000 ha. Ces résultats surprenants pourraient être dus au fait que la densité de tir n'est qu'une estimation et non une densité réelle de population. Ils pourraient également être dus à la présence de barrières physiques compartimentant les territoires et diminuant ainsi les contacts entre sangliers dans les zones à plus forte densité. Une autre hypothèse serait un affouragement plus conséquent en zone à faible densité et donc une augmentation des contacts sur les sites de nourrissage favorisant les contaminations. D'autre part, la zone avec un nombre inférieur de sangliers séropositifs est proche de la France où des taux de séroprévalence faibles ont été observés, notamment dans le nord (7,3 %) (Carpentier *et al.*, 2012). La zone de densité de référence est proche de l'Allemagne, où une séroprévalence plus élevée a été observée (29,9 %) (Adhloch *et al.*, 2009). Ces résultats suggèrent que les taux de séroprévalence envers le HEV chez les sangliers sont liés aux massifs forestiers traversés par des frontières nationales. Ces données confirment la nécessité d'études supranationales afin de comprendre la propagation du virus dans les populations de sangliers.

Chez les cervidés, malgré un manque de concordance entre l'ELISA et le WB, l'observation de résultats positifs dans l'ensemble des tests confirme que l'infection a bien eu lieu et que le virus circule dans ces espèces. Ces résultats montrent qu'une combinaison des tests ELISA et WB pourrait augmenter la sensibilité et la spécificité de la détection d'anticorps dans la faune sauvage lorsque de faibles séroprévalences sont observées.

Le WB utilisé dans ces études est initialement destiné à la recherche des anticorps anti-HEV dans le sérum humain. Cependant, ce test permet la détection d'anticorps anti-HEV de génotype HEV-3 dans les sérums de porcs, de sangliers et de cervidés après adaptation des anticorps conjugués. Les différences détectées entre les résultats de l'ELISA et du WB pourraient être dues à la présence d'IgA anti-HEV que le WB ne détecte pas, même si les taux d'IgA anti-HEV sériques sont faibles chez le porc (Markowska-Daniel *et al.*, 2010). En effet, les IgA anti-HEV peuvent se retrouver dans le sérum humain, jusqu'à 5 mois post-infection (Osterman *et al.*, 2013).

En conclusion, les séroprévalences retrouvées chez ces différentes espèces en Belgique montrent que les sangliers et les porcs doivent jouer un rôle épidémiologiquement important dans la transmission du HEV, comme cela semble le cas dans d'autres régions. Les cervidés semblent quant à eux représenter des hôtes accidentels du virus en Belgique alors qu'ils sont considérés comme réservoir dans plusieurs autres régions.

Les résultats virologiques obtenus chez le porc sont de 4 sérums positifs en PCR sur 420 sérums testés. Ce faible nombre de positifs par rapport à la séroprévalence observée peut s'expliquer par l'âge des porcs lors du prélèvement : ces derniers avaient moins de 6 mois mais probablement plus de 2 à 4 mois, âge qui correspond au pic de virémie habituellement observé (Takahashi *et al.*, 2005 ; de Deus *et al.*, 2008 ; Kaba *et al.*, 2009). Un contrôle négatif a été inséré lors de chaque extraction d'ARN et un contrôle interne d'extraction a également été inséré dans chaque échantillon testé. Cependant, une interférence du contrôle interne sur la PCR, une mauvaise conservation des échantillons ou un manque de sensibilité de la RT-PCR nichée ne peuvent pas être complètement éliminés.

Ces différentes données de viroprévalences paraissent faibles en comparaison avec les séroprévalences retrouvées chez les sangliers et les porcs. Ces valeurs faibles pourraient être seulement dues au fait que la virémie est de courte durée et survient tôt dans la vie de l'animal.

Au sein de la faune sauvage, l'ensemble des souches de HEV détectées appartiennent également au génotype HEV-3 et les fragments génomiques séquencés présentent une grande homologie entre eux et avec ceux séquencés chez le porc et l'homme en Belgique. Ceci

amène évidemment la question de la transmission directe, indirecte ou via les denrées alimentaires contaminées, de ces souches entre les suidés, et dans une moindre mesure les cervidés, et l'homme. De plus, en Belgique et en particulier en Région Wallonne, des exploitations porcines en plein air se situent à proximité de régions denses en sangliers. La transmission du virus entre sanglier, porc et homme vient d'être mise en évidence récemment au Japon, en Espagne et en France (Riveiro-Barciela *et al.*, 2014 ; Renou *et al.*, 2014 ; Li *et al.*, 2005). De plus, un haut degré de proximité génétique a été démontré entre des souches de HEV d'origines porcine, humaine et de sanglier en Suède (Widen *et al.*, 2011). En termes de prévention de cette transmission, les bonnes pratiques d'élevage conseillent la pose d'une double clôture d'une hauteur minimale de 1,2 m et le maintien des truies en chaleur à l'intérieur mais ces règles ne sont pas légiférées. La transmission entre suidés sauvages et domestiques n'est donc pas à exclure dans nos régions, ceci pouvant rendre difficile un projet d'éradication du virus au sein des exploitations porcines.

D'un point de vue phylogénétique, les études ont été réalisées sur un fragment de 302 pb situé à l'extrémité 5' de l'ORF2 et fortement conservé entre les différentes souches de HEV (Lu *et al.*, 2006). La plupart des séquences humaines obtenues dans cette étude se regroupent au sein du génotype HEV-3 sous-type f au même titre que les séquences de HEV porcines. Le potentiel zoonotique de ces souches est particulièrement soupçonné au vu des homologies nucléotidiques élevées entre chacune de ces souches. Les différents arbres phylogénétiques générés avec la méthode « maximum likelihood » ont été réévalués par la méthode « neighbor-joining ». Les arbres obtenus étaient comparables bien que les valeurs de certains *bootstrap* restaient faibles. D'autre part, des alignements des amorces utilisées dans cette étude et permettant le génotypage, avec des séquences de HEV de génotypes HEV-5 et 6 ont montré qu'elles pouvaient distinguer phylogénétiquement les génotypes HEV-1, 2, 3, 4, 5 et 6.

La différence apparente existant entre la séroprévalence très élevée retrouvée chez les porcs domestiques et la relativement faible séroprévalence relevée chez l'homme dans la plupart des régions d'Europe occidentale, quoique difficile à expliquer, peut trouver son explication dans les caractéristiques régionales, les habitudes alimentaires, la profession ou les loisirs qui favorisent l'exposition au HEV au contact avec les suidés (Colson *et al.*, 2010, Krumbholz *et al.*, 2012). De plus, il faut tenir compte de la possible sous-estimation des cas

car les infections humaines asymptomatiques ne sont pas habituellement diagnostiquées (Mansuy *et al.*, 2012).

De façon similaire, chez les sangliers et les cervidés, la plupart des souches détectées appartiennent au génotype HEV-3 sous-type f. Ces résultats supportent également le potentiel zoonotique du virus en Belgique.

Le génotype HEV-4 n'a pas été mis en évidence dans cette étude. Sa présence ne peut cependant pas être exclue chez le porc en Belgique car il a été détecté lors d'une étude précédente réalisée en collaboration avec les Pays-Bas (Hakze-van der Honing *et al.*, 2011). Chez le sanglier, la plupart des souches isolées dans le monde sont de génotype HEV-3 (Meng, 2010). Cependant, des séquences de HEV spécifiques du sanglier et appartenant à de nouveaux génotypes (HEV-5 et 6) ont été découvertes au Japon (Takahashi *et al.*, 2011 ; Smith *et al.*, 2014). L'existence d'autres génotypes et d'autres sous-types chez les cervidés et les suidés en Belgique ne peut cependant pas être exclue étant donné le faible nombre d'animaux chez lesquels de l'ARN viral a été retrouvé.

En conclusion, les séroprévalences élevées retrouvées chez le porc et le sanglier ainsi que les relations phylogénétiques très étroites observées entre les différents virus détectés plaident en faveur d'une transmission zoonotique. Les résultats obtenus au cours de cette étude ne permettent pas d'en apporter la preuve car, en effet, l'unique espoir d'en apporter les éléments de causalité en Belgique au cours de ce travail résidait dans le cas d'une exploitation flamande où l'éleveur avait été infecté par un HEV de génotype HEV-3. Un échantillonnage représentatif de l'élevage concerné a été réalisé et aucun prélèvement n'est cependant apparu positif en ELISA et PCR (données non présentées dans cette thèse). Si un réservoir est défini comme « un(e) ou plusieurs environnement(s) ou population(s) épidémiologiquement connecté(e)s dans le(s)quel(les) un agent pathogène peut se maintenir et du(des)quel(les) l'infection peut être transmise aux espèces cibles » (Haydon *et al.*, 2002), les populations de porcs et de sangliers peuvent donc être considérées comme des réservoirs de HEV en Belgique. La démonstration récente de l'infection chronique du sanglier par le HEV-3 apporte un élément supplémentaire dans la compréhension de la survie du virus dans les populations de sangliers (Schlosser *et al.*, 2015). Le réservoir animal du HEV en Belgique semble donc représenté par les suidés et non par les cervidés, cependant, une étude de circulation

prolongée du virus dans ces populations devrait être réalisée pour confirmer leur rôle de réservoir.

4.2 Réceptivité du porc à l'infection par le virus de l'hépatite E originaire du porc ou du sanglier

Le comportement de l'infection par le HEV chez les porcs a été étudié pour des souches de HEV provenant de sangliers et de porcs en utilisant soit la voie intraveineuse soit la voie orale. La voie intraveineuse a permis l'étude de la propagation précoce de ces souches dans les organes et les tissus de porcs infectés. La voie orale, imitant l'infection naturelle, a fourni des données quant à la réceptivité des porcs envers des souches provenant de sanglier et préalablement passées chez le porc.

Une souche de HEV de génotype HEV-3 et sous-type f isolée d'un sanglier est capable d'induire une infection productive chez les porcs domestiques, d'être transmise oralement entre porcs et de se propager dans une population porcine. Dans les pays européens, le HEV a été détecté chez plusieurs espèces. Une prévalence particulièrement élevée a souvent été observée chez les porcs et les sangliers (Thiry *et al.*, 2014 ; 2015). Cette situation épidémiologique, combinée à la capacité du virus à traverser la barrière sanglier - porc, soulève la question des événements de transmissions naturelles se produisant entre ces animaux, en particulier dans le contexte de l'élevage porcin en plein air.

Les expériences *in vivo* réalisées au cours de ce travail de thèse ont permis d'examiner la phase aiguë de l'infection et, en particulier, la distribution du virus chez les porcs inoculés par voie intraveineuse et l'infectivité d'une souche de HEV de sanglier, d'une souche de HEV de sanglier précédemment passée chez le porc et d'une souche de HEV porcine après inoculation par voie orale. Dans cette étude, une virémie très faible a été observée en dépit de la présence d'ARN du HEV dans les matières fécales après inoculation par voie orale. Une virémie plus marquée était cependant présente après l'infection intraveineuse. Le virus est capable de se propager dans les différents organes après inoculation intraveineuse, mais cette propagation semble nettement plus faible après inoculation par voie orale et ceci malgré le fait que les titres des inocula étaient plus élevés lors de l'infection orale que lors de l'inoculation

intraveineuse. La plupart des études d'infection expérimentale de porc par du HEV-3 porcin réalisées auparavant ont également montré que la voie intraveineuse provoque une virémie moins fugace que la voie orale (Halburg *et al.*, 2001 ; Kasorndorkbua *et al.*, 2004 ; Feagins *et al.*, 2008 ; Bouwknecht *et al.*, 2009 ; Andraud *et al.*, 2013 ; Schlosser *et al.*, 2014) ; en outre, un certain nombre de ces études ne rapportent pas de test de virémie (Tableau 1).

Tableau 1. Comparaison des principaux résultats obtenus après infections expérimentales de suidés avec du HEV de génotype HEV-3 ou 4 d'origine humaine, porcine ou de sanglier (PID₅₀ = 50% pig infectious dose ; MID₅₀ = 50% monkey infectious dose ; MF : matières fécales ; ND : non déterminé ; IV : intraveineuse ; B : bile ; Ca : caecum ; Cv : cerveau ; Co : cœur ; C : colon ; D : duodénum ; F : foie ; GB : ganglion bronchique ; GH : ganglion gastro-hépatique ; GM : ganglion mandibulaire ; I : iléon ; J : jéjunum ; M : muscle ; O : ovaire ; P : poumon ; Ra : rate ; Re : rein ; Rec : rectum ; T : tonsille ; Ut : utérus ; V : vessie).

