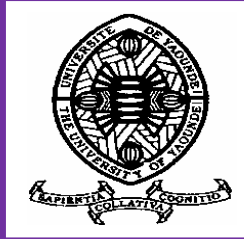


UNIVERSITE DE YAOUNDE I

FACULTE DES SCIENCES

CENTRE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE, SCIENCE DE LA VIE, SANTE ET
ENVIRONNEMENT (SVSE)

UNITE DE RECHERCHE ET DE FORMATION
DOCTORALE EN SCIENCES DE LA VIE



UNIVERSITY OF YAOUNDE I

FACULTY OF SCIENCES

CENTER FOR RESEARCH AND
GRADUATE STUDIES IN LIFE, HEALTH AND
ENVIRONMENTAL SCIENCES

UNIT FOR RESEARCH AND GRADUATE
STUDIES IN LIFE SCIENCES

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES

DEPARTMENT OF ANIMAL BIOLOGY AND PHYSIOLOGY

LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE ET ECOLOGIE

LABORATORY OF PARASITOLOGY AND ECOLOGY

Prévalence, diversité génétique et transmission inter-espèces du virus de l'hépatite E dans quelques régions du Cameroun

Thèse présentée et soutenue en vue de l'obtention du diplôme de Doctorat/Ph.D en
Biologie des Organismes Animaux

Option : Parasitologie et Ecologie

Par :

MODIYINJI Abdou Fatawou

Matricule : 08Q0642

Master en Parasitologie et Ecologie



Soutenue publiquement le 06 juillet 2022 devant le jury constitué ainsi qu'il suit :

PRESIDENT : NJIOKOU Flobert, Pr., UY1

RAPPORTEURS : NOLA Moïse, Pr., UY1


NJOUOM Richard, Directeur de Recherches, CPC

MEMBRES : MBATCHAM FON Wilfred, Pr., UY1

KOR KORO Francioli, MC., UD

NTSAMA MBALA Claudine Pr., UY1

Année Académique : 2021-2022

LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF	
UNIVERSITÉ DE YAOUNDÉ I Faculté des Sciences Division de la Programmation et du Suivi des Activités Académiques		 THE UNIVERSITY OF YAOUNDE I Faculty of Science Division of Programming and Follow-up of Academic Affairs	
LISTE DES ENSEIGNANTS PERMANENTS		LIST OF PERMANENT TEACHING STAFF	

LISTE PROTOCOLAIRE DE LA FACULTÉ DES SCIENCES

ANNÉE ACADEMIQUE 2021/2022

(Par Département et par Grade)

DATE D'ACTUALISATION 22 septembre 2021

ADMINISTRATION

DOYEN : TCHOUANKEU Jean- Claude, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DPSAA : ATCHADE Alex de Théodore, *Maître de Conférences*

VICE-DOYEN / DSSE : NYEGUE Maximilienne Ascension, *Professeur*

VICE-DOYEN / DRC : ABOSSOLO Monique, *Maître de Conférences*

Chef Division Administrative et Financière : NDOYE FOE Marie C. F., *Maître de Conférences*

Chef Division des Affaires Académiques, de la Sclolarité et de la Recherche DAASR : AJEAGAH Gideon AGHAINDUM, *Professeur*

1- DÉPARTEMENT DE BIOCHIMIE (BC) (38)			
N°	NOMS ET PRÉNOMS	GRADE	OBSERVATIONS
1	BIGOGA DAIGA Jude	Professeur	En poste
2	FEKAM BOYOM Fabrice	Professeur	En poste
3	FOKOU Elie	Professeur	En poste
4	KANSCI Germain	Professeur	En poste
5	MBACHAM FON Wilfried	Professeur	En poste
6	MOUNDIPA FEWOU Paul	Professeur	Chef de Département

7	NINTCHOM PENLAP V. épouse BENG	Professeur	En poste
8	OBEN Julius ENYONG	Professeur	En poste
9	ACHU Merci BIH	Maître de Conférences	En poste
10	ATOUGHO Barbara Mma	Maître de Conférences	En poste
11	AZANTSA KINGUE GABIN BORIS	Maître de Conférences	En poste
12	BELINGA née NDOYE FOE M. C. F.	Maître de Conférences	Chef DAF / FS
13	BOUDJEKO Thaddée	Maître de Conférences	En poste
14	DJUIDJE NGOUNOUE Marcelline	Maître de Conférences	En poste
15	EFFA NNOMO Pierre	Maître de Conférences	En poste
16	EWANE Cécile Anne	Maître de Conférences	En poste
17	MOFOR née TEUGWA Clotilde	Maître de Conférences	Inspecteur de Service MINESUP
18	NANA Louise épouse WAKAM	Maître de Conférences	En poste
19	NGONDI Judith Laure	Maître de Conférences	En poste
20	NGUEFACK Julienne	Maître de Conférences	En poste
21	NJAYOU Frédéric Nico	Maître de Conférences	En poste
22	TCHANA KOUATCHOUA Angèle	Maître de Conférences	En poste
23	AKINDEH MBUH NJI	Chargé de Cours	En poste
24	BEBEE Fadimatou	Chargée de Cours	En poste
25	BEBOY EDJENGUELE Sara Nathalie	Chargé de Cours	En poste
25	DAKOLE DABOY Charles	Chargé de Cours	En poste
26	DJUIKWO NKONGA Ruth Viviane	Chargée de Cours	En poste
27	DONGMO LEKAGNE Joseph Blaise	Chargé de Cours	En poste
28	FONKOUA Martin	Chargé de Cours	En poste
29	KOTUE KAPTUE Charles	Chargé de Cours	En poste
30	LUNGA Paul KEILAH	Chargé de Cours	En poste
31	MANANGA Marlyse Joséphine	Chargée de Cours	En poste
32	MBONG ANGIE M. Mary Anne	Chargée de Cours	En poste
33	Palmer MASUMBE NETONGO	Chargé de Cours	En poste
34	PECHANGOU NSANGOU Sylvain	Chargé de Cours	En poste

35	MBOUCHE FANMOE Marceline Joëlle	Assistante	En poste
36	OWONA AYISSI Vincent Brice	Assistant	En poste
37	WILFRIED ANGIE Abia	Assistante	En poste
2- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE ANIMALES (BPA) (46)			
1	AJEAGAH Gideon AGHAINDUM	Professeur	DAARS/FS
2	BILONG BILONG Charles-Félix	Professeur	Chef de Département
3	DIMO Théophile	Professeur	En Poste
4	DJIETO LORDON Champlain	Professeur	En Poste
5	DZEUFLET DJOMENI Paul Désiré	Professeur	En Poste
6	ESSOMBA née NTSAMA MBALA	Professeur	Vice Doyen/FMSB/UYI
7	FOMENA Abraham	Professeur	En Poste
8	KAMTCHOUING Pierre	Professeur	En poste
9	KEKEUNOU Sévilor	Professeur	En poste
10	NJAMEN Dieudonné	Professeur	En poste
11	NJIOKOU Flobert	Professeur	En Poste
12	NOLA Moïse	Professeur	En poste
13	TAN Paul VERNYUY	Professeur	En poste
14	TCHUEM TCHUENTE Louis Albert	Professeur	Inspecteur de service Coord. Progr./MINSANTE
15	ZEBAZE TOGOUET Serge Hubert	Professeur	En poste
16	BILANDA Danielle Claude	Maître de Conférences	En poste
17	DJIOGUE Séfirin	Maître de Conférences	En poste
18	JATSA BOUKENG Hermine épouse MEGAPTCHE	Maître de Conférences	En Poste
19	LEKEUFACK FOLEFACK Guy B.	Maître de Conférences	En poste
20	MEGNEKOU Rosette	Maître de Conférences	En poste
21	MONY Ruth épouse NTONE	Maître de Conférences	En Poste
22	NGUEGUIM TSOFAK Florence	Maître de Conférences	En poste
23	TOMBI Jeannette	Maître de Conférences	En poste
24	ALENE Désirée Chantal	Chargée de Cours	En poste
25	ATSAMO Albert Donatien	Chargé de Cours	En poste

26	BELLET EDIMO Oscar Roger	Chargé de Cours	En poste
27	DONFACK Mireille	Chargée de Cours	En poste
28	ETEME ENAMA Serge	Chargé de Cours	En poste
29	GOUNOUE KAMKUMO Raceline	Chargée de Cours	En poste
30	KANDEDA KAVAYE Antoine	Chargé de Cours	En poste
31	MAHOB Raymond Joseph	Chargé de Cours	En poste
32	MBENOUN MASSE Paul Serge	Chargé de Cours	En poste
33	MOUNGANG Luciane Marlyse	Chargée de Cours	En poste
34	MVEYO NDANKEU Yves Patrick	Chargé de Cours	En poste
35	NGOUATEU KENFACK Omer Bébé	Chargé de Cours	En poste
36	NGUEMBOK	Chargé de Cours	En poste
37	NJUA Clarisse Yafi	Chargée de Cours	Chef Div. UBA
38	NOAH EWOTI Olive Vivien	Chargée de Cours	En poste
39	TADU Zephyrin	Chargé de Cours	En poste
40	TAMSA ARFAO Antoine	Chargé de Cours	En poste
41	YEDE	Chargé de Cours	En poste
42	BASSOCK BAYIHA Etienne Didier	Assistant	En poste
43	ESSAMA MBIDA Désirée Sandrine	Assistante	En poste
44	KOGA MANG DOBARA	Assistant	En poste
45	LEME BANOCK Lucie	Assistante	En poste
46	YOUNOUSSA LAME	Assistant	En poste

3- DÉPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE VÉGÉTALES (BPV) (33)

1	AMBANG Zachée	Professeur	Chef Division/UYII
2	BELL Joseph Martin	Professeur	En poste
3	DJOCGOUE Pierre François	Professeur	En poste
4	MBOLO Marie	Professeur	En poste
5	MOSSEBO Dominique Claude	Professeur	En poste
6	YOUNBI Emmanuel	Professeur	Chef de Département
7	ZAPFACK Louis	Professeur	En poste
8	ANGONI Hyacinthe	Maître de Conférences	En poste

9	BIYE Elvire Hortense	Maître de Conférences	En poste
10	KENGNE NOUMSI Ives Magloire	Maître de Conférences	En poste
11	MALA Armand William	Maître de Conférences	En poste
12	MBARGA BINDZI Marie Alain	Maître de Conférences	CT/ MINESUP
13	NDONGO BEKOLO	Maître de Conférences	CE / MINRESI
14	NGODO MELINGUI Jean Baptiste	Maître de Conférences	En poste
15	NGONKEU MAGAPTCHE Eddy L.	Maître de Conférences	En poste
16	TONFACK Libert Brice	Maître de Conférences	En poste
17	TSOATA Esaïe	Maître de Conférences	En poste
18	DJEUANI Astride Carole	Chargé de Cours	En poste
19	GOMANDJE Christelle	Chargée de Cours	En poste
20	MAFFO MAFFO Nicole Liliane	Chargé de Cours	En poste
21	MAHBOU SOMO TOUKAM. Gabriel	Chargé de Cours	En poste
22	NGALLE Hermine BILLE	Chargée de Cours	En poste
23	NGOULO Lucas Vincent	Chargé de Cours	En poste
24	NNANGA MEBENGA Ruth Laure	Chargé de Cours	En poste
25	NOUKEU KOUAKAM Armelle	Chargé de Cours	En poste
26	ONANA JEAN MICHEL	Chargé de Cours	En poste
27	GODSWILL NTSOMBAH NTSEFONG	Assistant	En poste
28	KABELONG BANAHOU Louis-Paul-Roger	Assistant	En poste
29	KONO Léon Dieudonné	Assistant	En poste
30	LIBALAH Moses BAKONCK	Assistant	En poste
31	LIKENG-LI-NGUE Benoit C	Assistant	En poste
32	TAEDOUNG Evariste Hermann	Assistant	En poste
33	TEMEGNE NONO Carine	Assistant	En poste
4- DÉPARTEMENT DE CHIMIE INORGANIQUE (CI) (33)			
1	AGWARA ONDOH Moïse	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	DJOUFAC WOUMFO Emmanuel	Professeur	En poste
3	Florence UFI CHINJE épouse MELO	Professeur	<i>Recteur Univ. Ngaoundere</i>
4	GHOGOMU Paul MINGO	Professeur	<i>Ministre Chargé</i>

			<i>deMiss.PR</i>
5	NANSEU Njiki Charles Péguy	Professeur	En poste
6	NDIFON Peter TEKE	Professeur	<i>CT MINRESI</i>
7	NDIKONTAR Maurice KOR	Professeur	<i>Vice-Doyen Univ. Bamenda</i>
8	NENWA Justin	Professeur	En poste
9	NGAMENI Emmanuel	Professeur	<i>DOYEN FS UDs</i>
10	NGOMO Horace MANGA	Professeur	<i>Vice Chancellor/UB</i>
11	ACAYANKA Elie	Maître de Conférences	En poste
12	BABALE née DJAM DOUDOU	Maître de Conférences	<i>Chargée Mission P.R.</i>
13	EMADACK Alphonse	Maître de Conférences	En poste
14	KAMGANG YOUBI Georges	Maître de Conférences	En poste
15	KEMMEGNE MBOUGUEM Jean C.	Maître de Conférences	En poste
16	KONG SAKEO	Maître de Conférences	En poste
17	NDI NSAMI Julius	Maître de Conférences	En poste
18	NJIOMOU C. épouse DJANGANG	Maître de Conférences	En poste
19	NJOYA Dahirou	Maître de Conférences	En poste
20	TCHAKOUTE KOUAMO Hervé	Maître de Conférences	En poste
21	BELIBI BELIBI Placide Désiré	Chargé de Cours	CS/ ENS Bertoua
22	CHEUMANI YONA Arnaud M.	Chargé de Cours	En poste
23	KENNE DEDZO GUSTAVE	Chargé de Cours	En poste
24	KOUOTOU DAOUDA	Chargé de Cours	En poste
25	MAKON Thomas Beauregard	Chargé de Cours	En poste
26	MBEY Jean Aime	Chargé de Cours	En poste
27	NCHIMI NONO KATIA	Chargé de Cours	En poste
28	NEBA nee NDO SIRI Bridget NDOYE	Chargée de Cours	CT/ MINFEM
29	NYAMEN Linda Dyorisse	Chargée de Cours	En poste
30	PABOUDAM GBAMBIE A.	Chargée de Cours	En poste
31	NJANKWA NJABONG N. Eric	Assistant	En poste
32	PATOUJOSSA ISSOFA	Assistant	En poste