Etude	Animal	Génotype	Hôte de départ	Voie d'inoculation	Quantification de l'inoculum	Durée totale de l'expérience (jour)	Virémie (jour post-infection)	Virus dans MF (jour post-infection)	Virus dans les organes et sécrétions	Séroconversion
Halbur <i>et al.</i> , 2001	Porc	HEV-3	Porc	IV	$10^{4.5}$ PID ₅₀ = 3x10 ⁴ eg	55	7	7	F, B	14 (IgG)
		HEV-3	Homme		$10^{4.5}$ MID ₅₀ = 3x10 ⁴ eg		7	7	F, B	14 (IgG)
Kasorndorkbua <i>et al.</i> , 2004	Porc	HEV-3	Porc	IV	10^6 eg	56	5	3	ND	28 (IgG)
				Contact direct			21	+		56 (IgG)
				Exposition aux sécrétions nasales et d'amygdales de porcs infectés	Nd		Nulle	Nulle		Nulle
				Transmission par aiguille	Nulle		Nulle	Nulle		
				Gavage oral avec MF de porcs infectés	Nulle		±11	56 (IgG)		
Bouwknegt <i>et al.</i> , 2008 Bouwknegt <i>et al.</i> , 2009	Porc	HEV-3	Porc	IV	2x10 ⁴ eg - 10 ⁴ eg	55-70	22	3	B, F, Ra, Re, I, J, C, M, T, GM, GB, GH	Nd
Contact (1 ^{ère} génération)					ininterprétable		9 - 17	F, Re, U, M, ND		
Contact (2 ^{ème} génération)				Nd			3 - 9	B, F, Ra, Re, J, C, U, M, GM, GB, GH		
Contact (3 ^{ème} génération)							6 - Nulle	M, F		
Casa <i>et al.</i> , 2009	Porc	HEV-3	Porc	IV	2x10 ⁵ eg	28	Nulle	3	B	21 (IgG)
				Orale	2x10 ⁵ eg	64	Nulle	22	B	43 (IgG)
Feagins <i>et al.</i> , 2008	Porc	HEV-3	Homme	IV	10 ³ MID ₅₀	56	14	3	B, F	14
		HEV-4		IV	10 ³ MID ₅₀		14	3	B, F	14
Andraud <i>et al.</i> , 2013	Porc	HEV-3	Porc	Orale	10 ⁹ eg	44	Nd	3	ND	Nd
				Contact direct	Nd			15		
				Contact indirect	Nd			31		
Schlosser <i>et al.</i> , 2014	Sanglier	HEV-3	Sanglier	IV	4x10 ⁷ eg	28	17	3	B, F, Ra, Re, D, J, I, Ca, C, P, Rec, Co, Cv, M, O, Ut, GM	17
	Porc		Sanglier	IV	4x10 ⁷ eg		11	5	B, F, Ra, Re, D, J, I, Ca, C, Rec, Ut	14
	Sanglier		Sanglier	Contact direct	Nd		28	7	B, F, Ra, D, J, I, Ca, C, Rec, Co	25
	Porc		Sanglier	Contact direct	Nd		Nulle	10	F, V, Ca, C	28
Thiry <i>et al.</i>	Porc	HEV-3	Sanglier	IV	1,6x10 ⁷ eg	10	8	4	B, F, Ra, D, J, C, P, GH	Nulle
			Porc	Oral	4x10 ⁹ eg	56	Nulle	12	B, F, GH	12 (IgM) 15 (IgG)
			Sanglier	Oral	2x10 ⁸ eg		Nulle	8		15 (IgM, IgG)
			Sanglier + porc	Oral	7x10 ⁸ eg		29	12		12 (IgM, IgG)

Ces résultats permettent une meilleure compréhension de l'infection par une souche de HEV originaire du sanglier chez les porcs et complètent les données présentées dans une publication précédente (Schlosser *et al.*, 2014), constituant l'étude *in vivo* se rapprochant le plus de la nôtre, concernant les points suivants.

Tout d'abord, l'ARN du HEV a été détecté dans le sérum de tous les porcs inoculés par voie intraveineuse entre les jours 8 et 10 dans la présente étude, alors que seulement un porc présentait de l'ARN dans le sérum au jour 11 dans l'étude de Schlosser et collaborateurs (2014). L'inoculum utilisé par Schlosser et collaborateurs (2014) contenait de l'ordre de 4×10^7 eg d'ARN, l'inoculum utilisé dans notre étude contenait $1,6 \times 10^7$ eg. Cependant, après inoculation par voie orale, l'ARN du HEV n'a été détecté qu'une seule fois au jour 29 dans le sérum. Cette faible détection est en accord avec des études précédentes dans lesquelles la détection de l'ARN dans le sérum est très faible, voire non étudiée lors d'inoculation par voie orale (Tableau 1). Par contre, bien que la détection de la virémie soit faible et très inégale, l'ARN a été détecté dans les matières fécales des porcs, qu'ils soient infectés par voie intraveineuse ou par voie orale.

Deuxièmement, malgré cette très faible détection de virémie après inoculation par voie orale dans notre étude, l'ARN a été détecté dans les nœuds lymphatiques gastro-hépatiques, dans la bile et dans le foie de la plupart des porcs inoculés. L'expérience de Schlosser et collaborateurs (2014) a mis en évidence de l'ARN également dans le caecum et le côlon. Ces résultats suggèrent que, après inoculation par voie orale, une virémie se développe, transitoire et à faible titre mais néanmoins suffisante pour infecter le foie et les nœuds lymphatiques.

Chez les porcs inoculés par voie intraveineuse, l'infection virale a été détectée dans le foie, la bile, la rate, le duodénum, le jéjunum, le côlon, les poumons et les nœuds lymphatiques gastro-hépatiques, ce qui permet d'augmenter le nombre d'organes dans lesquels cette infection est mise en évidence par rapport à l'expérience de Schlosser et collaborateurs (2014) qui n'a pas recherché la présence du virus dans les poumons et les ganglions lymphatiques gastro-hépatiques. La présence du virus dans ces différents organes et tissus ne permet cependant pas de déterminer s'il s'agit d'une simple présence ou si une réplication virale est active dans ces tissus. Des analyses d'immunohistochimie ont été réalisées sur les foies mais les résultats obtenus n'ont pas pu être interprétés, vraisemblablement à cause de la qualité des anticorps anti-HEV utilisés.

La présence du virus dans la salive après inoculation orale offre une nouvelle façon d'échantillonner des populations porcines. Cependant, son évaluation doit être plus poussée. En effet, elle suit de très près l'excrétion fécale et pourrait donc également être expliquée par une contamination fécale de la salive.

Aucune séroconversion n'a été détectée après l'inoculation par voie intraveineuse, supposant qu'une période d'au moins dix jours est nécessaire pour monter une réponse en anticorps contre le WbHEV dans ce modèle. Cette observation peut être appuyée par le travail de Kasorndorkbua et collaborateurs (2004) qui ont montré qu'une période d'au moins 28 jours était nécessaire avant l'apparition d'une séroconversion après inoculation intraveineuse de HEV porcin. Fait intéressant, la séroconversion a été observée dès le jour 8 après l'inoculation par voie orale et tous les porcs inoculés avec du HEV sont devenus séropositifs. Afin de détecter le moment d'apparition des IgG, les sérums de porcs des groupes inoculés par le HEV ont également été testés en WB. La commutation isotypique a eu lieu autour du jour 15 post-inoculation pour la plupart des porcs. Les IgM anti-HEV n'étaient plus détectées à partir du jour 36. La détection des IgM anti-HEV pourrait donc être utilisée pour le diagnostic d'infection précoce chez les porcs comme c'est le cas, actuellement, dans le diagnostic du HEV humain.

Les lésions hépatiques qui ont été observées au jour 28 post-inoculation par voie intraveineuse dans une étude précédente (Schlosser *et al.*, 2014), sont déjà présentes au jour 10 comme l'indiquent nos résultats obtenus suite à l'inoculation intraveineuse. Les lésions histopathologiques hépatiques n'induisent ni signes cliniques ni augmentation des enzymes hépatiques, ce qui suggère que les infections asymptomatiques à WbHEV ont pu être observées chez le porc jusqu'à 10 jours après l'infection intraveineuse. Les lésions observées après l'inoculation par voie orale ou intraveineuse sont assez semblables.

Le HEV peut être considéré comme un danger pour l'industrie alimentaire et la santé publique. Ces différentes études renforcent le rôle des sangliers dans la transmission du HEV au porc. Le modèle d'inoculation orale permet de mieux imiter la voie naturelle de l'infection que le modèle par voie intraveineuse et de montrer la propagation limitée du virus dans l'organisme, la faible virémie et la faible présence du virus dans les organes. Ces points

doivent être pris en considération lors de l'évaluation des risques d'infection de l'homme par le HEV dans le contexte de la consommation de produits à base de porc.

4.3 Modèle conceptuel de la transmission du virus de l'hépatite E en Belgique

En finalité à ce travail, un modèle conceptuel de la transmission du HEV en Belgique, basé sur des modèles déjà existants (Kamar *et al.*, 2012 ; Van der Poel, 2013) a été établi (Figure 6) en tenant compte des différences d'hôtes pour les virus des 4 génotypes observés jusqu'à présent en Belgique : HEV-1 et HEV-2 chez l'homme, HEV-3 chez l'homme, les suidés domestiques et sauvages et chez les cervidés et HEV-3 et 4 chez le porc et l'homme.

Le premier axe abordé est la transmission des virus des 4 génotypes humains (HEV-1, 2, 3 et 4) à l'homme. Ce dernier pourrait être infecté par l'ensemble de ces génotypes via plusieurs matrices ou hôtes du virus.

La première voie est la contamination humaine fécale-orale. Le HEV peut également être transmis à l'homme via l'eau de boisson en cas de contamination de cette dernière et un mauvais, voire une absence de traitement de cette eau. Les denrées alimentaires nécessitant une irrigation ou ayant été lavées avec une eau contaminée peuvent également représenter une source d'infection. Plusieurs études ont montré que le virus (essentiellement le génotype HEV-1) peut également se transmettre par voie verticale de la mère au fœtus avec des conséquences graves pour l'enfant (Krain *et al.*, 2014). Enfin, le virus présent dans une eau contaminée peut s'accumuler via la bio-accumulation au sein des mollusques bivalves (Li *et al.*, 2011 ; Crossan *et al.*, 2012) qui, non ou mal cuits, sont capables de transmettre le HEV à l'homme.

D'autre part, l'homme peut s'infecter lors de transfusion sanguine (Khuroo *et al.*, 2015), lors de l'administration intraveineuse de drogues (Christensen *et al.*, 2002) ou lors de voyage en zone endémique, voire hyperendémique. La présence endémique de virus HEV dans des troupeaux de porcs miniatures destinés à la xénotransplantation pose le risque de transmission du virus au patient (Denner *et al.*, 2015). Une autre voie hypothétique de transmission peut être mentionnée : l'administration de produits pharmaceutiques d'origine porcine tels l'héparine et la pancréatine (EMA, 2013 ; Crossan *et al.*, 2013).

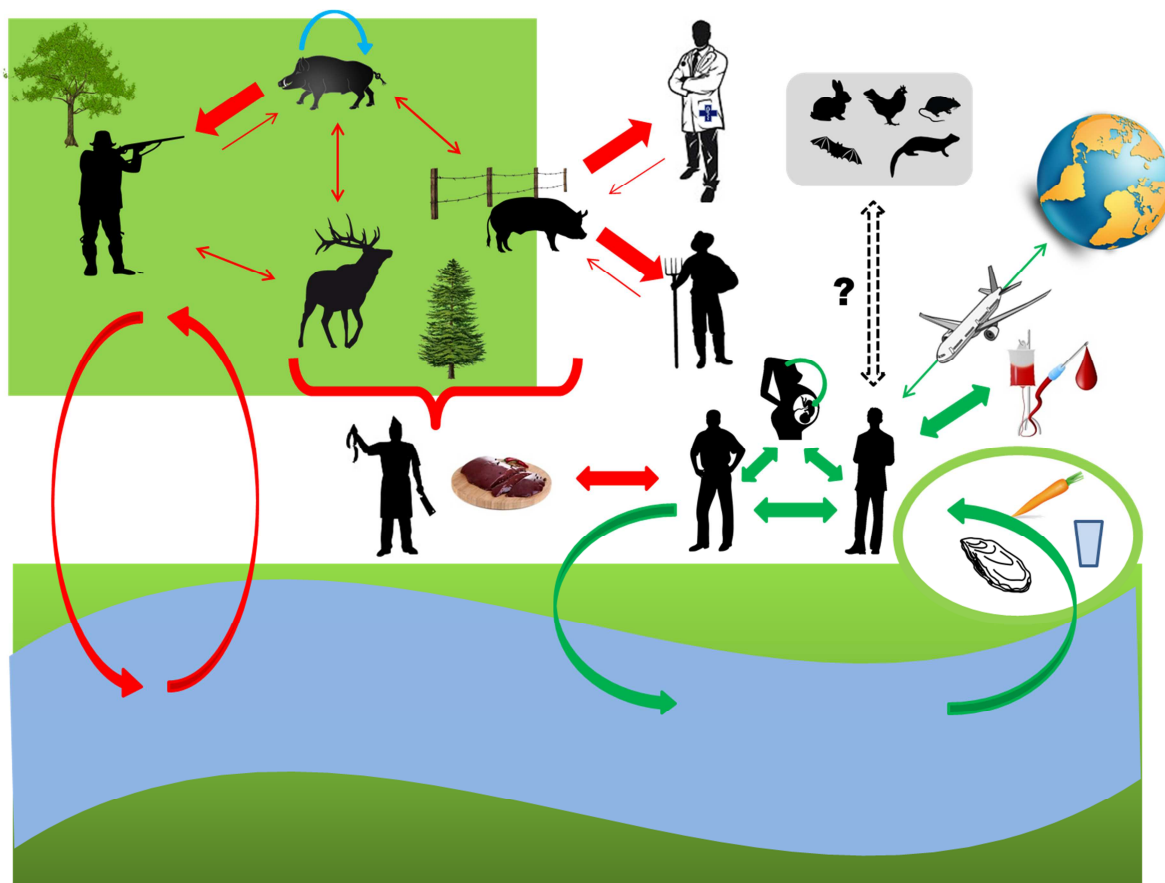


Figure 6. Modèle conceptuel de la transmission du virus de l'hépatite E en Belgique. Représentation schématique des différentes voies de transmission. (Flèches rouges : génotypes HEV-3 et 4 ; flèches vertes : génotypes HEV-1, 2, 3 et 4 ; flèche bleue : génotypes HEV-5 et 6 ; l'épaisseur de la flèche représente une appréciation qualitative de la probabilité de transmission)

Le deuxième axe abordé est la transmission des génotypes zoonotiques HEV-3 et HEV-4 à l'homme.

Tout d'abord, le modèle proposé présente les différentes voies de transmission potentielles du HEV entre les animaux hébergeant cet agent pathogène en Belgique. Le virus peut être transmis du sanglier aux cervidés et vice-versa, cette transmission pourrait effectivement se produire, entre autres, au niveau des zones de nourrissage qui sont partagées par ces deux espèces. Le virus pourrait également être transmis entre sangliers et porcs élevés en plein air. Comme montré lors de l'étude sur la présence du HEV dans la faune sauvage en Belgique, des exploitations de porcs plein air sont situées dans des régions de densité de population de sangliers élevée (Thiry *et al.*, 2015). Les mesures de protection de ces élevages plein air ne sont pas légiférées et un contact entre ces animaux ne peut donc pas être exclu en Belgique. De plus, même si cela n'a pas été montré au cours de ces études, les génotypes spécifiques du sanglier (HEV-5 et 6) pourraient être transmis entre sangliers s'ils s'avèrent présents en Belgique.

Comme démontré à plusieurs reprises, la transmission du HEV via la viande non cuite ou mal cuite, et via le foie de suidés est une des voies principales de transmission dans les pays occidentaux (Renou *et al.*, 2014 ; Berto *et al.*, 2013 ; Colson *et al.*, 2010 ; Meng *et al.*, 2013). Les différents individus réalisant des métiers ayant un rapport direct ou indirect avec les espèces animales hôtes ou les denrées alimentaires dérivées de ces animaux peuvent être considérés comme catégorie de population à risque comme l'a montré une étude de séroprévalences dans ces populations (Krumbholz *et al.*, 2011 ; Bouwknegt *et al.*, 2008a). En outre, les bouchers ou employés d'abattoir peuvent se contaminer par contact direct avec les abats ou la viande contaminée par le HEV. Les populations de chasseurs et les videurs sont également particulièrement à risque et ce, surtout lors de l'éviscération des cervidés ou sangliers chassés. Les vétérinaires ou les éleveurs de porcs sont une autre catégorie de personnes dites à risque suite au contact répété avec l'espèce porcine (Krumbholz *et al.*, 2011). L'âge et les habitudes alimentaires semblent également être deux éléments augmentant le risque d'infection par le HEV (Ruggeri *et al.*, 2013 ; Renou *et al.*, 2014).

En dehors de ces catégories de populations spécifiques ne représentant qu'un certain pourcentage de la population, la nature et le degré de l'exposition de la population générale sont encore méconnus. Une étude française a montré des différences de séroprévalences entre populations exposées ou non à la faune sauvage. Au total, cette étude portant sur 593

forestiers et 135 professionnels non exposés professionnellement à la faune sauvage a montré un risque d'infection par le HEV significativement plus élevé chez les populations en contact le plus étroit avec la faune sauvage (prévalence de 37 % chez les bûcherons), que chez les professionnels non exposés (prévalence de 19 %), les gardes-chasse (prévalence de 20 %) et les sylviculteurs (prévalence de 25 %) (Carpentier *et al.*, 2012).

Comme décrit précédemment, le HEV peut être particulièrement dangereux pour certains individus. Les conséquences les plus graves peuvent être le déclenchement d'hépatites fulminantes chez la femme enceinte (HEV-1 et 2) et l'évolution vers la chronicité principalement pour les patients immunodéprimés ou souffrant d'hépatopathie sous-jacente.

D'une part, deux catégories d'exposition peuvent être définies : élevée pour les catégories de population ayant un contact étroit avec les espèces hôtes (activité professionnelle, hobbies) et faible pour la population normale. D'autre part, deux degrés de gravité, élevée pour les individus plus sensibles et faible pour les autres peuvent également être définis.

Tableau 2 : Table de contingence représentant les différentes combinaisons possibles entre la catégorie d'exposition envers le HEV et la gravité du tableau clinique.

		Catégorie d'exposition	
		Elevée	Faible
Gravité clinique	Elevée	A	B
	Faible	C	D

Quatre combinaisons de niveaux d'exposition et de conséquences peuvent être déduites (Tableau 2).

La première (A), représente la situation dans laquelle la personne infectée par le HEV se trouve dans la catégorie à risque d'exposition élevée et se combine avec des caractéristiques individuelles de sensibilité à la maladie. Dans ce cas, le risque peut être considéré comme élevé et des mesures sont à envisager chez ces individus sensibles et fortement exposés pour réduire ce risque.

La deuxième (B) combine la présence du virus dans la population normale à des caractéristiques individuelles de gravité. Dans ce cas de figure, le risque est moins élevé qu'en

(A). Cependant, au vu de l'incertitude actuelle concernant les facteurs d'exposition, des mesures devraient également être prises pour réduire le risque chez les individus sensibles.

Les troisième (C) et quatrième (D) combinaisons représentent un risque plus faible, même en cas d'exposition élevée car elles concernent des catégories de personnes chez lesquelles la gravité de la maladie est faible.

Le troisième axe abordé concerne les hôtes autres que les suidés ou cervidés.

Peu de données sont actuellement disponibles pour affirmer l'absence de transmission du HEV par les lagomorphes, la volaille, les rongeurs, les chauves-souris ou les furets. Une étude s'est penchée sur la possibilité que les chauves-souris puissent jouer un rôle de réservoir des virus HEV de mammifères comme c'est le cas pour de nombreux virus tels que les coronavirus ou les paramyxovirus (Han *et al.*, 2015). L'analyse de 3869 individus provenant de 85 espèces différentes de chauves-souris provenant des 5 continents a montré que les chauves-souris ne représentaient pas un réservoir du HEV. En effet, les *hepevirus* de chiroptères constituent une lignée très éloignée des HEV humains. Il serait donc peu probable que les chauves-souris transmettent le virus à l'homme. Les rats ont longtemps été soupçonnés d'être un réservoir potentiel de HEV humain. Cependant, la réceptivité des rats à des HEV de génotypes humains est très controversée. En effet, des HEV originaires de rats n'infectent pas le singe rhésus (Purcell *et al.*, 2011) et les rats de laboratoire ne sont pas réceptifs aux HEV-1, -3 et -4 (Li *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2013). Des HEV provenant de la volaille ne se transmettent pas expérimentalement aux primates (Huang *et al.*, 2004). Même si on ne peut pas totalement exclure la transmission du HEV des rats ou de la volaille à l'homme, ces espèces ne doivent pas être actuellement considérées comme des réservoirs de HEV humains.

La transmission d'*hepevirus* de la truite à l'homme peut être exclue avec une probabilité très élevée étant donné les écarts phylogénétiques qui séparent les HEV de ces deux espèces. Le lapin pourrait quant à lui représenter un réservoir de HEV pour l'homme. En effet, des primates non-humains, les macaques cynomolgus (*Macaca fascicularis*) et des porcs ont été infectés expérimentalement par du HEV de lapin (Liu *et al.*, 2013 ; Cossaboom *et al.*, 2013). De plus, une étude a récemment identifié du HEV chez un lapin domestique (*Oryctolagus cuniculus*) (Caruso *et al.*, 2015). La vaccination des lapins pourrait être envisagée en vue de réduire le risque de transmission zoonotique (Zhang *et al.*, 2015).

Des espèces autres que les suidés ou cervidés peuvent donc héberger des *hepevirus* qui sont potentiellement transmissibles à des primates non humains. Des études complémentaires sont nécessaires pour évaluer le risque d'infection par le HEV au contact de ces espèces, en particulier le lapin domestique. Le cas échéant, des mesures pourraient être proposées pour réduire le risque d'HEV dans les catégories d'individus plus sensibles.

Pour conclure, ce modèle conceptuel permet de mieux apprécier les voies de transmission du HEV dans le contexte actuel en Belgique. Il pose cependant la question, déjà abordée dans l'introduction, de l'origine de ce virus et de son hôte réservoir primaire. Effectivement, s'il semble que les suidés et cervidés soient actuellement les hôtes réservoirs du virus dans nos pays, aucune étude ne peut affirmer qu'ils ont été à l'origine de l'infection chez l'homme. De plus, l'homme pourrait lui aussi transmettre le virus aux animaux par un mécanisme de zoonose inversée et les conséquences d'une telle transmission devraient être analysées.

Chapitre 5. Conclusion et perspectives

Quel rôle la faune sauvage et le porc domestique ont-ils joué dans l'émergence du HEV chez l'homme ? Si l'on admet que l'ancêtre des génotypes HEV-1, 2, 3 et 4 était un virus humain et que ce virus se serait ensuite transmis de l'homme aux suidés, ces derniers seraient des réservoirs d'apparition récente, mais qui joueraient un rôle de maintien de l'infection et de la réinfection d'autres mammifères y compris l'homme. La présence d'*hepevirus* plus spécifiques du sanglier (HEV-5 et 6) soutient cette hypothèse : en effet, elle suggère fortement l'existence d'une évolution virale spécifique, reflet du maintien de l'infection virale dans cette population animale. La différence entre le sanglier et le porc résiderait dans le taux élevé de renouvellement présent chez les porcs domestiques et donc dans la capacité moindre du virus à évoluer au sein de cette population à cause de cette contrainte. Au contraire, le mode de vie des sangliers permettrait une plus grande stabilisation du virus dans leur population et favoriserait la sélection et le maintien de certains virus mutants ainsi que l'établissement d'infections chroniques.

L'augmentation apparente de l'incidence des cas d'hépatite E humaine est liée à la prise de conscience récente de cette maladie et à l'amélioration des méthodes de diagnostic. Elle ne peut pas être caractérisée comme une réelle émergence microbiologique récente ; il s'agirait plutôt d'une « pseudo-émergence » (Toma et Thiry, 2003). Il n'en reste pas moins que le HEV est présent dans la population humaine et qu'il pose un réel problème de santé publique.

Le sanglier et le porc peuvent être considérés comme hôtes réservoirs du HEV en Belgique. La mise en évidence d'une circulation prolongée du HEV constituerait un élément supplémentaire pour soutenir ce rôle de réservoir. Cependant, contrairement au rôle épidémiologique apparent des cervidés dans d'autres pays, les faibles données de séroprévalences obtenues en Belgique en font plutôt des hôtes accidentels. Il serait également très intéressant de réaliser une étude de prévalence du HEV chez les chiens de chasse qui pourraient s'infecter suite à l'ingestion d'abats. En effet, des Ac anti-HEV ont déjà été mis en évidence dans l'espèce canine (Pavio *et al.*, 2010).

D'autres études sont nécessaires pour comprendre dans quelle situation épidémiologique les cervidés pourraient être considérés comme réservoir. D'une manière plus

générale, des travaux supplémentaires permettraient d'éclaircir les rôles joués par les animaux domestiques, la faune sauvage et l'homme dans le cycle du HEV.

D'autres études seraient également nécessaires pour comprendre la différence entre la séroprévalence envers le HEV très élevée chez les porcs domestiques et celles observées dans la faune sauvage en Belgique, ainsi que chez l'homme en Europe occidentale (Dalton *et al.*, 2013).

Les résultats de cette étude posent également la question de savoir s'il existe des regroupements et des différences de séroprévalences chez l'homme par région. En effet, la différence significative observée entre les séroprévalences relevées chez le porc en Région Wallonne et en Région Flamande devrait mener à de futures investigations concernant les relations entre l'infection humaine et animale dans ces régions.

Les résultats obtenus suite aux expériences *in vivo* montrent l'importance d'étudier la cellule cible du virus et d'élucider les premières étapes de l'infection des suidés, entre autre via une étude cinétique de la distribution du virus dans l'organisme et la réalisation d'analyses telles que l'immunohistochimie ou l'hybridation *in situ* sur les différents tissus dans lesquels de l'ARN viral a été détecté. Il serait également intéressant de continuer les investigations sur l'infection de culture cellulaire afin d'offrir des perspectives en termes de culture *in vitro*.

Seule une part des infections humaines par le HEV peut être raisonnablement reliée aux facteurs d'exposition connus tels que certaines habitudes alimentaires ou occupations en rapport avec les réservoirs du virus. Cependant, la part non négligeable d'infections humaines actuellement non reliée à ces différents facteurs devrait faire l'objet d'études ultérieures.

Chapitre 6. Résumé - Summary

Résumé

La transmission zoonotique de virus de l'hépatite E (HEV) est un sujet préoccupant, en particulier dans les pays dits développés dans lesquels les infections d'origine hydrique sont moins fréquentes que dans les pays dits en voie de développement. Des séroprévalences élevées envers le HEV sont observées dans les populations de porcs et de sangliers européens. Les objectifs de la première étude de ce travail étaient d'obtenir des données sur la prévalence de l'infection au HEV chez le porc en Belgique et de comparer d'un point de vue phylogénétique les séquences de HEV humain avec celles obtenues chez les porcs en Belgique.

L'échantillonnage a été réalisé dans les banques de sérums de porcs des laboratoires régionaux de santé animale en Belgique entre septembre 2010 et octobre 2011. Au total, 420 échantillons de sérum de porcs en engraissement âgés de moins de 6 mois ont été utilisés pour les études virologiques et 420 échantillons de sérum de truies en lactation pour les tests sérologiques. La présence d'anticorps spécifiques du HEV a été démontrée par ELISA, une séroprévalence individuelle de 73 % (IC à 95 % de 68,8 à 77,5) a été observée en Belgique. Les séroprévalences individuelles étaient significativement différentes entre les deux régions ($\chi^2 = 4,83$; 1 degré de liberté (df) ; $P = 0,03$): 66 % (IC à 95 % de 56,6 à 74,2) en Région Wallonne et 76 % (IC à 95 % 71,1 -81) en Région Flamande. En outre, 93 % (IC à 95 % de 89-100) des troupeaux testés contenaient au moins un porc séropositif.

Une collection de 98 sérums de porcs déjà testés par ELISA a en outre été analysée par un Western blot (WB) IgG ou IgM. Ces données ont été obtenues afin d'utiliser le WB comme test de référence dans une analyse de courbe ROC. Par conséquent, la valeur du seuil de positivité de l'ELISA a été réévaluée par cette courbe ROC et différents scénarios ont été analysés. Quel que soit le scénario, la séroprévalence est restée élevée, passant de 58 à 77 % pour la séroprévalence ELISA et de 69 à 81 % après confirmation par WB.

En plus de l'enquête sur la séroprévalence élevée du HEV chez les porcs, le risque de transmission zoonotique de l'infection a été étudié par comparaison des séquences virales identifiées au cours de cette étude chez les porcs et l'homme en Belgique. Neuf échantillons de sérums humains positifs, provenant de la banque de sérums de cas d'hépatite E du Centre national belge des hépatites virales, obtenus entre 2009 et 2011, étaient disponibles en quantité suffisante et ont été utilisés pour des comparaisons phylogénétiques avec des échantillons de porcs. Quatre des 420 sérums de porc ont été détectés positifs pour l'ARN du HEV. De l'ensemble des séquences de sérums de porcs positifs, 4 appartenaient au génotype

HEV-3, sous-type f. Huit fragments de HEV humains séquencés appartenaient au génotype HEV-3 (7 sous-types f et 1 e) et le dernier au génotype 1. Ces résultats indiquent le possible potentiel zoonotique du HEV en Belgique. En outre, l'existence d'autres génotypes ou sous-types circulant chez les porcs en Belgique ne peut être exclu, comme l'a montré l'existence du HEV-4 sous-type b détecté dans une étude précédente (Hakze-van de Honing *et al.*, 2009).