33	SIEWE Jean Mermoz	Assistant	En Poste
5- DÉPARTEMENT DE CHIMIE ORGANIQUE (CO) (34)			
1	DONGO Etienne	Professeur	Vice-Doyen/FSE/UYI
2	GHOGOMU TIH Robert Ralph	Professeur	Dir. IBAF/UDA
3	NGOUELA Silvère Augustin	Professeur	Chef de Département UDS
4	NYASSE Barthélemy	Professeur	En poste
5	PEGNYEMB Dieudonné Emmanuel	Professeur	<i>Directeur/ MINESUP/</i> Chef de Département
6	WANDJI Jean	Professeur	En poste
7	Alex de Théodore ATCHADE	Maître de Conférences	Vice-Doyen / DPSAA
8	AMBASSA Pantaléon	Maître de Conférences	En poste
9	EYONG Kenneth OBEN	Maître de Conférences	En poste
10	FOLEFOC Gabriel NGOSONG	Maître de Conférences	En poste
11	FOTSO WABO Ghislain	Maître de Conférences	En poste
12	KEUMEDJIO Félix	Maître de Conférences	En poste
13	KEUMOGNE Marguerite	Maître de Conférences	En poste
14	KOUAM Jacques	Maître de Conférences	En poste
15	MBAZOA née DJAMA Céline	Maître de Conférences	En poste
16	MKOUNGA Pierre	Maître de Conférences	En poste
17	MVOT AKAK CARINE	Maître de Conférences	En poste
18	NGO MBING Joséphine	Maître de Conférences	Sous/Direct. MINERESI
19	NGONO BIKOBO Dominique Serge	Maître de Conférences	C.E/ MINESUP
20	NOTE LOUGBOT Olivier Placide	Maître de Conférences	C.S/ MINESUP
21	NOUNGOUE TCHAMO Diderot	Maître de Conférences	En poste
22	TABOPDA KUATE Turibio	Maître de Conférences	En poste
23	TAGATSING FOTSING Maurice	Maître de Conférences	En poste
24	TCHOUANKEU Jean-Claude	Maître de Conférences	<i>Doyen /FS/ UYI</i>
25	TIH née NGO BILONG E. Anastasie	Maître de Conférences	En poste
26	YANKEP Emmanuel	Maître de Conférences	En poste
27	ZONDEGOUNBA Ernestine	Maître de Conférences	En poste

28	KAMTO Eutrophe Le Doux	Chargé de Cours	En poste
29	NGNINTEDO Dominique	Chargé de Cours	En poste
30	NGOMO Orléans	Chargée de Cours	En poste
31	OUAHOUE WACHE Blandine M.	Chargée de Cours	En poste
32	SIELINOUE TEDJON Valérie	Chargé de Cours	En poste
33	MESSI Angélique Nicolas	Assistant	En poste
34	TSEMEUGNE Joseph	Assistant	En poste
6- DÉPARTEMENT D'INFORMATIQUE (IN) (25)			
1	ATSA ETOUNDI Roger	Professeur	<i>Chef Div. MINESUP</i>
2	FOUDA NDJODO Marcel Laurent	Professeur	<i>Chef Dpt ENS/Chef IGA. MINESUP</i>
3	NDOUNDAM René	Maître de Conférences	En poste
4	ABESSOLO ALO'O Gislain	Chargé de Cours	En poste
5	AMINOUE Halidou	Chargé de Cours	<i>Chef de Département</i>
6	DJAM Xaviera YOHU - KIMBI	Chargé de Cours	En Poste
7	DOMGA KOMGUEM Rodrigue	Chargé de Cours	En poste
8	EBELE Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
9	KOUOKAM KOUOKAM E. A.	Chargé de Cours	En poste
10	MELATAGIA YONTA Paulin	Chargé de Cours	En poste
11	MONTHÉ DJIADEU Valéry M.	Chargé de Cours	En poste
12	MOTO MPONG Serge Alain	Chargé de Cours	En poste
13	OLLE OLLE Daniel Claude Delort	Chargé de Cours	Directeur adjoint Enset. Ebolowa
14	TAPAMO Hyppolite	Chargé de Cours	En poste
15	TINDO Gilbert	Chargé de Cours	En poste
16	TSOPZE Norbert	Chargé de Cours	En poste
17	WAKU KOUAMOU Jules	Chargé de Cours	En poste
18	BAYEM Jacques Narcisse	Assistant	En poste
19	EKODECK Stéphane Gaël Raymond	Assistant	En poste
20	HAMZA Adamou	Assistant	En poste
21	JIOMEKONG AZANZI Fidel	Assistant	En poste

22	MAKEMBE. S . Oswald	Assistant	En poste
23	MESSI NGUELE Thomas	Assistant	En poste
24	MEYEMDOU Nadège Sylvianne	Assistante	En poste
2 5	NKONDOCK. MI. BAHANACK.N.	Assistant	En poste
7- DÉPARTEMENT DE MATHÉMATIQUES (MA) (30)			
1	AYISSI Raoult Domingo	Professeur	Chef de Département
2	EMVUDU WONO Yves S.	Professeur	<i>Inspecteur MINESUP</i>
3	KIANPI Maurice	Maître de Conférences	En poste
4	MBANG Joseph	Maître de Conférences	En poste
5	MBEHOU Mohamed	Maître de Conférences	En poste
6	MBELE BIDIMA Martin Ledoux	Maître de Conférences	En poste
7	NKUIMI JUGNIA Célestin	Maître de Conférences	En poste
8	NOUNDJEU Pierre	Maître de Conférences	<i>Chef service des programmes & Diplômes/FS/UIYI</i>
9	TCHAPNDA NJABO Sophonie B.	Maître de Conférences	Directeur/AIMS Rwanda
10	TCHOUNDJA Edgar Landry	Maître de Conférences	En poste
11	AGHOUKENG JIOFACK Jean Gérard	Chargé de Cours	Chef Cellule MINPLAMAT
12	CHENDJOU Gilbert	Chargé de Cours	En poste
13	DJIADEU NGAHA Michel	Chargé de Cours	En poste
14	DOUANLA YONTA Herman	Chargé de Cours	En poste
15	FOMEKONG Christophe	Chargé de Cours	En poste
16	KIKI Maxime Armand	Chargé de Cours	En poste
17	MBAKOP Guy Merlin	Chargé de Cours	En poste
18	MENGUE MENGUE David Joe	Chargé de Cours	En poste
19	NGUEFACK Bernard	Chargé de Cours	En poste
20	NIMPA PEFOUKEU Romain	Chargée de Cours	En poste
21	POLA DOUNDOU Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
22	TAKAM SOH Patrice	Chargé de Cours	En poste
23	TCHANGANG Roger Duclos	Chargé de Cours	En poste

24	TETSADJIO TCHILEPECK M. E.	Chargé de Cours	En poste
25	TIAYA TSAGUE N. Anne-Marie	Chargée de Cours	En poste
26	BITYE MVONDO Esther Claudine	Assistante	En poste
27	MBATAKOU Salomon Joseph	Assistant	En poste
28	MBIAKOP Hilaire George	Assistant	En poste
29	MEFENZA NOUNTU Thiery	Assistant	En poste
30	TCHEUTIA Daniel Duviol	Assistant	En poste
8- DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE (MIB) (18)			
1	ESSIA NGANG Jean Justin	Professeur	<i>Chef de Département</i>
2	NYEGUE Maximilienne Ascension	Professeur	<i>VICE-DOYEN / DSSE</i>
3	NWAGA Dieudonné M.	Professeur	En poste
4	ASSAM ASSAM Jean Paul	Maître de Conférences	En poste
5	BOYOMO ONANA	Maître de Conférences	En poste
6	RIWOM Sara Honorine	Maître de Conférences	En poste
7	SADO KAMDEM Sylvain Leroy	Maître de Conférences	En poste
8	BODA Maurice	Chargé de Cours	En poste
9	BOUGNOM Blaise Pascal	Chargé de Cours	En poste
10	ESSONO OBOUGOU Germain G.	Chargé de Cours	En poste
11	NJIKI BIKOÏ Jacky	Chargée de Cours	En poste
12	TCHIKOUA Roger	Chargé de Cours	En poste
13	ESSONO Damien Marie	Assistant	En poste
14	LAMYE Glory MOH	Assistant	En poste
15	MEYIN A EBONG Solange	Assistante	En poste
16	NKOUDOU ZE Nardis	Assistant	En poste
17	SAKE NGANE Carole Stéphanie	Assistante	En poste
18	TOBOLBAÏ Richard	Assistant	En poste
9. DEPARTEMENT DE PYSIQUE(PHY) (40)			
1	BEN- BOLIE Germain Hubert	Professeur	En poste
2	DJUIDJE KENMOE épouse ALOYEM	Professeur	En poste
3	EKOBENA FOU DA Henri Paul	Professeur	<i>Vice-Recteur. UN</i>

4	ESSIMBI ZOBO Bernard	Professeur	En poste
5	KOFANE Timoléon Crépin	Professeur	En poste
6	NANA ENGO Serge Guy	Professeur	En poste
7	NANA NBENDJO Blaise	Professeur	En poste
8	NDJAKA Jean Marie Bienvenu	Professeur	Chef de Département
9	NJANDJOCK NOUCK Philippe	Professeur	En poste
10	NOUAYOU Robert	Professeur	En poste
11	PEMHA Elkana	Professeur	En poste
12	TABOD Charles TABOD	Professeur	Doyen FS Univ/Bda
13	TCHAWOUA Clément	Professeur	En poste
14	WOAFO Paul	Professeur	En poste
15	ZEKENG Serge Sylvain	Professeur	En poste
16	BIYA MOTTO Frédéric	Maître de Conférences	DG/HYDRO Mekin
17	BODO Bertrand	Maître de Conférences	En poste
18	ENYEGUE A NYAM épouse BELINGA	Maître de Conférences	En poste
19	EYEBE FOU DA Jean sire	Maître de Conférences	En poste
20	FEWO Serge Ibraïd	Maître de Conférences	En poste
21	HONA Jacques	Maître de Conférences	En poste
22	MBANE BIOUELE César	Maître de Conférences	En poste
23	MBINACK Clément	Maître de Conférences	En poste
24	NDOP Joseph	Maître de Conférences	En poste
25	SAIDOU	Maître de Conférences	MINRESI
26	SIEWE SIEWE Martin	Maître de Conférences	En poste
27	SIMO Elie	Maître de Conférences	En poste
28	VONDOU Derbetini Appolinaire	Maître de Conférences	En poste
29	WAKATA née BEYA Annie	Maître de Conférences	Directeur/ENS/UYI
30	ABDOURAHIMI	Chargé de Cours	En poste
31	CHAMANI Roméo	Chargé de Cours	En poste
32	EDONGUE HERVAIS	Chargé de Cours	En poste
33	FOUEDJIO David	Chargé de Cours	Chef Cell. MINADER

34	MBONO SAMBA Yves Christian U.	Chargé de Cours	En poste
35	MELI'I Joelle Larissa	Chargée de Cours	En poste
36	MVOGO ALAIN	Chargé de Cours	En poste
37	OBOUNOU Marcel	Chargé de Cours	DA/Univ Inter Etat/Sangmalima
38	WOULACHE Rosalie Laure	Chargée de Cours	En poste
39	AYISSI EYEBE Guy François Valérie	Assistant	En poste
40	TEYOU NGOUPOU Ariel	Assistant	En poste
10- DÉPARTEMENT DE SCIENCES DE LA TERRE (ST) (43)			
1	BITOM Dieudonné	Professeur	<i>Doyen / FASA / UDs</i>
2	FOUATEU Rose épouse YONGUE	Professeur	En poste
3	NDAM NGOUPAYOU Jules-Remy	Professeur	En poste
4	NDJIGUI Paul Désiré	Professeur	Chef de Département
5	NGOS III Simon	Professeur	En poste
6	NKOUMBOU Charles	Professeur	En poste
7	NZENTI Jean-Paul	Professeur	En poste
8	ABOSSOLO née ANGUE Monique	Maître de Conférences	<i>Vice-Doyen / DRC</i>
9	BISSO Dieudonné	Maître de Conférences	<i>Directeur/Projet Barrage Memve'ele</i>
10	EKOMANE Emile	Maître de Conférences	En poste
11	GANNO Sylvestre	Maître de Conférences	En poste
12	GHOGOMU Richard TANWI	Maître de Conférences	CD/Uma
13	MOUNDI Amidou	Maître de Conférences	<i>CT/ MINIMDT</i>
14	NGUEUTCHOUA Gabriel	Maître de Conférences	CEA/MINRESI
15	NJILAH Isaac KONFOR	Maître de Conférences	En poste
16	NYECK Bruno	Maître de Conférences	En poste
17	ONANA Vincent Laurent	Maître de Conférences	<i>Chef service Maintenance & du Matériel/UYII</i>
18	TCHAKOUNTE J. épouse NOUMBEM	Maître de Conférences	<i>Chef.cell / MINRESI</i>
19	TCHOUANKOUE Jean-Pierre	Maître de Conférences	En poste
20	TEMDJIM Robert	Maître de Conférences	En poste