En Europe, et plus précisément en Belgique, la population de sangliers est en constante augmentation, avec une population estimée à plus de 25.000 têtes en 2012 en Région Wallonne (16.903 km²). Les données de tirs de cerfs et de chevreuils étaient respectivement de 5.300 et 14.400 en 2012 dans la même zone. En Belgique, les quatre cinquièmes des forêts sont situées en Région Wallonne avec une zone boisée de 4.952 km², représentant un tiers de sa superficie totale. En outre, cette région contient également une forte densité de population humaine (210 habitants / km²).

Les objectifs de la deuxième étude de ce travail étaient d'obtenir des données sur la prévalence de l'infection au HEV au sein de la faune sauvage en Belgique et de comparer phylogénétiquement les séquences de HEV humains et de porcs avec celles obtenues à partir de sangliers et de cervidés sauvages.

L'échantillonnage de sérums et de foies de sangliers a été réalisé au cours de la saison de chasse de septembre 2010 à février 2011. Un total de 383 sérums provenant de sangliers de plus de 6 mois a été sélectionné pour la sérologie. Pour les études virologiques, tous les échantillons de carcasses (moins de 6 mois) disponibles ont été utilisés : 69 sérums et 61 foies. L'échantillonnage de sérums et de foies de cervidés a été également réalisé par le réseau de surveillance de la faune sauvage en Wallonie au cours de la saison de chasse entre octobre 2012 et décembre 2012 ; 189 et 235 sérums de cerfs et de chevreuils, respectivement, ont été collectés pour les analyses sérologiques. Pour les analyses virologiques, 84 et 68 sérums et 29 et 27 foies de cerfs et chevreuils, respectivement, ont été échantillonnés. Une séroprévalence apparente globale de 34 % (IC à 95 % de 29,71 à 39,46) a été observée chez les sangliers, de 1 % (IC à 95 % de 0 à 2,4) chez le cerf et de 3 % (IC à 95 % de 0,8 à 4,2) chez les chevreuils.

Afin d'évaluer la prévalence obtenue par ELISA, des analyses WB ont également été réalisées. Les données obtenues par l'analyse en WB chez les sangliers ont été utilisées pour effectuer une analyse de la courbe ROC avec le WB considéré comme test de référence et différents scénarios ont été analysés. La séroprévalence est restée élevée dans la population de sangliers quels que soient les scénarios. En effet, elle était comprise entre 27 et 64 % suite à l'ELISA et entre 34 et 42 % après la confirmation par WB.

Chez le sanglier, de l'ARN de HEV a été détecté dans 4 sérums sur 69 et 5 foies sur 61. Toutes les séquences obtenues à partir des sérums appartenaient au génotype HEV-3, trois au sous-type f et un au sous-type c selon la classification de Lu *et al.* (2006). La comparaison avec les souches porcines et humaines appartenant au génotype HEV-3 a montré que la plupart des fragments séquencés appartenaient aussi au sous-type f. De l'ARN de HEV a été détecté dans un des 29 foies de cerf, il appartient au génotype HEV-3 sous-type f. Aucun ARN de HEV n'a été détecté dans les sérums de cerfs et chevreuils.

En utilisant une régression logistique multivariée, un effet significatif de l'âge a été observé : les jeunes animaux étaient moins séropositifs en comparaison avec les animaux adultes comme référence.

Un effet significatif de la densité de sangliers exprimée en nombre de tirs pour 1000 ha de forêt sur la séroprévalence a également été observé. Le sanglier peut être considéré comme un hôte réservoir du virus en Belgique. Cependant, la faible prévalence chez les cerfs ne permet pas d'inclure ces espèces comme réservoir contrairement au rôle épidémiologique joué par elles dans d'autres pays. Cette donnée doit être approfondie afin de déterminer dans quelle situation les cerfs pourraient servir de réservoir. Ces résultats soulèvent également la question de la dynamique de l'infection de l'HEV entre la faune sauvage, les porcs domestiques et l'homme.

Un nombre croissant d'espèces animales ont été reconnues comme réceptives aux HEV. Une transmission zoonotique directe à l'homme, suivie d'une infection symptomatique a été plusieurs fois documentée, comme dans le cas de viandes crues de sangliers, de cerfs et de porcs infectés par le HEV. Le rôle épidémiologique particulier des sangliers dans les voies de transmission du HEV a été récemment étudié.

Le but de la troisième étude était d'abord d'étudier les conséquences précoces de l'infection de porcs avec une souche de HEV provenant du sanglier (WbHEV) et inoculée par voie intraveineuse et d'autre part d'observer les profils d'infection par une souche WbHEV, par une souche WbHEV préalablement passée chez le porc et une souche SwHEV après l'inoculation par voie orale.

Du HEV-3 de sous-type f isolé à partir de foies de deux jeunes sangliers chassés dans la même forêt belge pendant la même chasse et phylogénétiquement similaire pour les séquences analysées dans les deux foies a été utilisé pour la production des inoculums employés dans les expériences d'inoculation par voies intraveineuse et orale. Dans l'expérience d'infection intraveineuse, les porcelets ont été divisés en deux groupes. Le

groupe 1 comprenait trois porcelets (A, B et C) inoculés avec la souche de HEV de sanglier (WbHEV). Le groupe 2, représentant les témoins négatifs, est composé de deux porcelets (D et E) inoculés avec un homogénat de foies indemnes de HEV. Dans l'expérience d'infection orale, 12 porcelets ont été répartis en quatre groupes. Le groupe 3 comprenait trois porcelets inoculés avec une souche porcine d'HEV (SwHEV) ; le groupe 4 comprenait trois porcelets inoculés avec une souche de HEV de sanglier précédemment passée chez le porc (Sw-WbHEV) ; le groupe 5 comprenait trois porcelets inoculés avec la souche de HEV de sanglier (WbHEV) et le groupe 6 était composé de trois porcelets inoculés avec un homogénat de foie indemne de HEV, représentant un contrôle négatif.

Après l'inoculation intraveineuse, l'ARN du HEV a été détecté dans le sérum, la bile, le foie, la rate, le duodénum, le jéjunum, le côlon, le poumon, les ganglions lymphatiques gastro-hépatiques et les matières fécales chez tous les porcelets du groupe 1. Les porcs des deux groupes sont restés séronégatifs jusqu'à la fin de l'expérience et les valeurs des enzymes hépatiques sont restées dans les normes. De plus, aucun signe clinique n'a été observé.

Après inoculation orale, l'ARN du HEV a été détecté dans le sérum, la bile, le foie, les ganglions lymphatiques gastro-hépatiques et les matières fécales dans les groupes 3, 4 et 5. La plupart des porcs inoculés avec l'HEV sont devenus séropositifs au jour 15 post-inoculation et un porc inoculé avec le Sw-WbHEV est devenu séropositif au jour 12. Les taux d'enzymes hépatiques sont restés dans les normes. De plus, aucun signe clinique n'a été observé.

Dans les deux expériences d'inoculation orale et intraveineuse, les porcs inoculés par le HEV ont montré des infiltrations de lymphocytes, de plasmocytes, d'éosinophiles dans la zone porte, les septa interlobulaires et les sinusoides. De plus, des agrégats de lymphocytes, de plasmocytes et de macrophages ont été observés dans le parenchyme hépatique. Aucune différence histopathologique n'a été observée entre les porcs des deux groupes au niveau des échantillons de duodénum, de jéjunum et de côlon.

En conclusion, le sanglier et le porc peuvent être considérés comme hôtes réservoirs du HEV en Belgique. Cependant, contrairement au rôle épidémiologique apparent des cervidés dans d'autres pays, les faibles données de séroprévalences obtenues en Belgique suggèrent qu'ils représentent des hôtes accidentels. Les résultats des études d'infections expérimentales renforcent le rôle potentiel des sangliers dans la transmission du HEV au porc. Le modèle d'inoculation orale permet de mieux imiter la voie naturelle de l'infection que le modèle par voie intraveineuse et de montrer la propagation limitée du virus dans l'organisme, la faible virémie et la faible présence du virus dans les organes. Ces points doivent être pris en

considération lors de l'évaluation des risques d'infection de l'homme par le HEV dans le contexte de la consommation de produits à base de porc.

Summary

The zoonotic transmission of hepatitis E virus (HEV) is of special concern, particularly in high income countries where waterborne infections are less frequent than in developing countries. High HEV seroprevalences can be found in European pig and wild boar populations.

The aims of the first study of this thesis were to obtain prevalence data on HEV infection in swine in Belgium and to phylogenetically compare Belgian human HEV sequences with those obtained from swine.

Sampling was carried out in the pig serum banks made by the regional animal health laboratories in Belgium between September 2010 and October 2011. In total, 420 serum samples of fattening pigs aged less than 6 months were used for virological studies and 420 serum samples of lactating sows for serological testing. The presence of HEV-specific antibodies was demonstrated by ELISA. An individual seroprevalence of 73 % (95 % CI 68.8-77.5) was found in Belgium. The individual seroprevalence was significantly different between the two regions ($\chi^2 = 4.83$; 1 degree of freedom (df); $P = 0.03$): 66 % (95 % CI 56.6-74.2) in the Walloon Region and 76 % (95 % CI 71.1-81) in the Flemish Region. Moreover, 93 % (95 % CI 89-100) of the tested herds were found to contain at least one seropositive pig.

A collection of 98 pig sera already tested by ELISA was further analysed by a Western blot (WB) against IgG or IgM. These data were obtained in order to use WB as a reference test in a ROC curve analysis. Therefore the ELISA cut-off value was re-evaluated by the ROC curve analysis and different scenarios were analysed. Whatever the scenario, the seroprevalence remained high, from 58 to 77 % for the ELISA seroprevalence and from 69 to 81 % after confirmation by WB.

In addition to the investigation of the high HEV seroprevalence in pigs, the risk of zoonotic transmission of the infection was approached by comparing viral sequences identified during this study in pigs and humans in Belgium. Nine human positive serum samples, from the bank of serum of hepatitis E cases of the Belgian National Center for viral hepatitis, obtained between 2009 and 2011, were available in sufficient amount and used for genetic comparison with swine samples. Four out of 420 pig sera were detected positive for HEV RNA. All sequences from the 4 positive pig sera belonged to genotype 3, subtype f. Eight sequenced human HEV fragments belonged to genotype 3 (7 subtypes f and 1 e) and one to genotype 1. These results indicate the possible zoonotic potential of HEV in Belgium.

In addition, the existence of other HEV genotypes or subtypes circulating in pigs in Belgium cannot be excluded, as highlighted by the detection of genotype 4 subtype b in a previous survey (Hakze-van de Honing *et al.*, 2009).

In Europe and more accurately in Belgium, the wild boar population is in constant increase with a population size estimated to be more than 25000 heads in 2012 in the Walloon Region (16903 km²). The red and roe deer bag statistics were respectively 5300 and 14 400 in 2012 in the same area. In Belgium, four-fifths of the forests are in the Walloon Region and this zone has a wooded area of 4952 km², representing one third of its total area. Moreover, this region contains also a high density of human population (210 people /km²).

The aims of the second study of this work were to obtain prevalence data on HEV infection in wild fauna in Belgium and to phylogenetically compare Belgian human and swine HEV sequences with those obtained from wild boars and cervids.

Sampling of sera and livers of wild boars was made during the hunting season from September 2010 to February 2011. A total of 383 sera from wild boars over 6 months of age were selected for serology. For the virological study, all the samples available from young wild boars (less than 6 months of age) were used: 69 sera and 61 livers. Sampling of sera and livers from cervids was also made by the Walloon wildlife surveillance network during the hunting season from October 2012 to December 2012; 189 and 235 sera of respectively red deer and roe deer were collected for serological analysis. For the virological analyses, 84 and 68 sera as well as 29 and 27 livers from respectively red and roe deer were sampled. An overall apparent seroprevalence of 34 % (95 % CI 29.71-39.46) was found in wild boars, of 1 % (95 % CI 0-2.4) in red deer and 3 % (95 % CI 0.8-4.2) in roe deer.

In order to assess the ELISA screening prevalence, WB analyses were performed. The data obtained by the WB analysis in wild boars have been used for the conception of a ROC curve analysis with WB as reference test and different scenarios were analysed. Seroprevalence remained high whatever the scenarios in the wild boar population. Indeed, it was from 27 to 64 % for the ELISA screening prevalence and from 34 to 42 % after confirmation by WB.

In wild boars, 4 out of 69 sera and 5 out of 61 livers were detected as positive for HEV RNA. All sequences obtained from sera belonged to HEV genotype HEV-3, three to subtype 3f and one to 3c according to the classification of Lu *et al.* (2006). Comparison with the human and swine strains belonging to genotype HEV-3 showed that most of these sequenced fragments also belonged to subtype 3f. HEV RNA was detected in one out of 29 livers from

red deer, it belonged to genotype 3f. No HEV RNA was detected in red and roe deer sera. Using a multivariate logistic regression, a significant effect of age was observed: young animals were less seropositive in comparison with adult animals as reference.

A significant effect of density was also observed. Wild boar can be considered as a host reservoir of the virus in Belgium. However, the low prevalence in deer disregards these species as reservoir contrarily to the epidemiological role played by them in other countries. This evidence needs further investigation in order to determine in which situation deer can serve as a reservoir. These results also raise the question of the dynamics of HEV infection between wild fauna, domestic pigs and humans.

An increasing number of animal species have been recognized as susceptible to HEV. Direct zoonotic transmission to human beings, followed by symptomatic infection, has been documented several times as in the case of uncooked meats from wild boar, deer and pigs infected with HEV. The particular epidemiological role of wild boars in the HEV transmission route has recently been investigated.

The aim of the third study was first to investigate the early consequences of pig infection with a wild boar HEV strain (WbHEV) inoculated by intravenous route and second to observe the infection pattern of a WbHEV strain, a WbHEV strain previously passed in swine, and a SwHEV strain after oral inoculation.