21	YENE ATANGANA Joseph Q.	Maître de Conférences	<i>Chef Div. /MINTP</i>
22	ZO'O ZAME Philémon	Maître de Conférences	<i>DG/ART</i>
23	ANABA ONANA Achille Basile	Chargé de Cours	En poste
24	BEKOA Etienne	Chargé de Cours	En poste
25	ELISE SABABA	Chargé de Cours	En poste
26	ESSONO Jean	Chargé de Cours	En poste
27	EYONG JOHN TAKEM	Chargé de Cours	En poste
28	FUH Calistus Gentry	Chargé de Cours	<i>Sec. D'Etat/MINMIDT</i>
29	LAMILEN BILLA Daniel	Chargé de Cours	En poste
30	MBESSE CECILE OLIVE	Chargée de Cours	En poste
31	MBIDA YEM	Chargé de Cours	En poste
32	METANG Victor	Chargé de Cours	En poste
33	MINYEM Dieudonné-Lucien	Chargé de Cours	<i>CD/Uma</i>
34	NGO BELNOUN Rose Noël	Chargée de Cours	En poste
35	NGO BIDJECK Louise Marie	Chargée de Cours	En poste
36	NOMO NEGUE Emmanuel	Chargé de Cours	En poste
37	NTSAMA ATANGANA Jacqueline	Chargé de Cours	En poste
38	TCHAPTCHET TCHATO De P.	Chargé de Cours	En poste
39	TEHNA Nathanaël	Chargé de Cours	En poste
40	TEMGA Jean Pierre	Chargé de Cours	En poste
41	FEUMBA Roger	Assistant	En poste
42	MBANGA NYOBE Jules	Assistant	En poste

Répartition chiffrée des Enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université de Yaoundé I

NOMBRE D'ENSEIGNANTS					
DÉPARTEMENT	Professeurs	Maîtres de Conférences	Chargés de Cours	Assistants	Total
BCH	8 (01)	14 (10)	13 (05)	3 (02)	38 (18)
BPA	15 (01)	8 (06)	18 (05)	05 (02)	46 (14)
BPV	07 (01)	10 (01)	9 (06)	07 (01)	33 (9)
CI	10 (01)	10 (02)	10 (02)	03 (0)	33 (5)
CO	6 (0)	21 (05)	05 (02)	02 (0)	34(7)
IN	2 (0)	1 (0)	14 (01)	08 (01)	25 (2)
MAT	2 (0)	8 (0)	15 (01)	05 (02)	30 (3)
MIB	3 (0)	4 (02)	05 (01)	06 (02)	18 (5)
PHY	15 (0)	14 (02)	09 (03)	02 (0)	40 (5)
ST	7 (1)	15 (01)	18 (05)	02 (0)	42(7)
Total	75 (5)	105 (29)	116 (31)	43 (10)	339 (75)

Soit un total de **339 (75)** dont :

- Professeurs **75 (5)**
- Maîtres de Conférences **105 (29)**
- Chargés de Cours **116 (31)**
- Assistants **43 (10)**

() = Nombre de Femmes **75**

Dédicace

A toute ma famille

Remerciements

Ce travail a pu être réalisé grâce au soutien d'institutions et aux conseils de nombreuses personnes. C'est pour moi l'occasion d'exprimer ma reconnaissance à **Dieu le Tout Puissant et le Très Miséricordieux** ; et à tous ceux qui ont guidé de leurs conseils ou aidé à sa réalisation. Ma profonde gratitude s'adresse :

- Au **Pr Njouom Richard** mon Directeur de thèse, d'avoir accepté de diriger ce travail, de m'intégrer dans votre équipe et de mettre à ma disposition toute la logistique nécessaire. Merci de m'avoir accueilli dans votre laboratoire et de m'avoir confié ce travail passionnant sur les hépatites virales. Votre enthousiasme, votre rigueur et votre perfectionnisme sont des modèles à suivre. La perspective de pouvoir continuer à travailler dans votre équipe est pour moi un grand honneur ;

- Au **Pr Nola Moise** mon Superviseur, d'avoir accepté de superviser ce travail de thèse et de m'accueillir dans votre équipe. Votre rigueur, vos remarques, vos réflexions, vos encouragements et échanges très productifs m'ont été d'un grand intérêt. Vos relectures attentives ont contribué à l'amélioration significative de ce manuscrit. Je vous en suis très reconnaissant et je vous prie d'accepter mes remerciements les plus sincères ;

- Au Centre Pasteur du Cameroun à travers son Directeur Général pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser mes travaux dans un Laboratoire de Référence ;

- Au personnel de l'Unité des maladies infectieuses, « *Hospital Universitario Reina Sofía, Instituto Maimónides d'Investigación Biomédica de Córdoba* » pour votre collaboration, particulièrement **Dr Antonio Rivero-Juarez et Dr Pedro Lopez-Lopez** ;

- Aux membres de mon Jury de thèse plus particulièrement le président et les examinateurs pour votre participation. Vous avez apporté vos corrections et commentaires à ce manuscrit. Ces remarques ont permis indubitablement à améliorer ce travail. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance ;

- A l'ensemble des cadres scientifiques du Service de virologie du CPC: **Dr Sadeuh-Mba Serge Alain, Dr Ngoupo Paul Alain, Dr Endegue Zanga Marie Claire, Dr Ngu Abanda, Dr Djuicy Délia** pour vos remarques, suggestions, expertises et multiples encouragements ;

- A **Dr Kenmoe Sébastien, Dr Amougou Atsama Marie, Dr Monamele Chavely Gwladys, Dr Ngo Malabo Elodie, Dr Njifon Landry, Dr Tchatchouang Serges, Nfonkou Toumansie Jacques, Sowe Jocélyne, Ebogo Thierry, Mekanda Obam, Touoyem Pascal Ibrahim, Yimfomju Henry et Mouchili Aristide** pour tous ces moments mémorables passés ensemble ;

- A tous les techniciens du Service de virologie du Centre Pasteur du Cameroun qui ont toutes contribué, de différentes manières, à la réussite de ces travaux ;

- A tous les enseignants du Département de Biologie et Physiologie Animales de l'université de Yaoundé 1, pour les enseignements reçus ;

- A tous ceux qui de près ou de loin ont contribué à la réalisation de ce travail, je vous remercie sincèrement pour vos multiples soutiens.

Sommaire

LISTE PROTOCOLAIRE DE LA FACULTÉ DES SCIENCES	i
DEDICACE	xv
REMERCIEMENTS	xvi
SOMMAIRE	xvii
LISTE DES TABLEAUX.....	xix
LISTE DES FIGURES	xx
LISTE DES ABREVIATIONS.....	xxi
RESUME	xxii
ABSTRACT.....	xxiii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE	5
I.1. Généralités sur le virus de l'hépatite E.....	6
I.1.1. Historique de la découverte du virus de l'hépatite E.....	6
I.1.2. Organisation génomique du virus de l'hépatite E	7
I.1.3. Les protéines virales et leurs fonctions	8
I.1.4. Taxonomie du virus de l'hépatite E	10
I.1.5. Diversités génétiques et réservoirs du virus de l'hépatite E.....	10
I.1.6. Multiplication du virus de l'hépatite E.....	13
I.1.7. Propriétés physico-chimiques du virus de l'hépatite E	14
I.1.8. Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite E	15
I.1.9. Manifestations cliniques de l'infection par le virus de l'hépatite E.....	18
I.2. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite E dans le monde.....	19
I.2.1. Prévalence du virus de l'hépatite E dans le monde	19
I.2.2. Mode de contamination du virus de l'hépatite E.....	26
I.2.3. Cinétique d'apparition des marqueurs d'infection par le VHE.....	29
I.2.4. Diagnostic du virus de l'hépatite E	30
I.2.5. Traitement de l'infection par le virus de l'hépatite E.....	33
I.2.6. Prévention de l'infection par le virus de l'hépatite E.....	33
CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES	35

II.1. Cadre d'étude	36
II.1.1. Présentation des sites d'étude	36
II.1.2. Période et type d'étude.....	36
II.2. Population d'étude	36
II.2.1. Critères d'inclusion et de non-inclusion	37
II.2.2. Considérations éthiques et administratives	37
II.3. Méthodes	38
II.3.1. Echantillonnage.....	38
II.3.2. Prélèvements, traitement et conservation des échantillons	40
II.3.3. Détermination de la séroprévalence du VHE Cameroun	40
II.3.4. Caractérisation génétique du VHE au Cameroun	43
II.3.5. Evaluation de la transmission inter-espèces du VH au Cameroun	61
II.3.6. Analyses statistiques des données obtenues.....	62
CHAPITRE III : RESULTATS	63
III.1. Séroprévalence du VHE chez les humains, PNH et porcs.....	64
III.1.1. Séroprévalence du VHE chez les humains	64
III.1.2. Séroprévalence du VHE chez les porcs	67
III.1.3. Séroprévalence du VHE chez les primates non humains	69
III.2. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les humains et les animaux.....	71
III.2.1. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les porcs.....	71
III.2.2. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les PNH	73
III.2.3. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les humains.....	73
III.3. Etude de la transmission inter-espèces du VHE au Cameroun.....	76
CHAPITRE IV : DISCUSSION	79
CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS.....	87
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	90
ANNEXES	114

Liste des tableaux

Tableau I : Mélange réactionnel pour l'amplification du VHE chez les porcs	45
Tableau II : Programme de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les porcs	46
Tableau III : Amorces de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les porcs	46
Tableau IV : Mélange de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les porcs	47
Tableau V : Programme de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les porcs	47
Tableau VI : Amorces de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les porcs	48
Tableau VII : Mélange réactionnel de la RT-PCR temps réel pour l'amplification du VHE chez les humains et les PNH.....	50
Tableau VIII : Programme de la RT-PCR temps réel pour l'amplification du VHE chez les humains et les PNH.....	51
Tableau IX : Réactifs, séquences des amorces et sondes utilisées lors de la RT-PCR temps réel pour l'amplification du VHE chez es humains et les PNH.....	52
Tableau X : Amorces de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains.....	53
Tableau XI : Mélange de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains	54
Tableau XII : Programme de PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains ..	54
Tableau XIII : Composition de mélange réactionnel de PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains	55
Tableau XIV : Programme de PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains..	55
Tableau XV : Amorces de PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains.....	56
Tableau XVI : Résultats de la détection des anticorps anti-VHE dans les différentes populations humaines	65
Tableau XVII : Séroprévalence du VHE, caractéristiques démographiques et alimentaires au sein de différentes populations humaines.	65
Tableau XVIII : Séroprévalences du VHE chez les porcs	68
Tableau XIX : Séroprévalence du VHE en fonction d'âge, sexe, ville de prélèvement.	69
Tableau XX : Séroprévalence du VHE dans diverses espèces de PNH	70

Liste des figures

Figure 1 : Morphologie du VHE obtenue par reconstitution informatique	7
Figure 2 : Image en microscopie électronique du VHE chez un patient humain.....	7
Figure 3 : Organisation du génome du VHE.....	8
Figure 4 : Classification taxonomique du VHE.....	12
Figure 5 : Photos de quelques réservoirs animaux du VHE	12
Figure 6 : Schéma du cycle de réplication du VHE.....	14
Figure 7 : Répartition géographique du VHE	21
Figure 8 : Carte de l'Afrique montrant la situation du VHE	23
Figure 9 : Voies de transmission des 4 principaux géotypes du VHE	29
Figure 10 : Cinétique d'apparition des anticorps et évolution des alanines amino- transférases (ALAT) lors de l'infection par le VHE	30
Figure 11 : Principe d'un test immuno-enzymatique indirect.....	42
Figure 12 : Exemple de microplaque ELISA après lecture au spectrophotomètre.....	43
Figure 13 : Exemple de présentation des amplifications après RT-PCR temps réel.	53
Figure 14 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger	59
Figure 15 : Photo d'un gel montrant un échantillon porcin positif obtenu après une RT-PCR nichée.	71
Figure 16 : Arbre phylogénétique du VHE identifié chez les porcs basé sur un fragment de la région ORF2.	72
Figure 17 : Arbre phylogénétique du VHE détecté chez les humains basé sur un fragment de l'ORF2.	75
Figure 18 : Arbre phylogénétique du VHE détecté chez les humains et les porcs basé sur un fragment l'ORF2.....	77

Liste des abréviations

ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
Anti-VHE	Anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite E
CPC	Centre Pasteur du Cameroun
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
ORF	Open reading frame
Pb	Paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
PNH	Primate non humain
PVVIH	Personnes vivant avec le virus de l'immunodéficience humaine
q-PCR	Quantitative polymerase chain reaction
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-nPCR	Reverse transcription nested polymerase chain reaction
VHE	Virus de l'hépatite E

Résumé

L'infection par le virus de l'hépatite E (VHE) représente un problème majeur de Santé Publique dans le monde. Le Cameroun est situé dans une zone hyper-endémique mais la situation épidémiologique de l'infection par le VHE est encore mal connue. L'objectif général de cette étude était de documenter l'épidémiologie de l'infection par le VHE au Cameroun. Une étude transversale a été menée chez les personnes vivant avec le VIH, femmes enceintes, personnes âgées (>60 ans), les personnes suspectées de fièvre jaune, les porcs et les primates non humains. La recherche des anticorps anti-VHE a été réalisée en utilisant les kits commerciaux ELISA. La diversité génétique et la transmission inter-espèces ont été réalisées grâce aux techniques de RT-PCR temps réel et nichée, au séquençage et aux analyses phylogénétiques. Sur un total de 903 échantillons humains (450 personnes âgées de plus de 60 ans, 183 femmes enceintes et 270 patients vivant avec le VIH), 31,3% (283/903) étaient positifs pour au moins l'un des marqueurs sérologiques. Chez les personnes âgées, 39,8% (179/450) étaient positifs aux IgM anti-VHE et 10,2% (46/450) aux IgG anti-VHE. Chez les femmes enceintes, 14,7% (27/183) étaient positifs aux IgM anti-VHE et 4,9% (9/183) aux IgG anti-VHE. Au sein des personnes vivant avec le VIH, 9,3% (25/270) et 10,7% (29/270) étaient positifs aux IgM et IgG anti-VHE, respectivement. Un taux de détection d'ARN par RT-PCR temps réel de 19,1% (22/115) a été observé. Les analyses phylogénétiques ont permis d'identifier chez les personnes suspectées de fièvre jaune, le génotype 1, sous-type 1e et le génotype 3, sous-type 3f. Chez les porcs, 32,52% (200/615) étaient positifs aux IgM anti-VHE et 21,3% (131/615) aux IgG anti-VHE. L'ARN du VHE a été amplifié par RT-PCR nichée chez 5,9% (8/136) des porcs IgM anti-VHE positifs. Les analyses phylogénétiques avaient permis d'identifier le génotype 3 chez les porcs. Chez les primates non humains, 5,2% (9/172) et 2,3% (4/172) étaient positifs aux IgG et IgM anti-VHE, respectivement. L'ARN du VHE n'a pas été détecté dans les échantillons de PNH. Les analyses phylogénétiques comparant les séquences porcines et humaines ont permis de suggérer une possibilité de transmission zoonotique du VHE. Nos résultats apportent de nouvelles données sur la situation épidémiologique de l'infection par le VHE au Cameroun.

Mots clés : Virus de l'hépatite E, diversité génétique, séroprévalence, transmission inter-espèces, Cameroun.

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) infection is a major public health problem worldwide. Cameroon is located in a hyper-endemic region but the epidemiological situation of HEV infection is still poorly known. The overall objective of this study was to document the epidemiology of HEV infection in Cameroon. A cross-sectional study was conducted in people living with HIV, pregnant women, elderly people (>60 years old), people suspected of yellow fever, pigs and non-human primates. The search for anti-HEV antibodies was carried out using commercial ELISA kits. Genetic diversity and inter-species transmission were achieved using real-time and nested RT-PCR techniques, sequencing and phylogenetic analyses. Of a total of 903 human samples (450 people aged over 60, 183 pregnant women and 270 patients living with HIV), 31.3% (283/903) were positive for at least one of the serological markers. In the elderly, 39.8% (179/450) were positive for anti-HEV IgM and 10.2% (46/450) for anti-HEV IgG. In pregnant women, 14.7% (27/183) were positive for anti-HEV IgM and 4.9% (9/183) for anti-HEV IgG. Among people living with HIV, 9.3% (25/270) and 10.7% (29/270) were anti-HEV IgM and IgG positive, respectively. A real-time RT-PCR RNA detection rate of 19.1% (22/115) was observed. Phylogenetic analyzes have identified in people suspected of yellow fever, genotype 1, subtype 1e and genotype 3, subtype 3f. In animals, 32.52% (200/615) of pigs were positive for anti-HEV IgM and 21.3% (131/615) for anti-HEV IgG. HEV RNA was amplified by nested RT-PCR in 5.9% (8/136) of anti-HEV IgM positive pigs. Phylogenetic analyzes had identified genotype 3 in pigs. Among NHPs, 5.2% (9/172) and 2.3% (4/172) were positive for anti-HEV IgG IgM, respectively. HEV RNA was not detected in non-human primate samples. Phylogenetic analyzes comparing porcine and human sequences suggested the possibility of zoonotic transmission of HEV. Our results provide new data on the epidemiological situation of HEV infection in Cameroon.

Keywords: Hepatitis E virus, genetic diversity, seroprevalence, inter-species transmission, Cameroon.

INTRODUCTION

Les hépatites virales constituent un problème de santé mondial, en particulier l'hépatite virale E dont l'agent causal est le virus de l'hépatite E (VHE) (Kamar *et al.*, 2012). Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), le nombre annuel de cas symptomatiques est estimé à plus de 3 millions et le nombre de décès à environ 70000 par ans (Rein *et al.*, 2012).

Le VHE est un virus à ARN appartenant à la famille des *Hepeviridae* qui contient plusieurs espèces réparties en deux genres : *Orthohepevirus* avec quatre espèces (*Orthohepevirus A – D*) et *Piscihepevirus* avec une espèce (*Piscihepevirus A*) (Spahr *et al.*, 2017). Les souches qui infectent les humains appartiennent à l'espèce *Orthohepevirus A* qui contient 8 génotypes (1-8) (Sridhar *et al.*, 2017).

L'infection par le VHE est généralement spontanément résolutive, mais des formes fulminantes peuvent survenir chez les personnes à risque que sont les personnes âgées, les femmes enceintes, les patients présentant une maladie hépatique préexistante ou les personnes immunodéprimées. Le taux de létalité dans la population générale varie entre 1-4% mais peut atteindre 30% chez les femmes enceintes (Marano *et al.*, 2015).

Plusieurs voies de transmission du VHE ont été identifiées dont les plus documentées sont : la transmission par la consommation d'eau contaminée et la transmission par ingestion de viande d'animaux infectés. Dans les pays à ressources limitées, les génotypes 1 et 2 du VHE, responsable des épidémies sont transmis principalement par la consommation d'eau contaminée par le VHE tandis que dans les pays développés, les génotypes 3 et 4 responsables des cas sporadiques, sont transmis principalement par la consommation de la viande de certains animaux contaminés.

L'hépatite virale E est hyper-endémique dans de nombreux pays en développement comme l'Inde, le Bangladesh, la Chine, le Soudan et de nombreux autres pays africains où d'importantes épidémies d'origine hydrique sont connues (Kim *et al.*, 2014). Dans les pays développés, l'hépatite E est considérée comme une maladie émergente avec des cas sporadiques signalés dans de nombreux pays (Navaneethan *et al.*, 2008).

Une revue publiée en 2014 montre que plus d'une dizaine d'épidémies dues au VHE a déjà frappé l'Afrique depuis la découverte de ce virus et certaines de ces épidémies sont restées sans explications claires sur leurs origines. Cette même revue montre que les données sur la séroprévalence chez les humains proviennent de 35 études menées dans 13 pays avec les prévalences qui varient en fonction des pays (Kim *et al.*, 2014). Cette étude montre en plus des génotypes 1 et 2, la présence du génotype 3 chez les humains (Kim *et al.*, 2014). La

présence de ce génotype chez les humains laisse penser à une autre voie de transmission (transmission zoonotique) autre que celle connue (transmission oro-fécale) en Afrique.

Les études sur la circulation du VHE chez les animaux en Afrique ne sont pas communément rapportées. Ce scénario n'est pas dû à l'absence du virus chez les animaux en Afrique mais à un manque d'activités de surveillance (Owolodun *et al.*, 2014). Néanmoins, les porcs domestiques sont reconnus comme étant des réservoirs de VHE en Afrique à travers quelques études disparates qui ont mis en évidence la circulation du génotype 3.

La situation épidémiologique de l'infection par le VHE au Cameroun n'est pas bien définie. Elle fait l'objet de nombreuses controverses entre les études. En effet, l'Organisation Mondiale de la Santé et le Centre de Contrôle et de Prévention des Maladies (En anglais Center for Disease Control and Prevention, CDC) classent l'Afrique sub-saharienne parmi les régions hyper-endémiques. La revue publiée par Ruggeri *et al.* (2013) confirme cette position en montrant que le VHE est hyper-endémique au Tchad et en République Centrafricaine, pays voisins du Cameroun mais classe ce dernier parmi les pays non endémique. Une autre revue publiée par Kim *et al.* (2014) confirme bien l'hyper-endémicité du VHE dans cette région d'Afrique mais situe le Cameroun plutôt parmi les pays où la situation épidémiologique est encore inconnue. En parcourant ces études, il en ressort que cette difficulté à situer épidémiologiquement le Cameroun résulte du fait de l'absence ou de l'insuffisance des données au Cameroun. En effet, seulement trois études dont une chez les porcs et deux chez les humains sont disponibles au Cameroun. Ces études bien qu'étant insuffisantes, montrent d'une part la présence du génotype 3 du VHE chez les porcs et d'autre part une prévalence élevée des anticorps anti-VHE chez les humains (de Paula *et al.*, 2013 ; Demanou *et al.*, 2013 ; Feldt *et al.*, 2013). Ces données laissent penser à une sous-estimation du fardeau de l'infection par le VHE au Cameroun. A l'exception d'une seule étude menée chez les personnes vivant avec le VIH, aucune étude chez d'autres personnes à risque de développer les formes graves ou fulminantes de l'infection par le VHE que sont les femmes enceintes et les personnes âgées n'est disponible. Aucune étude moléculaire sur le VHE chez les humains n'a été réalisée pour caractériser les génotypes qui y circulent. Le Cameroun héberge des espèces animales (porcs, primates non humains etc...) reconnues comme réservoirs du VHE à travers le monde mais seule une étude menée chez les porcs est disponible (de Paula *et al.*, 2013). Cette étude montre une circulation du génotype 3 chez les porcs qui est responsable de la zoonose dans les pays développés, ce qui laisse penser à une possibilité transmission zoonotique du VHE au Cameroun.

Au regard de toutes ces observations, la question de recherche suivante a été dégagée :

- Quelle est la situation épidémiologique réelle de l'infection par le virus de l'hépatite E au Cameroun?

Cette question de recherche nous a permis d'émettre les hypothèses suivantes :

- Le VHE circulerait au sein des populations animales et humaines camerounaises de manière endémique au regard de sa situation géographique en zone d'endémicité pour ce virus ;

- Plusieurs géotypes du VHE circuleraient dans les populations animales et humaines au regard des précédentes études réalisées dans les pays voisins tels que le Nigeria, la République Centrafricaine et le Tchad ;

- Il existerait une possibilité de transmission zoonotique du VHE entre les populations animales et humaines comme c'est le cas dans les pays développés.

C'est ainsi que nous avons fixé pour objectif général de cette étude de documenter l'épidémiologie de l'infection par le VHE au Cameroun.

Plus spécifiquement, il s'est agit de :

- Déterminer la séroprévalence du VHE d'une part chez les personnes à risque (femmes enceintes, personnes âgées, personnes vivant avec le VIH), d'autre part chez les potentiels réservoirs du VHE (primates non humains, porcs) ;

- Réaliser la caractérisation génétique des souches de VHE qui circulent dans ces populations;

- Evaluer la possibilité de transmission inter-espèces du VHE entre les humains et animaux au Cameroun.

.

CHAPITRE I : REVUE DE LA LITTERATURE

I.1. Généralités sur le virus de l'hépatite E

I.1.1. Historique de la découverte du virus de l'hépatite E

Les premiers agents viraux responsables des grandes épidémies au 19^{ème} siècle ont été identifiés dans les années 1970 et furent nommés virus de l'hépatite A (VHA) et virus de l'hépatite B (VHB) (MacCallum, 1972). L'existence de l'agent causal d'une autre forme d'hépatite virale non A, non B a été postulée pour la première fois en 1980 suite à une épidémie qui s'est déroulée en Inde en 1978. La confirmation de l'existence de ce nouvel agent fut apportée en 1983 par Balayan qui après avoir ingéré des extraits de selles de patients déjà immunisés contre l'hépatite A mais présentant une hépatite, développa une hépatite clinique au bout de 36 jours. Le recueil de ses selles permit de mettre en évidence des particules qui agglutinaient avec les sérums de patients convalescents ayant eu une hépatite non A, non B. A l'inverse, aucune agglutination n'était observée avec les sérums de patients ayant eu une hépatite A ou B (Balayan *et al.*, 1983). Une partie de l'ADN complémentaire de ce nouvel agent a été isolé en 1990 par l'équipe de Reyes (Reyes *et al.*, 1990). Cette découverte a rapidement été suivie par le séquençage du génome complet des souches isolées en Asie et au Mexique (Huang *et al.*, 1992 ; Tam *et al.*, 1991). C'est à ce moment que le virus a été baptisé virus de l'hépatite E. Par la suite, un test de détection des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite E fut développé (Dawson *et al.*, 1992).

Des études rétrospectives ont montré que la première épidémie d'hépatite virale E d'origine hydrique était survenue dans les années 1955-1956 en Inde (Viswanathan, 2013). D'autres études ont montré que le VHE a été principalement lié aux épidémies humaines dans certains pays asiatiques (Purcell *et al.*, 2008). Au cours de ces différentes épidémies, la principale voie de transmission rapportée était essentiellement féco-orale par consommation de l'eau contaminée par des déchets humains (Teshale *et al.*, 2010). La transmission zoonotique du VHE a été pour la première fois évoquée en 1997 aux USA, avec l'identification de VHE isolé du porc (Meng *et al.*, 1997). En Afrique, la première épidémie documentée s'est probablement produite en 1950 en Tunisie et depuis que les tests de diagnostic du VHE sont devenus disponibles dans les années 1980, de nombreuses épidémies ont été rapportées (Kim *et al.*, 2014).

I.1.2. Organisation génomique du virus de l'hépatite E

Le VHE est un virus non enveloppé, sphérique, à capsidre de symétrie icosaédrique d'environ 32-34 nm de diamètre (Figures 1 et 2). Le génome est un ARN monocaténaire de 7200 nucléotides et de polarité positive. Il possède une queue polyadénylée en 3' et une coiffe guanidine 7-méthyle (m7G) en 5'. Les extrémités 3' et 5' sont non codantes (Reyes *et al.*, 1990 ; Tam *et al.*, 1991). La partie codante du génome du VHE est divisée en trois cadres de lecture ouverts (Open Reading Frames : ORF) partiellement chevauchantes appelées : ORF1, ORF2 et ORF3 (Figure 3). Avec une taille approximative de 5kb, l'ORF1 est situé à l'extrémité 5' et code une polyprotéine non structurale d'environ 1693 acides aminés. ORF2, d'environ 2kb, code la protéine de capsidre de 660 acides aminés. Enfin, ORF3 d'une région d'environ 350 pb code une protéine de 113 acides aminés dont la fonction exacte doit être déterminée (Holla *et al.*, 2013).