A HEV-3 subtype f isolated from the livers of two young wild boars hunted in the same Belgian forest during the same hunting and phylogenetically similar for the analysed sequences was used for the production of inocula for the intravenous and the oral infection experiments, respectively. In the intravenous infection experiment, the piglets were divided in two groups. Group 1 included three piglets (A, B and C) inoculated with a wild boar HEV strain (WbHEV). Group 2, representing a negative control, was composed of two piglets (D and E) inoculated with the HEV-free liver homogenate. In the oral infection experiment, 12 piglets were divided in four groups. Group 3 included three piglets inoculated with a swine HEV strain (SwHEV); group 4 included three piglets inoculated with a wild boar HEV strain previously passed in swine; group 5 included three piglets inoculated with a wild boar HEV strain (WbHEV); and group 6 was composed of three piglets inoculated with HEV-free liver homogenate representing a negative control.

After intravenous inoculation, HEV RNA was detected in serum, bile, liver, spleen, duodenum, jejunum, colon, lung, gastro-hepatic lymph nodes and faeces in all group 1 piglets.

Pigs from both groups remained seronegative until the end of the experiment and hepatic enzymes remained within the normal range. Furthermore, no clinical signs were observed.

After oral inoculation, HEV RNA was detected in serum, bile, liver, gastro-hepatic lymph nodes and faeces in groups 3, 4 and 5. Most of HEV inoculated pigs became seropositive at day 15 post-inoculation and one Sw-WbHEV inoculated pig became seropositive at day 12. Hepatic enzymes remained within the normal range. Furthermore, no clinical signs were observed.

In both oral and intravenous infection experiments, HEV inoculated pigs showed infiltration of lymphocytes, plasmacytes, eosinophils in the portal areas, interlobular septa and sinusoids. Additionally parenchymal aggregates of lymphocytes, plasmacytes and macrophages could be noticed in parenchyma of the livers. No histopathological differences were observed between the pigs of both groups in duodenum, jejunum and colon samples.

In conclusion, domestic pigs and wild boars can be considered as reservoir hosts for HEV in Belgium. However, contrarily to the apparent epidemiological role of cervids in other countries, the low seroprevalence data obtained in Belgium suggest they are accidental hosts. The results of experimental infections reinforce the putative role of wild boars in the transmission of HEV in pigs. The oral inoculation model better mimics the natural route of infection than the intravenous model and shows a limited spread of the virus in the organism, a low viremia and low levels of the virus in the organs. These points should be considered when assessing the risk of human infection with HEV in the context of the consumption of pork products.

Chapitre 7. Bibliographie

A

ADLHOCH C., WOLF A., MEISEL H., KAISER M., ELLERBROK H., PAULI G. High HEV presence in four different wild boar populations in East and West Germany. *Vet. Microbiol.*, 2009, **139**, 270-278.

AGGARWAL R., NAIK S. Epidemiology of hepatitis E: current status. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2009, **24**, 1484-1493.

AGGARWAL R. Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 2011a, **26**, 72-82.

AGGARWAL R. Clinical presentation of hepatitis E. *Virus Res.*, 2011b, **161**, 15-22.

AHMAD I., HOLLA R.P., JAMEEL S. Molecular Virology of Hepatitis E Virus. *Virus Res.*, 2011, **161**, 47-58.

ANDRAUD, M., M. DUMAREST, R. CARIOLET, B. AYLAI, E. BARNAUD, F. EONO, N. PAVIO AND N. ROSE, Direct contact and environmental contaminations are responsible for HEV transmission in pigs. *Vet. Res.*, 2013, **44**, 102.

ANTY R., OLLIER L., PERON J.M., NICAND E., CANNAVO I., BONGAIN A., GIORDANENGO V., TRAN A. First case report of an acute genotype 3 hepatitis E infected pregnant woman living in South-Eastern France. *J. Clin. Virol.*, 2012, **54**, 76-78.

ARANKALLE V.A., GOVERDHAN M.K., BANERJEE K. Antibodies against

hepatitis E virus in Old World monkeys. *J. Viral Hepat.*, 1994, **1**, 125-129.

ARANKALLE V.A., JOSHI M.V., KULKARNI A.M., GANDHE S.S., CHOBE L.P., RAUTMARE S.S., MISHRA A.C., PADBIDRI V.S. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J. Viral Hepat.*, 2001, **8**, 223-227.

AYE T.T., UCHIDA T., MA X.Z., IIDA F., SHIKATA T., ZHUANG H., WIN K.M. Complete nucleotide sequence of a hepatitis E virus isolated from the Xinjiang epidemic (1986-1988) of China. *Nucleic Acids Res.*, 1992, **20**, 3512.

B

BAECHLEIN C., SCHIELKE A., JOHNE R., ULRICH R.G., BAUMGAERTNER W., GRUMMER B. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using different assays. *Vet. Microbiol.*, 2010, **144**, 187-191.

BARNAUD E., ROGEE S., GARRY P., ROSE N., PAVIO N. Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012, **78**, 5153-5159.

BENDALL R., ELLIS V., IJAZ S., THURAIRAJAH P., DALTON H.R. Serological response to hepatitis E virus genotype 3 infection: IgG quantitation, avidity, and IgM response. *J. Med. Virol.*, 2008, **80**, 95-101.

BERTO A., VAN DER POEL W.H., HONING R.H., MARTELLI F., LA RAGIONE R.M., INGLESE N., COLLINS

J., GRIERSON S., JOHNE R., REETZ J., DASTJERDI A., BANKS M. Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture. *J. Virol. Methods*, 2012, **187**, 327-332.

BERTO A., GRIERSON S., HAKZE-VAN DER HONING R., MARTELLI F., JOHNE R., REETZ J., ULRICH R.G., PAVIO N., VAN DER POEL W.H., BANKS M. Hepatitis e virus in pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, **19**, 264-266.

BILLAM P., HUANG F.F., SUN Z.F., PIERSON F.W., DUNCAN R.B., ELVINGER F., GUENETTE D.K., TOTH T.E., MENG X.J. Systematic pathogenesis and replication of avian hepatitis E virus in specific-pathogen-free adult chickens. *J. Virol.*, 2005, **79**, 3429-3437.

BILLAM P., LEROITH T., PUDUPAKAM R.S., PIERSON F.W., DUNCAN R.B., MENG X.J. Comparative pathogenesis in specific-pathogen-free chickens of two strains of avian hepatitis E virus recovered from a chicken with Hepatitis-Splenomegaly syndrome and from a clinically healthy chicken. *Vet. Microbiol.*, 2009, **139**, 253-261.

BOADELLA M., CASAS M., MARTIN M., VICENTE J., SEGALÉS J., DE LA FUENTE J., GORTAZAR C. Increasing contact with hepatitis E virus in red deer, Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010a, **16**, 1994-1996.

BOADELLA M., CASAS M., MARTÍN M., VICENTE J., SEGALÉS J., DE LA FUENTE J., GORTÁZAR C. Increasing contact with hepatitis E virus in red deer,

Spain. *Emerg. Infect. Dis.*, 2010b, **16**, 1994-1996.

BOADELLA M., RUIZ-FONS J.F., VICENTE J., MARTIN M., SEGALÉS J., GORTAZAR C. Seroprevalence evolution of selected pathogens in Iberian wild boar. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2012, **59**, 395-404.

BODEWES R., VAN DER GIESSEN J., HAAGMANS B.L., OSTERHAUS A.D., SMITS S.L. Identification of multiple novel viruses, including a parvovirus and a hepevirus, in feces of red foxes. *J. Virol.*, 2013, **87**, 7758-7764.

BORGEN K., HERREMANS T., DUIZER E., VENNEMA H., RUTJES S., BOSMAN A., DE RODA HUSMAN A.M., KOOPMANS M. Non-travel related Hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; a case series 2004 - 2006. *BMC Infect. Dis.*, 2008, **8**, 61.

BOUQUET J., TESSÉ S., LUNAZZI A., ELOIT M., ROSE N., NICAND E., PAVIO N. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008-2009. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, **17**, 2018-2025.

BOUWKNEGT M., ENGEL B., HERREMANS M.M., WIDDOWSON M.A., WORM H.C., KOOPMANS M.P., FRANKENA K., DE RODA HUSMAN A.M., DE JONG M.C., VAN DER POEL W.H. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol. Infect.*, 2008a, **136**, 567-576.

BOUWKNEGT M., FRANKENA K., RUTJES S.A., WELLENBERG G.J., DE RODA HUSMAN A.M., VAN DER POEL W.H., De Jong M.C. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet. Res.*, 2008b, **39**, 40.

BOUWKNEGT M., RUTJES S.A., REUSKEN C.B., STOCKHOFER-ZURWIEDEN N., FRANKENA K., DE JONG M.C., DE RODA HUSMAN A.M., POEL W.H. The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.*, 2009, **5**, 7.

BRADLEY D., ANDJAPARIDZE A., COOK E.H., MCCAUSTLAND K., BALAYAN M., STETLER H., VELAZQUEZ O., ROBERTSON B., HUMPHREY C., KANE M. Aetiological agent of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *J. Gen. Virol.*, 1988, **69**, 731-738.

BRADLEY D.W., KRAWCZYNSKI K., COOK E.H., MCCAUSTLAND K.A., HUMPHREY C.D., SPELBRING J.E., MYINT H., MAYNARD J.E. Enterically transmitted non-A, non-B hepatitis: serial passage of disease in cynomolgus macaques and tamarins and recovery of disease-associated 27- to 34-nm viruslike particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1987, **84**, 6277-6281.

C

CARUSO C., MODESTO P., PRATO R., SCAGLIONE F.E., DE MARCO L., BOLLO E., ACUTIS P.L., MASOERO L., PELETTI S. Hepatitis E Virus: First Description in a Pet House Rabbit. A New

Transmission Route for Human? *Transbound. Emerg. Dis.*, 2015, **62**, 229-232.

CARPENTIER A., CHAUSSADE H., RIGAUD E., RODRIGUEZ J., BERTHAULT C., BOUE F., TOGNON M., TOUZE A., GARCIA-BONNET N., CHOUTET P., COURSAGET P. High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J. Clin. Microbiol.*, 2012, **50**, 2888-2893.

CASAS M., PINA S., DE DEUS N., PERALTA B., MARTIN M., SEGALÉS J. Pigs orally inoculated with swine hepatitis E virus are able to infect contact sentinels. *Vet. Microbiol.*, 2009, **138**, 78-84.

CASAS M., CORTÉS R., PINA S., PERALTA B., ALLEPUZ A., CORTEY M., CASAL J., MARTÍN M. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds. *Vet. Microbiol.*, 2011, **148**, 27-34.

CHANG Y., WANG L., GENG J., ZHU Y., FU H., REN F., LI L., WANG X., ZHUANG H. Zoonotic risk of hepatitis E virus (HEV): A study of HEV infection in animals and humans in suburbs of Beijing. *Hepatology research*, 2009, **39**, 1153-1158.

CHRISTENSEN P.B., ENGLE R.E., JACOBSEN S.E., KRARUP H.B., GEORGESEN J., PURCELL R.H. High prevalence of hepatitis E antibodies among Danish prisoners and drug users. *J. Med. Virol.*, 2002, **66**, 49-55.

CLEMENTE-CASARES P., PINA S., BUTI M., JARDI R., MARTIN M., BOFILL-MAS S., GIRONES R. Hepatitis

E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.*, 2003, **9**, 448-454.

COLSON P., BORENTAIN P., QUEYRIAUX B., KABA M., MOAL V., GALLIAN P., HEYRIES L., RAOULT D., GEROLAMI R. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J. Infect. Dis.*, 2010, **202**, 825-834.

COLSON P., ROMANET P., MOAL V., BORENTAIN P., PURGUS R., BENEZECH A., MOTTE A., GÉROLAMI R. Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, **18**, 1361-1364.

COOPER K., HUANG F.F., BATISTA L., RAYO C.D., BEZANILLA J.C., TOTH T.E., MENG X.J. Identification of genotype 3 hepatitis E virus (HEV) in serum and fecal samples from pigs in Thailand and Mexico, where genotype 1 and 2 HEV strains are prevalent in the respective human populations. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 1684-1688.

COSSABOOM C.M., CÓRDOBA L., DRYMAN B.A., MENG X.J. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, **17**, 2047-2049.

COSSABOOM C.M., CÓRDOBA L., SANFORD B.J., PIÑEYRO P., KENNEY S.P., DRYMAN B.A., WANG Y., MENG X.J. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J. Gen. Virol.*, 2012, **93**, 1687-1695.

CROSSAN C., BAKER P.J., CRAFT J., TAKEUCHI Y., DALTON H.R., SCOBIE

L. Hepatitis E virus genotype 3 in shellfish, United Kingdom. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, **18**, 2085-2087.

CROSSAN C., SCOBIE L., GODWIN J., HUNTER J.G., HAWKES T., DALTON H.R. Hepatitis E virus and porcine-derived heparin. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, **19**, 686-688.

D

DAI X., DONG C., ZHOU Z., LIANG J., DONG M., YANG Y., FU J., TIAN H., WANG S., FAN J., MENG J., PURDY M.A. Hepatitis E virus genotype 4, Nanjing, China, 2001-2011. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, **19**, 1528-1530.

DALTON H.R., HUNTER J.G., BENDALL R. Autochthonous hepatitis E in developed countries and HEV/HIV coinfection. *Semin. Liver Dis.*, 2013, **33**, 50-61.

DE CARVALHO L.G., MARCHEVSKY R.S., DOS SANTOS D.R., DE OLIVEIRA J.M., DE PAULA V.S., LOPES L.M., VAN DER POEL W.H., GONZÁLEZ J.E., MUNNÉ M.S., MORAN J., CAJARAVILLE A.C., PELAJO-MACHADO M., CRUZ O.G., PINTO M.A. Infection by Brazilian and Dutch swine hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect. Dis.*, 2013, **13**, 495.

DE DEUS N., CASAS M., PERALTA B., NOFRARIAS M., PINA S., MARTIN M., SEGALÉS J. Hepatitis E virus infection dynamics and organic distribution in naturally infected pigs in a farrow-to-finish farm. *Vet. Microbiol.*, 2008a, **132**, 19-28.