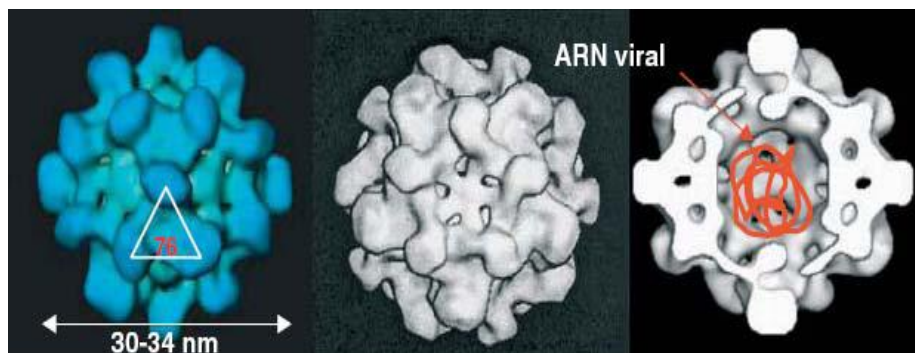


Figure 1 : Morphologie du VHE obtenue par reconstitution informatique (Xing *et al.*, 2008).

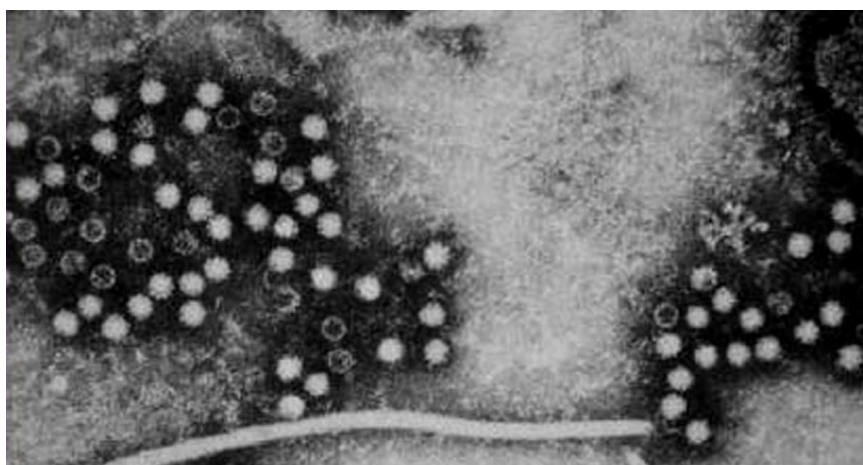


Figure 2 : Image en microscopie électronique du VHE chez un patient humain (D'après les données du CDC, 2014)

La figure 3 ci-après illustre ainsi l'organisation générale du génome du VHE.

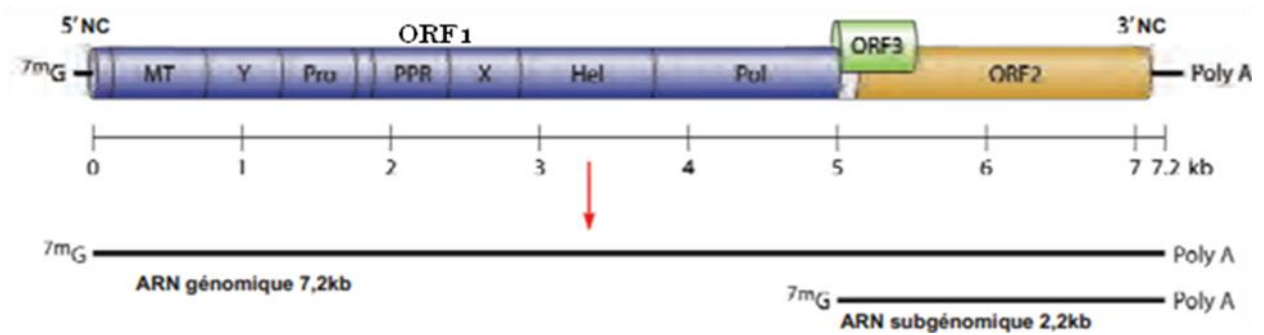


Figure 3 : Organisation du génome du VHE (Purcell *et al.*, 2008).

7mG : coiffe ; MT : méthyltransférase ; Y : domaine Y ; Pro : cystéine protéase ; PPR : région riche en proline ; X : domaine X ou macro domaine; Hel : hélicase ; Pol : ARN polymérase dépendante de l'ARN ; polyA : queue polyadénylée ; NC : région non codante.

I.1.3. Les protéines virales et leurs fonctions

Les trois ORF du génome du VHE codent pour trois protéines : pORF1, pORF2 et pORF3.

I.1.3.1. Protéine pORF1

C'est une polyprotéine non structurale de 1693 acides aminés comportant plusieurs domaines (Koonin *et al.*, 1992). Les activités enzymatiques correspondant à ces domaines (à partir de l'extrémité N-terminale) sont : méthyltransférase, cystéine protéase similaire à la papaïne, hélicase, ARN polymérase dépendante de l'ARN. D'autres domaines ont été identifiés par analogie à ceux retrouvés chez les virus à ARN⁺ de plantes ou d'animaux : le domaine Y, le domaine X désormais appelé macro domaine et une région riche en proline (PPR). La méthyltransférase catalyse le coiffage en 5' de l'ARN génomique et subgénomique par une 7-méthylguanosine (Koonin *et al.*, 1992). La cystéine protéase similaire à la papaïne est généralement impliquée dans le clivage de la polyprotéine virale (Gorbalenya *et al.*, 1991). Cette protéine est capable d'interférer avec les défenses antivirales de la cellule infectée (Karpe *et al.*, 2011). L'hélicase est une protéine essentielle pour la réplication virale en participant à la séparation des ARN doubles brins et en déroulant les structures secondaires (Kadare *et al.*, 1997). L'hélicase semble également posséder une activité 5' triphosphatase. L'ARN polymérase dépendante de l'ARN (RdRp) est une enzyme

indispensable à la réplication du génome des virus à ARN (Fry *et al.*, 1992). Aucune fonction n'est actuellement prêtée au domaine Y. Le domaine X intervient dans le métabolisme de l'ADP-ribose en hydrolysant l'ADP-ribose-1'-phosphate (Aguiar *et al.*, 2005). Il pourrait donc jouer un rôle dans la réplication virale et/ou la transcription (Egloff *et al.*, 2006). Il s'associe également à la poly (ADP-ribose) polymérase-1 (PARP-1) (Snijder *et al.*, 2003), suggérant un rôle dans l'apoptose cellulaire. La région riche en proline (PPR), également appelée région hypervariable, pourrait jouer un rôle dans la réplication virale, notamment au niveau de l'adaptation du virus (Pudupakam *et al.*, 2011).

I.1.3.2. Protéine pORF2

La protéine codée par le gène ORF2, la protéine de capsid virale de 660 acides aminés est située à l'extrémité 3' du génome. Elle joue un rôle dans la fixation et l'entrée du virus dans la cellule hôte puis dans l'encapsidation du génome viral et l'assemblage de la particule virale (Surjit *et al.*, 2004). L'extrémité N-terminale de la protéine de capsid possède un motif d'adressage au réticulum endoplasmique où la protéine subit des N-glycosylations sur les résidus asparagines en positions 137, 310 et 562 (Zafrullah *et al.*, 1999). La structure cristallographique de la protéine de capsid peut être regroupée en trois domaines : le domaine S (Shell) constitue la coque du virus, le domaine M (Middle) est le domaine intermédiaire, enfin le domaine P (Protruding) est la partie saillante. Expérimentalement, il a été démontré que les protéines obtenues à partir de p-ORF2 tronquée à son extrémité N terminale ont la capacité de former des particules pseudo-virales (VLPs) qui induisent de forts titres d'anticorps neutralisants et ont servi de source antigénique pour un candidat vaccin (Zhu *et al.*, 2010).

I.1.3.3. Protéine pORF3

Le gène ORF3 code une petite phosphoprotéine immunogène de 113 à 123 acides aminés, très variable selon les virus et dont la fonction exacte doit être déterminée. Ce gène chevauche l'ORF1 d'un seul nucléotide et partage la majorité du reste de la séquence avec l'ORF2. Dans des cellules de mammifères, cette protéine est localisée au niveau endosomal et au niveau des microtubules. Son implication dans les fonctions régulatrice de la réplication virale, l'assemblage de la nucléocapsid ou la sortie des particules virales de la cellule hôte a

été suggérée (Emerson *et al.*, 2010). Elle serait impliquée dans le bourgeonnement des virions à la surface des cellules infectées en s'associant aux lipides et favorisant la survie et la prolifération cellulaire (Emerson *et al.*, 2010 ; Moin *et al.*, 2007).

I.1.4. Taxonomie du virus de l'hépatite E

La classification du virus de l'hépatite E depuis sa découverte a suscité de nombreuses controverses, discussions et modifications. Lorsque l'hépatite E a été décrite pour la première fois lors d'une épidémie transmise par voie entérique à New Delhi en 1955, suite à une contamination fécale de l'eau potable, l'agent causal encore appelé « agent responsable d'hépatites non-A, non-B, non-C » était présumé être de la famille des *Picornaviridae* tout comme le Virus de l'Hépatite A (VHA) (Balayan *et al.*, 1983 ; Viswanathan, 2013). Des études subséquentes sur des particules de virus ont révélé qu'il ressemblait plus à un *Calicivirus*, mais une fois que la séquence complète du génome a été obtenue (Tam *et al.*, 1991 ; Tsega *et al.*, 1992), le virus a été réassigné au genre Hepatitis E-like viruses, rebaptisé *Hepevirus* en 2004 (Fauquet *et al.*, 2005), et placé en 2009 dans la famille des *Hepeviridae*. Une autre classification du VHE a été proposée en 2014 et classe le VHE dans la famille des *Hepeviridae* qui comprend deux genres: *Orthohepevirus* et *Piscihepevirus* (Smith *et al.*, 2014). Le genre *Orthohepevirus* est divisé en quatre espèces (*Orthohepevirus A-D*) (Mirazo *et al.*, 2018 ; Spahr *et al.*, 2017).

I.1.5. Diversités génétiques et réservoirs du virus de l'hépatite E

Les souches de VHE infectant les humains et les animaux réservoirs appartiennent à l'espèce *Orthohepevirus A* et sont classées en 8 génotypes (génotype 1-8) (Mirazo *et al.*, 2018). Ces 8 génotypes se différencient par leur répartition géographique et leur spectre d'hôtes. Les génotypes 1 et 2 sont détectés chez les humains lors d'épidémies ou de cas sporadiques dans des régions où le VHE est connu pour être endémique (Aggarwal, 2011). Le génotype 1, dont la souche prototype est la souche Burma isolée au Myanmar se retrouve en Asie, Afrique et Mexique. Le génotype 2 dont sa souche prototype est la souche Mexico, est retrouvé au Mexique mais aussi dans quelques pays d'Afrique (Nigeria, Namibie, République

Centrafricaine, Tchad) (Aggarwal, 2011). Ces deux génotypes sont considérés comme strictement humains. Le génotype 3 est caractérisé chez les humains, les porcs domestiques, les sangliers, la mangouste, le lapin et le cerf. Le génotype 3 est largement distribué en Europe, en Afrique, en Amérique du Nord et du Sud et en Asie du Nord-Est et du Sud-Est (Smith *et al.*, 2018). Le génotype 4 est présent chez les humains, les porcs et les sangliers (Song *et al.*, 2014). Il a été isolé sporadiquement en Asie et en Europe (Aggarwal, 2011). Les porcs d'élevage et les sangliers constituent les principaux réservoirs animaux des génotypes 3 et 4 dans le monde (Johns *et al.*, 2014 ; Meng, 2010). La grande identité génétique des souches isolées chez l'homme et l'animal a fait suspecter une transmission zoonotique. Les génotypes 5 et 6 sont isolés chez les sangliers (Takahashi *et al.*, 2014). Le génotype 5 a été identifié au Japon, en Allemagne, Italie, Espagne, Australie et Hongrie tandis que le génotype 6 est rapporté au Japon. Le génotype 7 est obtenu à partir des dromadaires au Moyen-Orient bien qu'une étude ait signalé sa présence chez les humains (Lee *et al.*, 2016 ; Woo *et al.*, 2014). Le génotype 8 a été récemment signalé chez des chameaux de Bactriane en Chine (Woo *et al.*, 2016). De nombreux sous-types ont été décrits au sein des quatre génotypes majeurs (génotype 1-4) qui sont pathogènes à l'homme (Lu *et al.*, 2006): 5 pour le génotype 1 (1a-1e), 2 pour le génotype 2 (2a et 2b), 10 pour le génotype 3 (3a-3j) et 7 pour le génotype 4 (4a-4g) (Lu *et al.*, 2006).

Orthohepevirus B contient 4 génotypes (VHE aviaire I-IV) détectés chez les oiseaux domestiques aux USA, en Hongrie, en Chine, en Corée et en Australie (Spahr *et al.*, 2017). *Orthohepevirus C* comprend deux génotypes détectés principalement chez les rats (VHE-C1) et certains carnivores à l'instar du Furet, vison et renard (VHE-C2) au Pays-Bas (Spahr *et al.*, 2017). *Orthohepevirus D* contient des souches qui ont été détectées chez plusieurs espèces de chauves-souris dans plusieurs pays du monde (Spahr *et al.*, 2017). Le genre *Piscihepevirus* contient seulement une seule espèce (*Piscihepevirus A*), qui a été identifiée chez la truite fardée et les espèces apparentées aux USA (Figure 5) (Spahr *et al.*, 2017).

En outre, les anticorps anti-VHE ont été détectés chez d'autres espèces animales à savoir les rongeurs sauvages, le chat, le chien, la vache, le mouton, la chèvre, les oiseaux, le cheval et les primates non-humains (Arankalle *et al.*, 2001 ; Caballero-Gomez *et al.*, 2019 ; Li *et al.*, 2006 ; Mochizuki *et al.*, 2006 ; Peralta *et al.*, 2009 ; Zhang *et al.*, 2008). Ces animaux sont susceptibles d'abriter de nouvelles espèces de VHE et par conséquent d'élargir la gamme d'hôtes naturels du VHE (Meng, 2013).

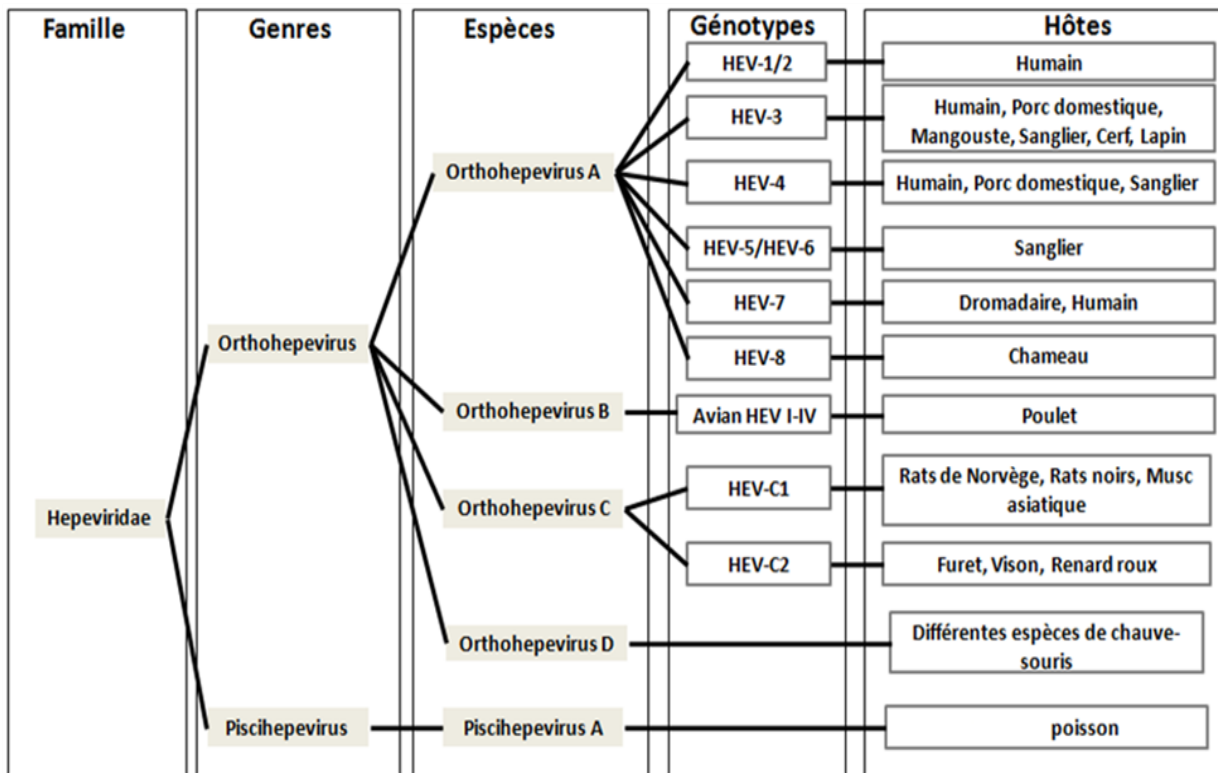


Figure 4 : Classification taxonomique du VHE (Smith *et al.*, 2014).



Figure 5 : Photos de quelques réservoirs animaux du VHE (Marulier, 2009).

I.1.6. Multiplication du virus de l'hépatite E

En raison de l'absence de systèmes de cultures cellulaires efficaces et de modèles *in vivo* sur petits animaux, les connaissances actuelles sur la réplication du VHE sont déduites par analogies avec les autres virus à ARN de polarité positive (Ahmad *et al.*, 2011). Les principales cellules cibles de la réplication du virus sont les hépatocytes. Cependant, des preuves de réplication extra-hépatique du VHE ont été rapportées chez des singes rhésus. Dans le modèle porcin infecté par le VHE, les sites extra-hépatiques incluent l'intestin grêle, la rate, les ganglions lymphatiques, le côlon et les monocytes du sang périphérique (Chandra *et al.*, 2008 ; Williams *et al.*, 2001).

Les principales étapes de réplication virale sont présentées sur la figure 4. L'attachement du virus aux cellules permissives se fait par un récepteur non caractérisé à la surface des hépatocytes. D'après les études récentes, certaines lignées cellulaires du foie (PLC/PRF/5; HepaRG, etc.), du poumon (A549) et d'embryon (PCMB19) se sont avérées permissives à l'infection par le VHE avec peu d'informations spécifiques au cycle cellulaire (Okamoto, 2013 ; Rogee *et al.*, 2013 ; Tanaka *et al.*, 2007). Jusqu'à nos jours, aucun récepteur cellulaire n'a encore été identifié. Toutefois, les héparane-sulfate protéoglycanes (HSPGs) semblent servir de récepteurs pour la fixation de la capsid virale (Kalia *et al.*, 2009). Une étude récente suggère que l'entrée du VHE serait clathrine-dépendante (Kapur *et al.*, 2012). Le trafic cellulaire suivant l'entrée du virus est peu connu. La protéine de choc thermique HSP90 (Heat-Shock Protein 90) et la tubuline pourraient être impliquées dans l'entrée du virus dans la cellule (Zheng *et al.*, 2010). La localisation ainsi que les mécanismes aboutissant à la décapsidation de l'ARN dans le cytoplasme sont inconnus.

Une fois l'ARN viral libéré dans le cytosol de la cellule, l'ARN génomique est traduit en polyprotéine non structurale codée par le gène ORF1. Cette protéine est ensuite clivée en unités fonctionnelles ayant des activités méthyltransférase (MeT), protéase (PR) ou *papain-like* cystéine protéase, hélicase (Hel) et ARN polymérase ARN dépendante (RdRp). La réplicase peut ensuite utiliser l'ARN positif pour synthétiser l'ARN négatif, l'intermédiaire répliatif. Le brin d'ARN négatif, par analogie aux *Alphavirus*, sert vraisemblablement de matrice pour la synthèse d'ARN génomique et subgénomique. Ainsi, l'intermédiaire d'ARN négatif servirait de modèle pour la synthèse de copies supplémentaires d'ARN génomique positif, autant que de l'ARN subgénomique positif. En fait, cette séquence-jonction joue le

rôle d'un promoteur interne pour la synthèse de l'ARN subgénomique et pour la transcription de la région structurale de l'ARN. *In vitro*, un système de réplication a montré que l'ARN subgénomique est traduit en protéines structurales à partir du gène ORF2 et du gène ORF3 (Graff *et al.*, 2006). Celles-ci s'assemblent pour former la capside et englober les ARN génomiques positifs pour former les virions. Cependant, la manière dont les virions atteignent le sang ou la bile est encore inconnu (Panda *et al.*, 2007).

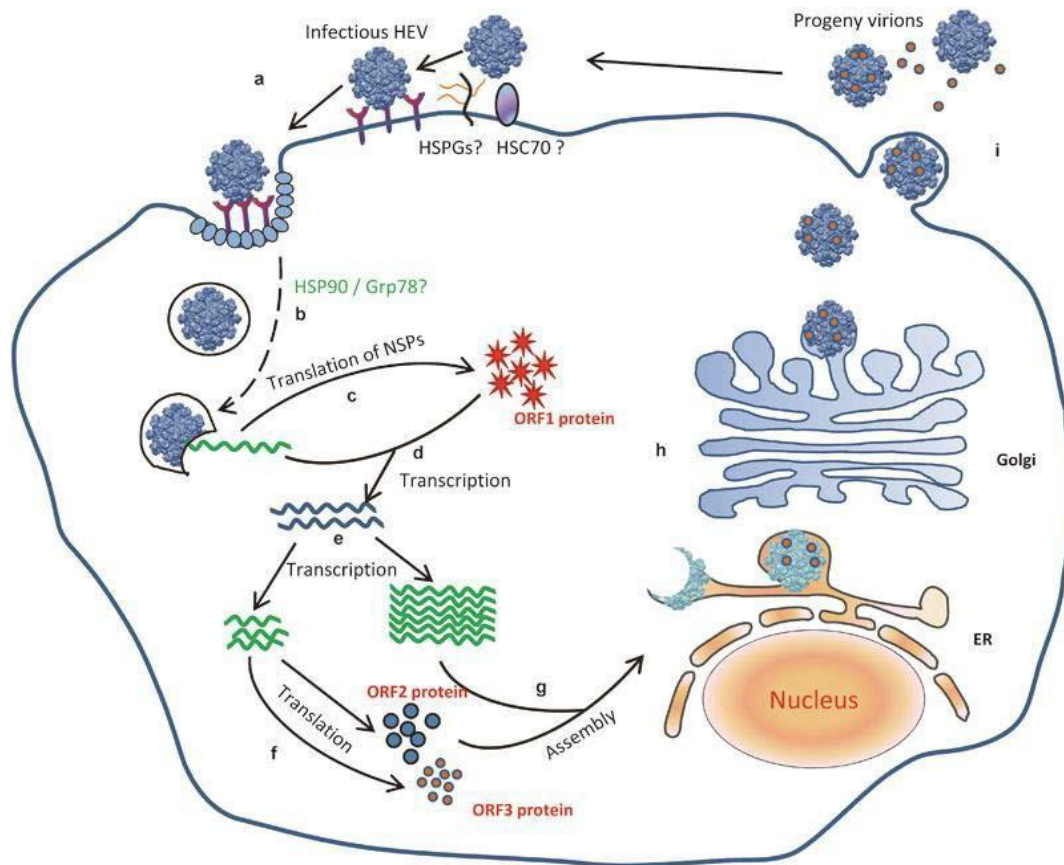


Figure 6 : Schéma du cycle de réplication du VHE (Ahmad *et al.*, 2011).

I.1.7. Propriétés physico-chimiques du virus de l'hépatite E

Le VHE est relativement résistant dans le milieu extérieur comme tous les virus entériques non enveloppés. De par sa transmission oro-fécale, il peut résister à l'acidité gastrique et aux sels biliaires pour survivre dans le milieu intestinal et est détecté dans les eaux usées. Ce pendant, il est sensible à la chaleur (autoclavage à 120°C), aux désinfectants habituellement utilisés dans l'inactivation des virus entériques (hypochlorite de sodium pour

le traitement de l'eau, glutaraldéhyde pour la désinfection des surfaces) malgré une baisse significative de leurs efficacités en présence de matières organiques. La température de conservation du virus recommandée est de -80°C sachant qu'il a pu être détecté sur des échantillons conservés à -20°C après plus de 10 ans (Panda *et al.*, 2007).

I.1.8. Physiopathologie de l'infection par le virus de l'hépatite E

I.1.8.1. Réponse immune au stade aigu de l'hépatite E

I.1.8.1.1. Réponse immunitaire innée

Lors d'une hépatite E aiguë, il a été démontré que le nombre de cellules NK présentes dans le sang périphérique était diminué par rapport au nombre observé chez des témoins sains. La plupart des NK exprimaient les CD69+ qui sont les marqueurs d'activation. Le recrutement des NK au niveau hépatique pourrait expliquer leur nombre plus faible en périphérie (Srivastava *et al.*, 2008). L'interleukine (IL)-1 et la chaîne du récepteur à l'IL-2 (IL-2R) présentent des concentrations sériques plus élevées lors de la phase inflammatoire chez les patients ayant une hépatite E aiguë, suggérant leur implication dans la pathogénèse (Tripathy *et al.*, 2012). Chez les patients greffés rénaux infectés par le VHE, il a été suggéré qu'une expression plus importante des gènes stimulés par les interférons de type I pourrait favoriser la persistance du VHE en induisant un état réfractaire à la voie de signalisation médiée par les interférons de type I (Moal *et al.*, 2013). *In vitro*, il a été prouvé que le VHE est plus sensible à la réponse induite par l'IFN- α et que la réponse adaptative joue un rôle moins important pour l'élimination du virus. La plus faible expression des gènes normalement exprimés lors de la réponse adaptative vient appuyer cette hypothèse. Cependant, le VHE a su développer des mécanismes pour supprimer les voies de signalisation de l'IFN- α (Dong *et al.*, 2012).

I.1.8.1.2. Réponse immunitaire adaptative

I.1.8.1.2.1. Réponse humorale

La réponse humorale anti-VHE est détectable dès l'apparition des symptômes. Les IgM apparaissent précocement au début de la maladie (Favorov *et al.*, 1992). Les IgG sont

détectées peu de temps après les IgM. Leur titre augmente lors de la phase aiguë et de la convalescence. Les anticorps sécrétés sont dirigés contre les protéines codées par ORF1, la protéine de capsid codée par ORF2 et la protéine codée par ORF3 (Kaur *et al.*, 1992 ; Li *et al.*, 2005 ; Osterman *et al.*, 2012 ; Schofield *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2005). Plusieurs études montrent que la protéine de capsid contient des épitopes neutralisants (Schofield *et al.*, 2000 ; Zhou *et al.*, 2005).