- DE DEUS N., PERALTA B., PINA S., ALLEPUZ A., MATEU E., VIDAL D., RUIZ-FONS F., MARTÍN M., GORTÁZAR C., SEGALÉS J. Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet. Microbiol.*, 2008b, **129**, 163-170.
- DENNER J. Xenotransplantation and Hepatitis E virus. *Xenotransplantation*, 2015, **22**, 167-173.
- DI BARTOLO I., PONTERIO E., ANGELONI G., MORANDI F., OSTANELLO F., NICOLOSO S., RUGGERI F.M. Presence of Hepatitis E Virus in a RED Deer (*Cervus elaphus*) Population in Central Italy. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2015, LID - 10.1111/tbed.12353 [doi].
- DI BARTOLO I., PONTERIO E., CASTELLINI L., OSTANELLO F., RUGGERI F.M. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet. Microbiol.*, 2011, **5**, 330-338.
- DOS SANTOS D.R., DE PAULA V.S., DE OLIVEIRA J.M., MARCHEVSKY R.S., PINTO M.A. Hepatitis E virus in swine and effluent samples from slaughterhouses in Brazil. *Vet. Microbiol.*, 2011, **149**, 236-241.
- DREMSEK P., WENZEL J.J., JOHNE R., ZILLER M., HOFMANN J., GROSCHUP M.H., WERDERMANN S., MOHN U., DORN S., MOTZ M., MERTENS M., JILG W., ULRICH R.G. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2012, **201**, 189-200.
- DREXLER J.F., SEELEN A., CORMAN V.M., FUMIE TATENO A., COTTONTAIL V., MELIM ZERBINATI R., GLOZA-RAUSCH F., KLOSE S.M., ADU-SARKODIE Y., OPPONG S.K., KALKO E.K., OSTERMAN A., RASCHE A., ADAM A., MÜLLER M.A., ULRICH R.G., LEROY E.M., LUKASHEV A.N., DROSTEN C. Bats worldwide carry hepatitis E-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J. Virol.*, 2012, **86**, 9134-9147.
- ### E
- EASTERBROOK J.D., KAPLAN J.B., VANASCO N.B., REEVES W.K., PURCELL R.H., KOSOY M.Y., GLASS G.E., WATSON J., KLEIN S.L. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol. Infect.*, 2007, **135**, 1192-1199.
- EMERSON S.U., ANDERSON D., ARANKALLE A., MENG X.-J., PURDY M., SCHLAUDER G., PURCELL R. HEPEVIRUS. IN: FAUQUET C., MAYO M., MANILOFF J., DESSELBERGER U., BALL L. A. (Eds), *Virus Taxonomy*, VIIIth Report of the ICTV. Elsevier/Academic Press: London, 2005, 853-857.
- EMERSON S.U., PURCELL R.H. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.*, 2003, **13**, 145-154.
- ENGLE R.E., YU C., EMERSON S.U., MENG X.J., PURCELL R.H. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from

viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J. Clin. Microbiol.*, 2002, **40**, 4576-4580.

EUROPEAN MEDICINES AGENCY. CHMP/BWP report to the CMDh on pancreatin-containing products, 2013, [en ligne], http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Report/2013/10/WC500151485.pdf, consulté le 15.09.2015.

F

FAVOROV M.O., KOSOY M.Y., TSAREV S.A., CHILDS J.E., MARGOLIS H.S. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among rodents in the United States. *J. Infect. Dis.*, 2000, **181**, 449-455.

FEAGINS A.R., OPRIESSNIG T., GUENETTE D.K., HALBUR P.G., MENG X.J. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int. J. Food Microbiol.*, 2008a, **123**, 32-37.

FEAGINS A.R., OPRIESSNIG T., HUANG Y.W., HALBUR P.G., MENG X.J. Cross-species infection of specific-pathogen-free pigs by a genotype 4 strain of human hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 2008b, **80**, 1379-1386.

FORGÁCH P., NOWOTNY N., ERDÉLYI K., BONCZ A., ZENTAI J., SZUCS G., REUTER G., BAKONYI T. Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet. Microbiol.*, 2010, **143**, 106-116.

FRANCIS D.P., MAYNARD J.E. The transmission and outcome of hepatitis A, B, and non-A, non-B: a review. *Epidemiol. Rev.*, 1979, **1**, 17-31.

G

GALIANA C., FERNÁNDEZ-BARREDO S., GARCÍA A., GÓMEZ M.T., PÉREZ-GRACIA M.T. Occupational exposure to hepatitis E virus (HEV) in swine workers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2008, **78**, 1012-1015.

GENG Y., ZHAO C., SONG A., WANG J., ZHANG X., HARRISON T.J., ZHOU Y., WANG W., WANG Y. The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China. *Infect. Genet. Evol.*, 2011, **11**, 476-482.

GRAFF J., TORIAN U., NGUYEN H., EMERSON S.U. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J. Virol.*, 2006, **80**, 5919-5926.

GREGOIRE F., MOUSSET B., HANREZ D., MICHAUX C., WALRAVENS K., LINDEN A.. A serological and bacteriological survey of brucellosis in wild boar (*Sus scrofa*) in Belgium. *BMC Vet. Res.*, 2012, **18**, 1-8.

GRODZKI M., SCHAEFFER J., PIQUET J.C., LE SAUX J.C., CHEVÉ J., OLLIVIER J., LE PENDU J., LE GUYADER F.S. Bioaccumulation efficiency, tissue distribution, and environmental occurrence of hepatitis E virus in bivalve shellfish from France. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2014, **80**, 4269-4276.

GUAN D., LI W., SU J., FANG L., TAKEDA N., WAKITA T., LI T.C., KE C. Asian musk shrew as a reservoir of rat hepatitis E virus, China. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, **19**, 1341-1343.

GUO H., ZHOU E.M., SUN Z.F., MENG X.J., HALBUR P.G. Identification of B-cell epitopes in the capsid protein of avian hepatitis E virus (avian HEV) that are common to human and swine HEVs or unique to avian HEV. *J. Gen. Virol.*, 2006, **87**, 217-223.

GUPTA H., JOSHI Y.K., VARMA A., SHENOY S., SRIRAMCHARI S., IYENGER B., TANDON B.N. Transmission of enteric non-A, non-B hepatitis virus in *Macaca mulatta* monkeys by intraportal route: subsequent passages of HEV virus. *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 1990, **5**, 608-615.

H

HAAGSMAN A., REUTER G., DUIZER E., NAGY G., HERREMANS T., KOOPMANS M., SZUCS G. Seroepidemiology of hepatitis E virus in patients with non-A, non-B, non-C hepatitis in Hungary. *J. Med. Virol.*, 2007, **79**, 927-930.

HAGEN R., HEURICH M., KROSCHER M., KROSCHER M., HERDTFELDER M. Synchrony in hunting bags: reaction on climatic and human induced changes? *Sci. Total Environ.*, 2014, **15**, 468-469.

HAKZE-VAN DER HONING R.W., VAN COILLIE E., ANTONIS A.F., VAN DER POEL W.H. First Isolation of Hepatitis E Virus Genotype 4 in Europe through Swine

Surveillance in the Netherlands and Belgium. *PLoS One*, 2011, **6**, e22673.

HALBUR P.G., KASORNDORKBUA C., GILBERT C., GUENETTE D., POTTERS M.B., PURCELL R.H., EMERSON S.U., TOTH T.E., MENG X.J. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 918-923.

HALL T.A. A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.*, 1999, **41**, 95-98.

HALLEUX D., KANAAN N., KABAMBA B., THOMAS I., HASSOUN Z. Hepatitis E virus: an underdiagnosed cause of chronic hepatitis in renal transplant recipients. *Transpl. Infect. Dis.*, 2011, **14**, 99-102.

HAN H.J., WEN H.L., ZHOU C.M., CHEN F.F., LUO L.M., LIU J.W., YU X.J. Bats as reservoirs of severe emerging infectious diseases. *Virus Res.*, 2015, **205**, 1-6.

HAN J., ZENG H., WANG L., LIU P., LIU L., XIA J., ZHANG Y., ZHUANG H. Hepatitis E virus infection in farmed rabbits and swine in the Eastern Chinese city Lianyungang: showing no potential interspecies transmission. *J. Med. Virol.*, 2014, **86**, 1898-1904.

HAQSHENAS G., HUANG F.F., FENAUX M., GUENETTE D.K., PIERSON F.W., LARSEN C.T., SHIVAPRASAD H.L., TOTH T.E., MENG X.J. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus

shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J. Gen. Virol.*, 2002, **83**, 2201-2209.

HAYDON D.T., CLEAVELAND S., TAYLOR L.H., LAURENSEN M.K. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.*, 2002, **8**, 1468-1473.

HEDRICK R.P., YUN S., WINGFIELD W.H. A Small RNA Virus Isolated from Salmonid Fishes in California, USA. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1991, **48**, 99-104.

HIRANO M., DING X., LI T.C., TAKEDA N., KAWABATA H., KOIZUMI N., KADOSAKA T., GOTO I., MASUZAWA T., NAKAMURA M., TAIRA K., KUROKI T., TANIKAWA T., WATANABE H., ABE K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.*, 2003a, **27**, 1-5.

HIRANO M., DING X., TRAN H.T., LI T.C., TAKEDA N., SATA T., NAKAMURA S., ABE K. Prevalence of antibody against hepatitis E virus in various species of non-human primates: evidence of widespread infection in Japanese monkeys (*Macaca fuscata*). *Jpn. J. Infect. Dis.*, 2003b, **56**, 8-11.

HOSMILLO M., JEONG Y.J., KIM H.J., PARK J.G., NAYAK M.K., ALFAJARO M.M., COLLANTES T.M., PARK S.J., IKUTA K., YUNOKI M., KANG M.I., PARK S.I., CHO K.O. Molecular detection of genotype 3 porcine hepatitis E virus in aborted fetuses and their sows. *Arch Virol.*, 2010, **155**, 1157-1161.

HSIEH S.Y., MENG X.J., WU Y.H., LIU S.T., TAM A.W., LIN D.Y., LIAW Y.F. Identity of a novel swine hepatitis E virus in Taiwan forming a monophyletic group with Taiwan isolates of human hepatitis E virus. *J. Clin. Microbiol.*, 1999, **37**, 3828-3834.

HSU I.W., TSAI H.J. Avian hepatitis e virus in chickens, taiwan, 2013. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, **20**, 149-151.

HU W.P., LU Y., PRECIOUS N.A., CHEN H.Y., HOWARD T., ANDERSON D., GUAN M. Double-antigen enzyme-linked immunosorbent assay for detection of hepatitis E virus-specific antibodies in human or swine sera. *Clin. Vaccine Immunol.*, 2008, **15**, 1151-1157.

HUANG C.C., NGUYEN D., FERNANDEZ J., YUN K.Y., FRY K.E., BRADLEY D.W., TAM A.W., REYES G.R. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology*, 1992, **191**, 550-558.

HUANG F.F., HAQSHENAS G., GUENETTE D.K., HALBUR P.G., SCHOMMER S.K., PIERSON F.W., TOTH T.E., MENG X.J. Detection by reverse transcription-PCR and genetic characterization of field isolates of swine hepatitis E virus from pigs in different geographic regions of the United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2002a, **40**, 1326-1332.

HUANG F.F., HAQSHENAS G., SHIVAPRASAD H.L., GUENETTE D.K., WOOLCOCK P.R., LARSEN C.T., PIERSON F.W., ELVINGER F., TOTH T.E., MENG X.J. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the

United States. *J. Clin. Microbiol.*, 2002b, **40**, 4197-4202.

I

IJAZ S., SAID B., BOXALL E., SMIT E., MORGAN D., TEDDER R.S. Indigenous hepatitis E in England and Wales from 2003 to 2012: evidence of an emerging novel phylotype of viruses. *J. Infect. Dis.*, 2014, **209**, 1212-1218.

IZOPET J., DUBOIS M., BERTAGNOLI S., LHOMME S., MARCHANDEAU S., BOUCHER S., KAMAR N., ABRAVANEL F., GUÉRIN J.L. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, **18**, 1274-1281.

IZOPET J., LHOMME S., ABRAVANEL F., ROQUE A.-M., KAMAR N. Le virus de l'hépatite E. *La Presse Médicale*, 2015, **44**, 328-332.

J

JIMÉNEZ DE OYA N., ESCRIBANO-ROMERO E., BLÁZQUEZ A.B., SAIZ J.C. Hepatitis E virus: zoonotic implications. *Gastroenterol. Hepatol.*, 2007, **30**, 408-418.

JOHNE R., PLENGE-BÖNIG A., HESS M., ULRICH R.G., REETZ J., SCHIELKE A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J. Gen. Virol.*, 2010, **91**, 750-758.

JOHNE R., DREMSEK P., KINDLER E., SCHIELKE A., PLENGE-BÖNIG A., GREGERSEN H., WESSELS U., SCHMIDT K., RIETSCHEL W.,

GROSCHUP M.H., GUENTHER S., HECKEL G., ULRICH R.G. Rat hepatitis E virus: geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Infect. Genet. Evol.*, 2012, **12**, 947-956.

JOTHIKUMAR N., CROMEANS T.L., ROBERTSON B.H., MENG X.J., HILL V.R. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods*, 2006, **131**, 65-71.

K

KABA M., DAVOUST B., MARIE J.L., BARTHET M., HENRY M., TAMALET C., RAOULT D., COLSON P. Frequent transmission of hepatitis E virus among piglets in farms in Southern France. *J. Med. Virol.*, 2009, **81**, 1750-1759.

KALIA M., CHANDRA V., RAHMAN S.A., SEHGAL D., JAMEEL S. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J. Virol.*, 2009, **83**, 12714-12724.

KAMAR N., BENDALL R., LEGRAND-ABRAVANEL F., XIA N.S., IJAZ S., IZOPET J., DALTON H.R. Hepatitis E. *Lancet*, 2012, **379**, 2477-2488.

KAMILI S. Toward the development of a hepatitis E vaccine. *Virus Res.*, 2011, **161**, 93-100.

KASORNDORKBUA C., THACKER B.J., HALBUR P.G., GUENETTE D.K., BUITENWERF R.M., ROYER R.L., MENG X.J. Experimental infection of

pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can. J. Vet. Res.*, 2003, **67**, 303-306

KASORNDORKBUA C., GUENETTE D.K., HUANG F.F., THOMAS P.J., MENG X.J., HALBUR P.G. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 5047-5052

KAUR M., HYAMS K.C., PURDY M.A., KRAWCZYNSKI K., CHING W.M., FRY K.E., REYES G.R., BRADLEY D.W., CARL M. Human linear B-cell epitopes encoded by the hepatitis E virus include determinants in the RNA-dependent RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1992, **89**, 3855-3858.

KHUROO M.S. Hepatitis E virus. *Curr. Opin. Infect. Dis.*, 2008, **21**, 539-543.

KHUROO M.S. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. *Virus Res.*, 2011, **161**, 3-14.

KHUROO M.S., KHUROO M.S. Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure. *J. Viral Hepat.*, 2015, Epub ahead of print.

KOFF R.S. Review article: vaccination and viral hepatitis - current status and future prospects. *Aliment. Pharmacol. Ther.*, 2007, **26**, 1285-1292.

KOONIN E.V., GORBALENYA A.E., PURDY M.A., ROZANOV M.N., REYES G.R., BRADLEY D.W. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal

viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1992, **89**, 8259-8263.

KRAIN L.J., ATWELL J.E., NELSON K.E., LABRIQUE A.B. Fetal and neonatal health consequences of vertically transmitted hepatitis E virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2014, **90**, 365-370.

KRAWCZYNSKI K., MENG X.J., RYBCZYNSKA J. Pathogenetic elements of hepatitis E and animal models of HEV infection. *Virus Res.*, 2011, **161**, 78-83.

KROG J.S., BREUM S., JENSEN T.H., LARSEN L.E. Hepatitis E virus variant in farmed mink, Denmark. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013, **19**, 2028-2030.

KRUMBHOLZ A., MOHN U., LANGE J., MOTZ M., WENZEL J.J., JILG W., WALTHER M., STRAUBE E., WUTZLER P., ZELL R. Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2012, **201**, 239-244.

KRUMBHOLZ A., JOEL S., NEUBERT A., DREMSEK P., DURRWALD R., JOHNE R., HLINAK A., WALTHER M., LANGE J., WUTZLER P., SAUERBREI A., ULRICH R.G., ZELL R. Age-related and regional differences in the prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in pigs in Germany. *Vet. Microbiol.*, 2013, **27**, 394-402.

KRUMBHOLZ A., JOEL S., DREMSEK P., NEUBERT A., JOHNE R., DÜRRWALD R., WALTHER M., MÜLLER T.H., KÜHNEL D., LANGE J., WUTZLER P., SAUERBREI A., ULRICH R.G., ZELL R. Seroprevalence of hepatitis

E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med. Microbiol. Immunol.*, 2014, **203**, 273-282.

KUKIELKA D., RODRIGUEZ-PRIETO V., VICENTE J., SANCHEZ-VIZCAINO J.M. Constant Hepatitis E Virus (HEV) Circulation in Wild Boar and Red Deer in Spain: An Increasing Concern Source of HEV Zoonotic Transmission. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2015 9. doi: 10.1111/tbed.12311. [Epub ahead of print].

KWON H.M., SUNG H.W., MENG X.J. Serological prevalence, genetic identification, and characterization of the first strains of avian hepatitis E virus from chickens in Korea. *Virus genes*, 2012, **45**, 237-245.

L

LACK J.B., VOLK K., VAN DEN BUSSCHE R.A. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg. Infect. Dis.*, 2012, **18**, 1268-1273.

LEGRAND-ABRAVANEL F., KAMAR N., SANDRES-SAUNE K., LHOMME S., MANSUY J.M., MUSCARI F., SALLUSTO F., ROSTAING L., IZOPET J. Hepatitis E virus infection without reactivation in solid-organ transplant recipients, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, **17**, 30-37.

LHOMME S., ABRAVANEL F., DUBOIS M., SANDRES-SAUNE K., ROSTAING L., KAMAR N., IZOPET J. Hepatitis E virus quasispecies and the outcome of acute hepatitis E in solid-organ transplant patients. *J. Virol.*, 2012, **86**, 10006-10014.

LHOMME S., TOP S., BERTAGNOLI S., DUBOIS M., GUERIN J.L., IZOPET J. Wildlife Reservoir for Hepatitis E Virus, Southwestern France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2015, **21**, 1224-1226.

LI T.C., CHIIWA K., SERA N., ISHIBASHI T., ETOH Y., SHINOHARA Y., KURATA Y., ISHIDA M., SAKAMOTO S., TAKEDA N., MIYAMURA T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg. Infect. Dis.*, 2005, **11**, 1958-1960.

LI T.C., MYAMURA T., TAKEDA N. Detection of hepatitis E virus RNA from the bivalve Yamato-Shijimi (*Corbicula japonica*) in Japan, *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2011, **76**, 170-172.

LI T.C., AMI Y., SUZAKI Y., YASUDA S.P., YOSHIMATSU K., ARIKAWA J., TAKEDA N., TAKAJI W. Characterization of full genome of rat hepatitis E virus strain from Vietnam. *Emerg. Infect. Dis.*, 2013a, **19**, 115-118.

LI T.C., YOSHIZAKI S., AMI Y., SUZAKI Y., YASUDA S.P., YOSHIMATSU K., ARIKAWA J., TAKEDA N., WAKITA T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet. Microbiol.*, 2013b, **163**, 54-61.

LI W., GUAN D., SU J., TAKEDA N., WAKITA T., LI T.C., KE C.W. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet. Microbiol.*, 2013c, **165**, 275-280.

LIN J., NORDER H., UHLHORN H., BELÁK S., WIDÉN F. Novel Hepatitis E

Like Virus Found in Swedish moose. *J. Gen. Virol.*, 2013, **95**, 557-570.

LINDEN A. M.W., S. VOLPE, A. NAHAYO, J. PIRSON, J. PATERNOSTRE, GRÉGOIRE F. Surveillance of wildlife diseases in Belgium. *Epidémiol. et santé anim.*, 2011, **59**, 213-215.

LIU B., ZHAO Q., SUN Y., WANG X., ZHAO J., DU T., WANG C., XIAO S., MU Y., ZHANG G., LUO J., HSU W.H., ZHOU E.M. Development of a blocking ELISA for detection of antibodies against avian hepatitis E virus. *J. Virol. Methods*, 2014, **204**, 1-5.

LU L., LI C., HAGEDORN C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev. Med. Virol.*, 2006, **16**, 5-36.

M

MALCOLM P., DALTON H., HUSSAINI H.S., MATHEW J. The histology of acute autochthonous hepatitis E virus infection. *Histopathology*, 2007, **51**, 190-194.

MALLET V., Hépatite E : l'émergence d'un virus universel. *La presse médicale*, 2015, **44**, 326-327.

MANEERAT Y., CLAYSON E.T., MYINT K.S., YOUNG G.D., INNIS B.L. Experimental infection of the laboratory rat with the hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 1996, **48**, 121-128.

MANSUY J.M., BENDALL R., LEGRAND-ABRAVANEL F., SAUNE K., MIEDOUGE M., ELLIS V., RECH H.,

DESTRUDEL F., KAMAR N., DALTON H.R., IZOPET J. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2011, **17**, 2309-2312.

MARKOWSKA-DANIELO I., POMORSKA-MOL M., PEJSAK Z. Dynamic changes of immunoglobulin concentrations in pig colostrum and serum around parturition. *Pol. J. Vet. Sci.* 2010, **13**, 21-27.

MARTELLI F., CAPRIOLI A., ZENGARINI M., MARATA A., FIEGNA C., DI BARTOLO I., RUGGERI F.M., DELOGU M., OSTANELLO F. Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (*Sus scrofa scrofa*) population in Italy. *Vet. Microbiol.*, 2008, **126**, 74-81.

MARTINELLI N., PAVONI E., FILOGARI D., FERRARI N., CHIARI M., CANELLI E., LOMBARDI G. Hepatitis E Virus in Wild Boar in the Central Northern Part of Italy. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2013, **62**, 217-222.

MASSEI G., KINDBERG J., LICOPPE A., GACIC D., SPREM N., KAMLER J., BAUBET E., HOHMANN U, MONACO A., OZOLINS J., CELLINA S., PODGORSKI T., FONSECA C., MARKOV N., POKORNY B., ROSELL C., NAHLIK A., Wild boar populations up, numbers of hunters down? A review of trends and implications for Europe. *Pest. Manag. Sci.*, 2015, **71**, 492-500.

MAST E.E., PURDY M.A., KRAWCZYNSKI K. Hepatitis E. *Baillieres Clin. Gastroenterol.*, 1996, **10**, 227-242.

- MATHIJS E., MUYLKENS B., MAUROY A., ZIANT D., DELWICHE T., THIRY E. Experimental evidence of recombination in murine noroviruses. *J. Gen. Virol.*, 2010, **91**, 2723-2733.
- MATSUDA H., OKADA K., TAKAHASHI K., MISHIRO S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.*, 2003, **188**, 944.
- MATSUURA Y., SUZUKI M., YOSHIMATSU K., ARIKAWA J., TAKASHIMA I., YOKOYAMA M., IGOTA H., YAMAUCHI K., ISHIDA S., FUKUI D., BANDO G., KOSUGE M., TSUNEMITSU H., KOSHIMOTO C., SAKAE K., CHIKAHIRA M., OGAWA S., MIYAMURA T., TAKEDA N., LI T.C. Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch. Virol.*, 2007, **152**, 1375-1381.
- McCAUSTLAND K.A., KRAWCZYNSKI K., EBERT J.W., BALAYAN M.S., ANDJAPARIDZE A.G., SPELBRING J.E., COOK E.H., HUMPHREY C., YARBOUGH P.O., FAVOROV M.O., CARSON D., BRADLEY D.W., ROBERTSON B.H. Hepatitis E virus infection in chimpanzees: a retrospective analysis. *Arch. Virol.*, 2000, **145**, 1909-1918.
- MENG X.J., PURCELL R.H., HALBUR P.G., LEHMAN J.R., WEBB D.M., TSAREVA T.S., HAYNES J.S., THACKER B.J., EMERSON S.U. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1997, **94**, 9860-9865.
- MENG X.J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet. Microbiol.*, 2010, **140**, 256-265.
- MENG X.J. From Barnyard to Food Table: the Omnipresence of Hepatitis E virus and Risk for Zoonotic Infection and Food Safety. *Virus Res.*, 2011, **161**, 23-30.
- MENG X.J., ANDERSON D.A., ARANKALLE V.A., EMERSON S.U., HARRISON T.J., JAMEEL S., OKAMOTO H. Family Hepeviridae. In: King A. M., Adams M. J., Carstens E. B., Lefkowitz E. J. (Eds), *Virus Taxonomy - Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, 2011.
- MENG X.J. Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin. Liver Dis.*, 2013, **33**, 41-49.
- MOAL V., GEROLAMI R., COLSON P. First human case of co-infection with two different subtypes of hepatitis E virus. *InterVirology*, 2012, **55**, 484-487.
- MOCHIZUKI M., OUCHI A., KAWAKAMI K., ISHIDA T., LI T.C., TAKEDA N., IKEDA H., TSUNEMITSU H. Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet. Rec.*, 2006, **159**, 853-854.
- MIYAMURA T. Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Res.*, 2011, **85**, 1117-1124.
- N**
- NICAND E. C.B., TESSÉ S. Hépatite E : maladie émergente ? *Pathol. Biol.*, 2009, **57**, 203-211.

Q

OKAMOTO H. Culture systems for hepatitis E virus. *J. Gastroenterol.*, 2012.

OLIVEIRA-FILHO E.F., KÖNIG M., THIEL H.J. Genetic variability of HEV isolates: Inconsistencies of current classification. *Vet. Microbiol.*, 2013, **165**, 148-154.

OKANO H., NAKANO T., SUGIMOTO K., TAKAHASHI K., NAGASHIMA S., TAKAHASHI M., ARAI M., OKAMOTO H. A high genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan. *Hepatol. Res.*, 2013, **44**, 694-699.

OLIVEIRA-FILHO E.F., BANK-WOLF B.R., THIEL H.J., KÖNIG M. Phylogenetic analysis of hepatitis E virus in domestic swine and wild boar in Germany. *Vet. Microbiol.*, 2014, **174**, 233-238.

OSTERMAN A., VIZOSO-PINTO M.G., JUNG J., JAEGER G., EBERLE J., NITSCHKO H., BAIKER A. A novel indirect immunofluorescence test for the detection of IgG and IgA antibodies for diagnosis of Hepatitis E Virus infections. *J. Virol. Methods*, 2013, **191**, 48-54.

P

PANDA S.K., THAKRAL D., REHMAN S. Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.*, 2007, **17**, 151-180.

PAVIO N., MENG X.J., RENOU C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.*, 2010, **41**.

PERALTA B., BIARNÉS M., ORDÓÑEZ G., PORTA R., MARTÍN M., MATEU E., PINA S., MENG X.J. Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet. Microbiol.*, 2009, **137**, 31-36.

PÉREZ-GRACIA M.T., MATEOS M.L., GALIANA C., FERNÁNDEZ-BARREDO S., GARCÍA A., GÓMEZ M.T., MOREIRA V. Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2007, **77**, 893-896.

PERON J.M., DANJOUX M., KAMAR N., MISSOURY R., POIRSON H., VINEL J.P., MANSUY J.M., BUREAU C., IZOPET J., BROUSSET P., SELVES J. Liver histology in patients with sporadic acute hepatitis E: a study of 11 patients from South-West France. *Virchows Arch.*, 2007, **450**, 405-410.

POURPONGPORN P., SAMRANSURP K., ROJANASANG P., WIWATTANAKUL S., SRISURAPANON S. The prevalence of anti-hepatitis E in occupational risk groups. *J. Med. Assoc. Thai.*, 2009, **92**, 38-42.

PURCELL R.H., EMERSON S.U. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J. Hepatol.* 2008, **48**, 494-503.

PURCELL R.H., EMERSON S.U. Hidden danger: the raw facts about hepatitis E virus. *J. Infect. Dis.*, 2010, **202**, 819-821.

R

RENOU C., AFONSO A.M., PAVIO N. Foodborne transmission of hepatitis e virus from raw pork liver sausage, France. *Emerg. Infect. Dis.*, 2014, **20**, 1945-1947.

REUTER G., FODOR D., FORGÁCH P., KÁTAI A., SZUCS G. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J. Clin. Virol.*, 2009, **44**, 277-281.