I.1.8.1.2.2. Réponse cellulaire

La réponse cellulaire anti-VHE est probablement impliquée dans le contrôle de l'infection par le VHE comme c'est le cas lors des infections par le virus de l'hépatite B et l'hépatite C (Guidotti *et al.*, 2006). Le profil d'expression des gènes des cellules T de patients ayant une hépatite E aiguë a montré une augmentation d'expression des intégrines et des récepteurs d'adressage à la surface des CD8+. Ces cellules étaient également plus activées que celles issues de patients sains ou de patients rétablis. Ces éléments suggèrent que les cellules T détectables dans le sang périphérique sont adressées au site primaire de l'infection pour assurer leurs fonctions effectrices (TrehanPati *et al.*, 2011). Le recrutement hépatique des lymphocytes T CD8+ lors d'une hépatite E aiguë a été montré par l'étude de biopsies de foie de patients infectés (Prabhu *et al.*, 2011). Ainsi, la réponse immune à médiation cellulaire apparaît primordiale pour l'éradication du virus. Chez les patients immunodéprimés, l'altération de cette réponse T conduit à la persistance du VHE. Le blocage des récepteurs inhibiteurs PD-1 et/ou CTLA-4 permet de rétablir une réponse T efficace (Suneetha *et al.*, 2012). Enfin, le virus de l'hépatite E n'étant pas cytolitique, l'atteinte hépatique pourrait être liée à la réponse immunitaire comme cela a été montré pour d'autres virus des hépatites (Bertoletti *et al.*, 1991 ; Tanaka *et al.*, 2007).

Lors d'une hépatite E aiguë, la proportion de cellules CD4+ augmente en périphérie. Il pourrait donc s'agir de cellules NK ou de lymphocytes T régulateurs (T reg) (Srivastava *et al.*, 2007). *In vitro*, la stimulation des PBMC par des peptides dérivant d'ORF2 est capable d'induire la sécrétion d'IFN-, suggérant que la population CD4+ pourrait effectivement correspondre aux NK. Cependant, cette étude n'exclut pas l'expansion de la population T reg étant donné que la sécrétion d'IL-10 n'a pas été étudiée (Srivastava *et al.*, 2007). L'expansion

de la population T régulatrice CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ dans le sang périphérique a récemment été montrée lors d'une hépatite E aiguë (Bertoletti *et al.*, 1991).

I.1.8.2. Réponse immunitaire au stade fulminant de l'hépatite E

Dans le cas d'une hépatite E fulminante, les taux sériques d'anticorps anti-VHE sont plus élevés que ceux observés lors d'une hépatite E non compliquée (Saravanabalaji *et al.*, 2009). Une plus grande fréquence de cellules T CD4⁺ a été retrouvée dans le foie de patients présentant une hépatite fulminante. La présence de cellules T CD8⁺ a également été retrouvée (Aggarwal, 2011 ; Prabhu *et al.*, 2011). La stimulation des PBMC par des peptides dérivant d'ORF2 et ORF3 conduit à une plus forte prolifération de la population lymphocytaire B chez les patients présentant une hépatite fulminante comparativement aux patients ayant une hépatite E aiguë non compliquée. Une faible sécrétion d'IFN- γ et de TNF- α chez ces patients est également retrouvée (Srivastava *et al.*, 2011). Lors du suivi d'une hépatite fulminante, une plus forte sécrétion d'IFN- γ et d'IL-12 par les PBMC stimulés est associée à la survie à l'hépatite fulminante (Saravanabalaji *et al.*, 2009). Ainsi, une réponse de type Th2 associée à des taux faibles d'IFN- γ semblent favoriser l'apparition d'une hépatite fulminante et le décès du patient.

A côté des facteurs immunologiques, des facteurs virologiques et des facteurs liés à l'hôte pourraient également intervenir. La grossesse, l'âge, un contexte d'immunodépression et le génotype sont mis communément en avant (Okamoto, 2007 ; Pavio *et al.*, 2010). Lors d'une hépatite E chez la femme enceinte, il a été montré que des mutations dans les gènes des récepteurs à la progestérone, une expression réduite de ces récepteurs ainsi que du facteur bloquant induit par la progestérone et un rapport IL-12/IL-10 plus élevé étaient associés à une issue plus péjorative de la grossesse (Bose *et al.*, 2011). Des charges virales plus élevées sont retrouvées chez les femmes enceintes présentant une hépatite fulminante comparativement aux femmes enceintes présentant une hépatite E non compliquée. Les virus isolés appartenant tous au génotype 1, l'influence du génotype n'a pas pu être étudiée (Bose *et al.*, 2011 ; Kar *et al.*, 2008). Cependant, il semblerait que le génotype 1 soit plus pathogène pour l'homme comparativement aux génotypes 3 et 4 (Emerson *et al.*, 2003 ; Mizuo *et al.*, 2005). Enfin, certaines mutations répertoriées au niveau de l'hélicase pourraient influencer l'évolution vers une forme fulminante (Mishra *et al.*, 2013).

I.1.9. Manifestations cliniques de l'infection par le virus de l'hépatite E

I.1.9.1. Hépatite aiguë

Le VHE est souvent responsable d'infections asymptomatiques, mais les formes ictériques ou fulminantes sont possibles (Aggarwal *et al.*, 2011). Durant les épidémies, la mortalité varie de 0,5 à 4,0% (Khuroo, 1980). La présentation clinique est similaire entre les pays en développement et les pays industrialisés (Aggarwal *et al.*, 2011). La durée d'incubation varie de 2 à 9 semaines avec une moyenne de 40 jours. La phase pré-ictérique dure de 1 à 27 jours et est marquée par une symptomatologie principalement digestive (douleurs abdominales, nausées, vomissements). Le début de la phase ictérique brutale, est marqué par l'apparition d'un ictère, des urines foncées et des selles décolorées. Cette phase dure de 10 à 24 jours (Viswanathan, 2013). L'évolution est ensuite spontanément favorable.

Dans les pays à ressources limitées, les cas d'hépatite E aiguë concernent plutôt l'adolescent et l'adulte jeune, avec une prédominance masculine. Plusieurs études ont décrit une fréquence et une gravité supérieures de l'infection par le VHE chez la femme enceinte. La létalité atteint 30% lorsque l'infection survient au cours du 3ème trimestre. L'infection par le VHE lors de la grossesse est associée à des avortements spontanés plus fréquents, une plus grande mortalité intra-utérine, une prématurité des enfants, un petit poids de naissance et une plus grande mortalité périnatale (Kumar *et al.*, 2004). La surinfection par le VHE sur une hépatopathie existante peut entraîner une décompensation sévère se manifestant par une ascite et une encéphalopathie hépatique plus ou moins prononcée (Aggarwal *et al.*, 2011). La surinfection conduit à une plus forte morbidité et mortalité (Hamid *et al.*, 2002).

Dans les pays industrialisés, le VHE touche préférentiellement les hommes de plus 55 ans (Mansuy *et al.*, 2009). Les formes sévères n'ont pas été décrites chez la femme enceinte comme c'est le cas dans les pays à ressources limitées. La surinfection par le VHE sur une hépatopathie existante peut conduire à une décompensation sévère avec un risque plus élevé de morbidité et de mortalité (Dalton *et al.*, 2007 ; Peron *et al.*, 2007).

I.1.9.2. Hépatite chronique

Le passage à la chronicité est défini par la persistance du génome viral dans les prélèvements sanguins pendant plus de six mois (Kamar *et al.*, 2013). Des cas d'hépatite E

chronique ont été décrits chez les patients immunodéprimés, notamment les patients transplantés d'organes solides, les patients infectés par le VIH ou les patients d'hématologie recevant une chimiothérapie (Dalton *et al.*, 2009 ; Kamar *et al.*, 2008 ; Kenfak-Foguena *et al.*, 2011 ; Tavitian *et al.*, 2010). Chez les patients transplantés d'organes, environ 60% des patients infectés par le VHE développent une hépatite E chronique (Kamar *et al.*, 2011). L'utilisation du tacrolimus par rapport à la ciclosporine A et une numération plaquettaire plus faible semblent être les deux principaux facteurs de risques associés à l'évolution vers une hépatite chronique (Kamar *et al.*, 2011). Par contre, l'utilisation d'un immunosuppresseur (mycophénolate mofétil) favoriserait l'élimination spontanée du virus chez les transplantés cardiaques (Pischke *et al.*, 2012).

La persistance du VHE peut conduire à une progression plus rapide de la fibrose hépatique par rapport au VHC dans la même population (Gerolami *et al.*, 2008 ; Kamar *et al.*, 2008). La transmission du virus suite à une greffe hépatique a récemment été rapportée. Elle a conduit à une hépatite chronique chez le receveur, une fibrose hépatique et à la mort du patient (Schlosser *et al.*, 2011).

Des manifestations extra-hépatiques ont été décrites au cours d'une infection aiguë par le VHE. Nous pouvons noter : les thrombopénies, les anémies hémolytiques, les polyarthrites, les pancréatites et les glomérulonéphrites (Abid *et al.*, 2002 ; Bhagat *et al.*, 2008 ; Kamar *et al.*, 2012 ; Serratrice *et al.*, 2007 ; Thapa *et al.*, 2009). Des manifestations neurologiques ont également été décrites, comme un syndrome de Guillain-Barré et une méningo-encéphalite (Liu *et al.*, 2020 ; Loly *et al.*, 2009). Un syndrome pyramidal bilatéral associé à des neuropathies périphériques a été décrit chez un patient greffé rénal atteint d'une hépatite E chronique (Kamar *et al.*, 2010).

I.2. Epidémiologie de l'infection par le virus de l'hépatite E dans le monde

I.2.1. Prévalence du virus de l'hépatite E dans le monde

La littérature recèle de nombreuses études de séroprévalence et de caractérisation moléculaire menées à la fois chez l'homme et chez l'animal dont la synthèse permet de dresser une cartographie de la prévalence du VHE.

I.2.1.1. Prévalence du VHE dans la population humaine à travers le monde

Deux profils épidémiologiques bien distincts de l'infection par le virus de l'hépatite E ont été observés dans le monde selon le niveau d'endémicité du virus associés chacun à leurs principaux modes de transmission, les groupes de population touchés et les génotypes de VHE qui circulent (Figure 7).

Dans les pays industrialisés, le VHE a longtemps été considérée comme étant la maladie des pays à ressources limitées. Jusqu'à il y a quelques années, la plupart de ces cas dans les pays industrialisés étaient liés à des déplacements vers des zones hyper-endémiques. Cependant, au cours des dernières années, des cas autochtones ont été enregistrés aux États-Unis, au Royaume-Uni, en France, aux Pays-Bas, en Autriche, en Espagne, en Grèce et en Allemagne, au Japon, en Taïwan, en Corée, à Hong Kong, en Australie et Nouvelle-Zélande (Dalton *et al.*, 2011 ; Davern *et al.*, 2011). Dans ces régions, la transmission zoonotique semble jouer un rôle majeur dans la transmission du VHE. Les génotypes 3 et 4 sont retrouvés aussi bien chez l'homme que l'animal et sont principalement responsables de ces cas sporadiques (Dalton *et al.*, 2008). La transmission zoonotique a été suspectée pour la première fois lorsque des séquences génomiques d'isolats du VHE provenant de deux cas autochtones aux États-Unis se sont révélées être plus étroitement liées au VHE porcine qu'aux isolats du VHE humains. La preuve la plus directe de la transmission zoonotique a cependant été fournie au Japon chez des personnes qui avaient consommé de la viande de cerf insuffisamment cuite quelques semaines avant le début de la maladie. Les séquences génomiques du VHE isolées de ces patients étaient identiques à celles de la viande congelée restante, preuve irréfutable d'une transmission d'origine alimentaire (Inoue *et al.*, 2006 ; Tei *et al.*, 2003). Le génotype 3 présente une répartition plus large dans ces pays industrialisés tandis que le génotype 4 n'est retrouvé qu'en Asie, notamment en Chine, à Taiwan, au Japon et au Viêtnam (Dalton *et al.*, 2008 ; Lu *et al.*, 2006).

Les données de séroprévalence dans la population générale dans les pays industrialisés, montrent une grande variabilité avec un taux qui oscille entre 0,4 et 6% de la population mais qui peut atteindre des valeurs bien plus importantes, jusqu'à plus de 50% (Capai *et al.*, 2019). Les marqueurs de l'infection par le VHE se retrouvent à une fréquence croissante chez l'homme dans les pays industrialisés au cours de la dernière décennie (Capai

et al., 2019). Les taux de séroprévalence selon l'âge montrent une augmentation régulière chez l'adulte et la personne plus âgée (Teo, 2010).

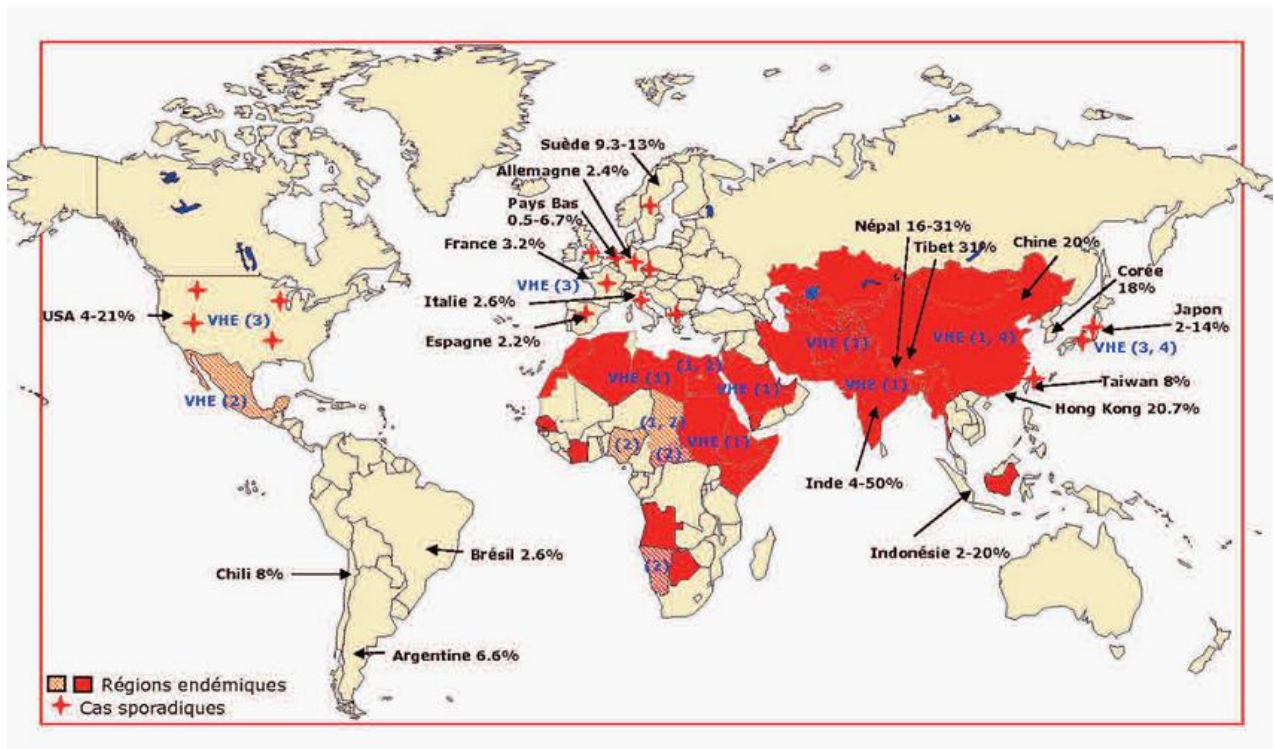


Figure 7 : Répartition géographique du VHE (D'après les données du CDC et Pavio *et al.*, 2006).