REYES G.R., PURDY M.A., KIM J.P., LUK K.C., YOUNG L.M., FRY K.E., BRADLEY D.W. Isolation of a cDNA from the *Virus Res.* possible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, 1990, **247**, 1335-1339.

RIVEIRO-BARCIELA M., MINGUEZ B., GIRONES R., RODRIGUEZ-FRIAS F., QUER J., BUTI M. Phylogenetic Demonstration of Hepatitis E Infection Transmitted by Pork Meat Ingestion. *J. Clin. Gastroenterol.*, 2015, **49**, 165-168.

ROGEE S., TALBOT N., CAPERNA T., BOUQUET J., BARNAUD E., PAVIO N. New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J. Gen. Virol.*, 2013, **94**, 549-558.

ROSE N., LUNAZZI A., DORENOR V., MERBAH T., EONO F., ELOIT M., MADEC F., PAVIO N. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, 2011, **34**, 419-427.

RUGGERI F.M., DI BARTOLO I., PONTERIO E., ANGELONI G., TREVISANI M., OSTANELLO F. Zoonotic transmission of hepatitis E virus

in industrialized countries. *New Microbiol.*, 2013, **36**, 331-344.

RUTJES S.A., LODDER W.J., LODDER-VERSCHOOR F., VAN DEN BERG H.H., VENNEMA H., DUIZER E., KOOPMANS M., DE RODA HUSMAN A.M. Sources of hepatitis E virus genotype 3 in The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 2009, **15**, 381-387.

RUTJES S.A., LODDER-VERSCHOOR F., LODDER W.J., VAN DER GIESSEN J., REESINK H., BOUWKNEGT M., DE RODA HUSMAN A.M. Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands. *J. Virol. Methods*, 2010, **168**, 197-206.

S

SCHARSCHMIDT B.F. Hepatitis E: a virus in waiting. *Lancet*, 1995, **346**, 519-520.

SCHLOSSER J., EIDEN M., VINA-RODRIGUEZ A., FAST C., DREMSEK P., LANGE E., ULRICH R.G., GROSCHUP M.H. Natural and experimental hepatitis E virus genotype 3-infection in European wild boar is transmissible to domestic pigs. *Vet. Res.*, 2014, **45**, 121.

SCHLOSSER J., VINA-RODRIGUEZ A., FAST C., GROSCHUP M.H., EIDEN M. Chronically infected wild boar can transmit genotype 3 hepatitis E virus to domestic pigs. *Vet. Microbiol.*, 2015, **180**, 15-21.

SHRESTHA M.P., SCOTT R.M., JOSHI D.M., MAMMEN M.P., JR., THAPA G.B., THAPA N., MYINT K.S.,

FOURNEAU M., KUSCHNER R.A., SHRESTHA S.K., DAVID M.P., SERIWATANA J., VAUGHN D.W., SAFARY A., ENDY T.P., INNIS B.L. Safety and efficacy of a recombinant hepatitis E vaccine. *N. Engl. J. Med.*, 2007, **356**, 895-903.

SHUKLA P., NGUYEN H.T., TORIAN U., ENGLE R.E., FAULK K., DALTON H.R., BENDALL R.P., KEANE F.E., PURCELL R.H., EMERSON S.U. Cross-species infections of cultured cells by hepatitis E virus and discovery of an infectious virus-host recombinant. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 2011, **108**, 2438-2443.

SKAUG K., HAGEN I.J., VON DER LIPPE B. Three cases of acute hepatitis E virus infection imported into Norway. *Scand. J. Infect. Dis.*, 1994, **26**, 137-139.

SMITH D.B., SIMMONDS P., JAMEEL S., EMERSON S.U., HARRISON T.J., MENG X.J., OKAMOTO H., VAN DER POEL W.H., PURDY M.A. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J. Gen. Virol.*, 2015, **96**, 1191-1192.

SREENIVASAN M.A., ARANKALLE V.A., SEHGAL A., PAVRI K.M. Non-A, non-B epidemic hepatitis: visualization of virus-like particles in the stool by immune electron microscopy. *J. Gen. Virol.*, 1984, **65**, 1005-1007.

SUN Z.F., LARSEN C.T., DUNLOP A., HUANG F.F., PIERSON F.W., TOTH T.E., MENG X.J. Genetic identification of avian hepatitis E virus (HEV) from healthy chicken flocks and characterization of the capsid gene of 14 avian HEV isolates from

chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in different geographical regions of the United States. *J. Gen. Virol.*, 2004a, **85**, 693-700.

SUN Z.F., LARSEN C.T., HUANG F.F., BILLAM P., PIERSON F.W., TOTH T.E., MENG X.J. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J. Clin. Microbiol.*, 2004b, **42**, 2658-2662.

T

TAKAHASHI K., KITAJIMA N., ABE N., MISHIRO S. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology*, 2004, **330**, 501-505.

TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., MIYAJIMA H., GOTANDA Y., IITA T., TSUDA F., OKAMOTO H. Swine hepatitis E virus strains in Japan form four phylogenetic clusters comparable with those of Japanese isolates of human hepatitis E virus. *J. Gen. Virol.*, 2003, **84**, 851-862.

TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., TANAKA T., TSATSRALT-OD B., INOUE J., OKAMOTO H. Correlation between positivity for immunoglobulin A antibodies and viraemia of swine hepatitis E virus observed among farm pigs in Japan. *J. Gen. Virol.*, 2005, **86**, 1807-1813.

TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., SATO H., SATO Y., JIRINTAI D., NAGASHIMA S., OKAMOTO H. Analysis of the full-length genome of a

hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *J. Gen. Virol.*, 2011, **92**, 902-908.

TAMADA Y., YANO K., YATSUHASHI H., INOUE O., MAWATARI F., ISHIBASHI H. Consumption of wild boar linked to cases of hepatitis E. *J. Hepatol.*, 2004, **40**, 869-870.

TAMURA K., NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, **10**, 512-526.

TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S. MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 2011, **28**, 2731-2739.

TAMURA K., STECHER G., PETERSON D., FILIPSKI A., KUMAR S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.*, 2013, **30**, 2725-2729.

TEI S., KITAJIMA N., TAKAHASHI K., MISHIRO S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 2003, **362**, 371-373.

TEO C.G. Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2010, **16**, 24-32.

TEO C.G. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of

hepatitis E. *Epidemiol. Infect.*, 2012, **140**, 767-787.

THIRY D., MAUROY A., SAEGERMAN C., THOMAS I., WAUTIER M., MIRY C., CZAPLICKI G., BERKVEN S. D., PRAET N., VAN DER POEL W., CARIOLET R., BROCHIER B., THIRY E. Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium. *Vet. Microbiol.*, 2014, **27**, 407-414.

THIRY D., MAUROY A., PAVIO N., PURDY M.A., ROSE N., THIRY E., DE OLIVEIRA-FILHO E.F. Hepatitis E Virus and Related Viruses in Animals. *Transbound. Emerg. Dis.*, 2015, doi: 10.1111/tbed.12351, [Epub ahead of print].

THIRY D., MAUROY A., SAEGERMAN C., LICOPPE A., FETT T., THOMAS I., BROCHIER B., THIRY E., LINDEN A. Belgian wildlife as potential zoonotic reservoir of hepatitis E virus, *Transbound. Emerg. Dis.*, 2015, doi: 10.1111/tbed.12435, [Epub ahead of print].

THRUSFIELD M., ORTEGA C., DE BLAS I., NOORDHUIZEN J.P., FRANKENA K. WIN EPISCOPE 2.0: improved epidemiological software for veterinary medicine. *Vet. Rec.*, 2001, **148**, 567-572.

TICEHURST J., RHODES L.L., KRAWCZYNSKI K., ASHER L.V., ENGLER W.F., MENSING T.L., CAUDILL J.D., SJOGREN M.H., HOKE C.H., LEDUC J.W. Infection of owl monkeys (*Aotus trivirgatus*) and cynomolgus monkeys (*Macaca*

fascicularis) with hepatitis E virus from Mexico. *J. Infect. Dis.*, 1992, **165**, 835-845.

TSAREV S.A., EMERSON S.U., REYES G.R., TSAREVA T.S., LEGTERS L.J., MALIK I.A., IQBAL M., PURCELL R.H. Characterization of a prototype strain of hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 1992, **89**, 559-563.

TSAREV S.A., TSAREVA T.S., EMERSON S.U., GOVINDARAJAN S., SHAPIRO M., GERIN J.L., PURCELL R.H. Recombinant vaccine against hepatitis E: dose response and protection against heterologous challenge. *Vaccine*, 1997, **15**, 1834-1838.

TURNER J., GODKIN A., NEVILLE P., KINGHAM J., CH'NG C.L. Clinical characteristics of hepatitis E in a "Non-Endemic" population. *J. Med. Virol.*, 2010, **82**, 1899-1902.

V

VAN CUYCK H., FAN J., ROBERTSON D.L., ROQUES P. Evidence of recombination between divergent hepatitis E viruses. *J. Virol.*, 2005, **79**, 9306-9314.

VAN DER POEL W.H., VERSCHOOR F., VAN DER HEIDE R., HERRERA M.I., VIVO A., KOOREMAN M., DE RODA HUSMAN A.M. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, The Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.*, 2001, **7**, 970-976.

VAN DER POEL W.H. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Curr. Opin. Virol.*, 2014, **4**, 91-96.

VAN HOECKE F., VAN MAERKEN T., DE BOULLE M., GEERTS A., VLIERBERGHE V., COLLE I., PADALCO H.E. Hepatitis E seroprevalence in east and west Flanders, Belgium. *Acta Gastroenterol. Belg.*, 2012, **75**, 322-324.

VISWANATHAN R. Epidemiology. *Indian J. Med. Res.*, 1957, **45**, 1-29.

VITRAL C.L., PINTO M.A., LEWIS-XIMENEZ L.L., KHUDYAKOV Y.E., DOS SANTOS D.R., GASPARI A.M. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 2005, **100**, 117-122.

W

WANG Y.C., ZHANG H.Y., XIA N.S., PENG G., LAN H.Y., ZHUANG H., ZHU Y.H., LI S.W., TIAN K.G., GU W.J., LIN J.X., WU X., LI H.M., HARRISON T.J. Prevalence, isolation, and partial sequence analysis of hepatitis E virus from domestic animals in China. *J. Med. Virol.*, 2002, **67**, 516-521.

WIBAWA I.D., MULJONO D.H., MULYANTO, SURYADARMA I.G., TSUDA F., TAKAHASHI M., NISHIZAWA T., OKAMOTO H. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus among apparently healthy humans and pigs in Bali, Indonesia: Identification of a pig infected with a genotype 4 hepatitis E virus. *J. Med. Virol.*, 2004, **73**, 38-44.

WICHMANN O., SCHIMANSKI S., KOCH J., KOHLER M., ROTHE C.,

PLENTZ A., JILG W., STARK K. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. *J. Infect. Dis.*, 2008, **198**, 1732-1741.

WIDEN F., SUNDQVIST L., MATYI-TOTH A., METREVELI G., BELAK S., HALLGREN G., NORDER H. Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden. *Epidemiol. Infect.*, 2011, **139**, 361-371.

WILLIAMS T.P., KASORNDORKBUA C., HALBUR P.G., HAQSHENAS G., GUENETTE D.K., TOTH T.E., MENG X.J. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J. Clin. Microbiol.*, 2001, **39**, 3040-3046.

WORD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015. 90, 185-200, [en ligne] <http://www.who.int/wer/2015/wer9018.pdf>, consulté le 05.07.2015.

Y

YARBOUGH P.O., TAM A.W., GABOR K., GARZA E., MOECKLI R.A., PALINGS I., SIMENSON C., REYES R.E. Assay development of diagnostic test for hepatitis E. *Viral hepatitis and liver diseases*. 1994, 347-370.

YIN S., PURCELL R.H., EMERSON S.U. A new Chinese isolate of hepatitis E virus: comparison with strains recovered from different geographical regions. *Virus genes*, 1994, **9**, 23-32.

YU C., ZIMMERMAN C., STONE R., ENGLE R.E., ELKINS W., NARDONE G.A., EMERSON S.U., PURCELL R.H.

Using improved technology for filter paper-based blood collection to survey wild Sika deer for antibodies to hepatitis E virus. *J. Virol. Methods*, 2007, **142**, 143-150.

Z

ZHANG M., EMERSON S.U., NGUYEN H., ENGLE R.E., GOVINDARAJAN S., GERIN J.L., PURCELL R.H. Immunogenicity and protective efficacy of a vaccine prepared from 53 kDa truncated hepatitis E virus capsid protein expressed in insect cells. *Vaccine*, 2001, **20**, 853-857.

ZHANG W., SHEN Q., MOU J., GONG G., YANG Z., CUI L., ZHU J., JU G., HUA X. Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health*, 2008, **55**, 291-298.

ZHANG H.Y., CHEN D.S., WU Y.Q., HE Q.G., CHEN H.C., LIU Z.F. Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Virus Res.*, 2011, **158**, 289-293.

ZHANG Y., ZENG H., LIU P., LIU L., XIA J., WANG L., ZOU Q., WANG L., ZHUANG H. Hepatitis E vaccine immunization for rabbits to prevent animal HEV infection and zoonotic transmission. *Vaccine*, 2015, **33**, 4922-4928.

ZHAO Q., SUN Y.N., HU S.B., WANG X.J., XIAO Y.H., HSU W.H., XIAO S.Q., WANG C.B., MU Y., HISCOX J.A., ZHOU E.M. Characterization of antigenic domains and epitopes in the ORF3 protein of a Chinese isolate of avian hepatitis E virus. *Vet. Microbiol.*, 2013, **167**, 242-249.

ZHU F.C., ZHANG J., ZHANG X.F., ZHOU C., WANG Z.Z., HUANG S.J., WANG H., YANG C.L., JIANG H.M., CAI J.P., WANG Y.J., AI X., HU Y.M., TANG Q., YAO X., YAN Q., XIAN Y.L., WU T., LI Y.M., MIAO J., NG M.H., SHIH J.W., XIA N.S. Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 2010, **376**, 895-90.

Presses de la Faculté de Médecine vétérinaire de l'Université de Liège
4000 Liège (Belgique)

D/2015/0480/19

ISBN 978-2-87543-069-4



9 782875 430694