Les régions d'endémie sont indiquées en rouge pour le génotype 1 et en rayures rouges pour le génotype 2. Les pays où des cas sporadiques ont été décrits sont marqués d'une étoile rouge. Les valeurs de séroprévalence connues chez l'homme sont indiquées par pays. Les génotypes présents chez l'homme sont indiqués en bleu.

L'hépatite virale E évolue de façon endémique dans de nombreux pays à ressources limitées, notamment en Asie (Pakistan, Bangladesh, Birmanie, Thaïlande, Indonésie, Chine, Népal), en Afrique (Maroc, Algérie, Tunisie, Lybie, Egypte, Soudan, Soudan du Sud, Erythrée, Ethiopie, Djibouti, Somalie et Kenya) et en Amérique Latine (Mexique) (Buisson *et al.*, 1994 ; Nicand *et al.*, 2009 ; Ruggeri *et al.*, 2013). Dans ces pays à faible niveau d'hygiène, se produisent de grandes épidémies d'origine hydrique et des cas sporadiques qui sont associés principalement aux génotypes 1 et 2 (Kim *et al.*, 2014 ; Lu *et al.*, 2006 ; Ruggeri *et al.*, 2013). Le VHE génotype 3 a été détecté dans les eaux de rivière au Cambodge et en Tunisie suggérant une possible transmission hydrique du génotype 3 dans les pays endémiques (Beji-Hamza *et al.*, 2015 ; Kitajima *et al.*, 2009). Le nombre de personnes vivant dans les zones de forte endémicité au VHE est estimé à environ 2 milliards de personnes.

Dans ces régions, le taux de séroprévalence moyen au sein de la population générale est de 25% (Grandadam *et al.*, 2004 ; Viswanathan, 2013) mais d'importantes variations sont visibles dans les études. Une étude réalisée en Inde en 1994 donne un taux de prévalence de 5% dans la population (Khuroo *et al.*, 1994). Celle menée dans les provinces rurales du sud de la Chine a révélé une prévalence moyenne de 43% dans la population globale (Li *et al.*, 2006).

En Afrique, les données sur la séroprévalence du VHE ont été rapportées par 35 études provenant de 13 pays africains et varient selon les pays de 0% parmi les villageois au Gabon à 84,3% chez les femmes enceintes égyptiennes (Kim *et al.*, 2014). Les épidémies de VHE ont été rapportées dans 17 études provenant de 11 pays avec un taux d'attaque de 25,1% de la population observé en Ouganda et 2,7% observé lors d'une épidémie en République Centrafricaine (Kim *et al.*, 2014). Le taux de létalité dans la population générale variait de 1,5% en Ouganda à 17,8% au Soudan. Chez les femmes enceintes, les décès sont considérablement plus élevés, allant de 42,1% parmi les cas sporadiques échantillonnés en 1988-1991 en Éthiopie à 12,5% lors d'une épidémie dans un camp de réfugiés au Kenya en 2012 (Kim *et al.*, 2014). Le génotype 1 semble être le plus répandu en Afrique car il a été trouvé en République Centrafricaine, au Soudan, au Tchad, en Égypte et en Namibie, suivi du génotype 2, qui a été observé en République Centrafricaine, au Tchad, en Namibie et au Nigéria. Le génotype 3 est rare car il a été trouvé seulement chez un enfant en Égypte (Kim *et al.*, 2014). D'une manière générale, l'exposition au VHE est considérée comme forte dans les pays en Afrique (Figure 8).

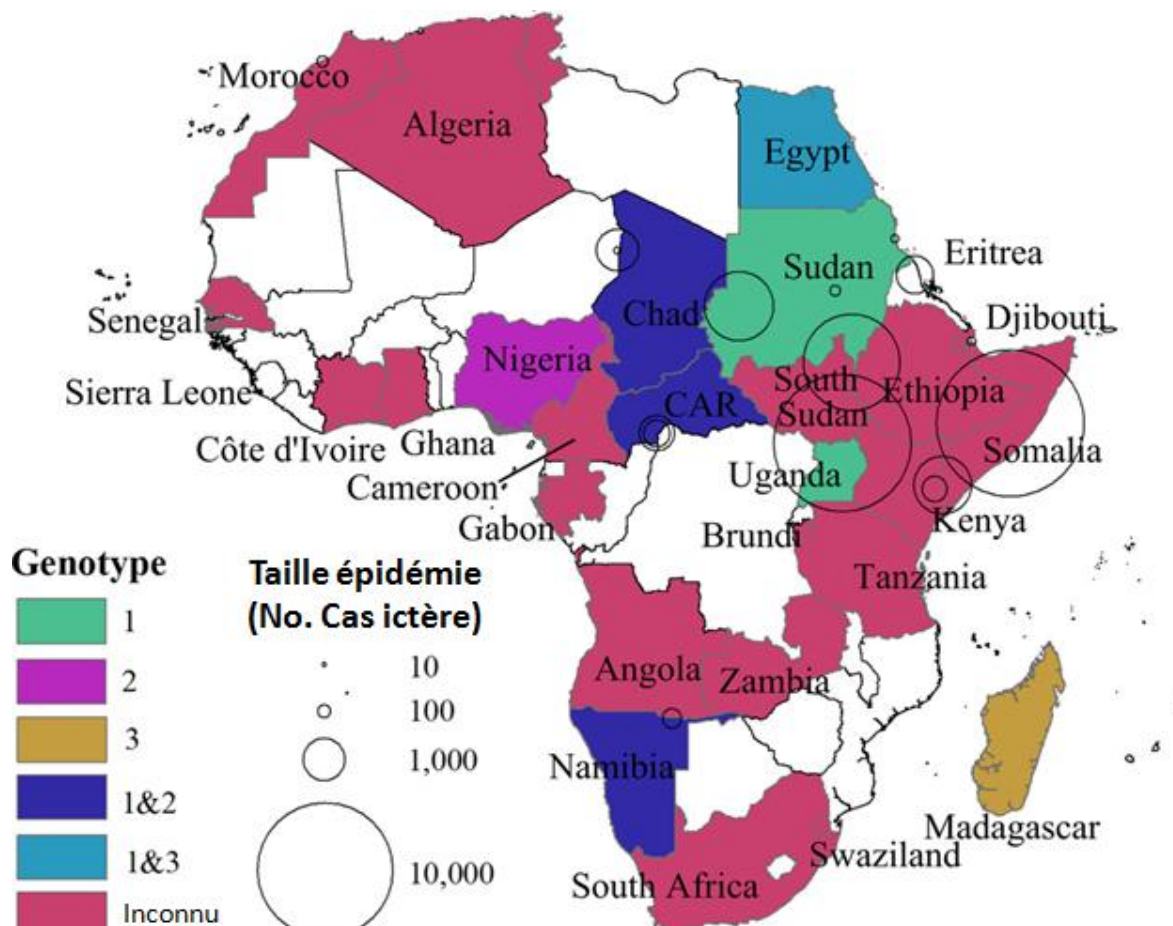


Figure 8 : Carte de l'Afrique montrant la situation du VHE (Kim *et al.*, 2014).

Les zones colorées représentent les pays où le VHE est endémique au moins pour certaines sous-populations ou des cas sporadiques de VHE ou des foyers ont été détectés. Les cercles indiquent les épidémies de VHE, leur emplacement et leur taille. Les couleurs différentes représentent différents génotypes. Les zones blanches indiquent les pays où aucune donnée n'est disponible.

I.2.1.2. Prévalence du VHE dans la population animale à travers le monde

La situation chez l'animal et principalement chez les porcs domestiques est beaucoup plus homogène. Quel que soit le pays ou le continent considéré, la séroprévalence du VHE en élevage porcin est élevée et largement répandue bien qu'il existe quelques variations.

Dans les autres pays industrialisés, plusieurs études sur le VHE ont été menées chez les porcs, principaux réservoirs du VHE. Les estimations de prévalence dérivées d'analyses virologiques ou sérologiques ont mis en évidence de grandes différences selon les pays (Salines *et al.*, 2017). Le taux de séroprévalence des anticorps anti-VHE dans la population porcine est, par exemple, supérieure à 50% en Espagne et en Nouvelle Zélande (Garkavenko

et al., 2001 ; Seminati *et al.*, 2008). En France, 31% des porcs abattus en 2011 ont été trouvés séropositifs pour le VHE (Rose *et al.*, 2011). De même, l'équipe de Jinshan a détecté 52% des porcs échantillonnés positifs pour les anticorps anti-VHE en Mongolie (Jinshan *et al.*, 2010). En Amérique du Nord, une étude canadienne montre un taux de prévalence moyen des anticorps anti-VHE de 59,4% chez les porcs (Yoo *et al.*, 2001). Si l'on s'intéresse à la détection de l'ARN viral chez les animaux, 35% des porcs élevés aux Etats-Unis et 34% des porcs québécois se révèlent positifs (Huang *et al.*, 2002 ; Ward *et al.*, 2008). En Amérique Centrale et du Sud, la séroprévalence moyenne dans la population porcine est de 22,7% en Argentine et monte jusqu'à 81% au Mexique (Cooper *et al.*, 2005 ; Munne *et al.*, 2006).

Dans les pays en voie de développement, d'après les nombreuses études menées en Chine, la séropositivité au VHE atteint, selon les provinces, 68% et le taux d'animaux positifs pour la présence d'ARN viral dépasse 30% (Li *et al.*, 2008 ; Ning *et al.*, 2008). Dans les autres pays asiatiques, les résultats des études sont équivalents, comme c'est le cas en Mongolie ou encore à Taiwan (Hsieh *et al.*, 1999 ; Lorenzo *et al.*, 2007).

En Afrique, bien qu'étant loin d'être suffisantes, quelques études ont été menées chez les porcs. Au Burkina Faso, deux études avaient montré des séroprévalences élevées entre 71,2% et 80% dans la population porcine et une détection de l'ARN faible entre 1% et 1,2% dans les échantillons de foie de ces porcs (Temmam *et al.*, 2013 ; Traore *et al.*, 2015). L'ARN du VHE a été isolé dans 4,4% et 2,5% des échantillons des selles des porcs prélevés en Afrique du Sud et en République Démocratique du Congo, respectivement (Adelabu *et al.*, 2017 ; Kaba *et al.*, 2010).

Pour ce qui est des autres réservoirs, une étude a démontré la présence d'ARN viral chez les mangoustes de l'île d'Okinawa au Japon et informe aussi que 21% des mangoustes prélevées sont séropositives pour les IgG anti-VHE (Nakamura *et al.*, 2006). Toujours au Japon, le taux de séroprévalence des anticorps anti-VHE est relativement faible chez les cerfs sika, en moyenne 2% selon les articles (Matsuura *et al.*, 2007 ; Sonoda *et al.*, 2004). Quant aux sangliers, la présence de l'infection par le VHE a été très étudiée en Europe. En Allemagne, une étude a rapporté une séroprévalence de 11,5% et une prévalence en ARN de 3,85% dans la population de sangliers (Weigand *et al.*, 2018). Les études montrent un taux moyen beaucoup plus élevé, autour de 20% dans les populations italiennes et espagnoles de sangliers (de Deus *et al.*, 2008 ; Martinelli *et al.*, 2015). Quelques études africaines ont été

réalisées dans le but de détecter les anticorps anti-VHE ou l'ARN du VHE chez les espèces autres que les porcs. En Egypte, La séropositivité au virus de l'hépatite E a été enregistrée chez 21,6%, 14%, 4,4% et 9,4% des vaches, buffles, ovins et caprins testés, respectivement (El-Tras *et al.*, 2013). Toujours en Egypte, une étude avait montré une séoprévalence du VHE élevée de 63,3% dans la population des rats et des moutons avec une détection de l'ARN chez 11.6% des rats uniquement (Ghoneim *et al.*, 2016). Dans la zone sahélienne de l'Afrique de l'Ouest, une équipe de recherche avait détecté les anticorps anti-VHE chez 8,3% des dromadaires testés (Jean *et al.*, 2019). Les études menées au Nigéria avaient enregistré une séoprévalence de VHE qui varie entre 27,8% et 37,2% chez les chèvres et 10,5% chez les moutons (Alkali *et al.*, 2018 ; Junaid *et al.*, 2014).

I.2.1.3. Prévalence du VHE dans la population humaine au Cameroun

Au Cameroun, les études réalisées sur le VHE chez les humains portent sur la détection des anticorps anti-VHE uniquement et sont au nombre de deux. En 2013, une équipe des chercheurs du Centre Pasteur du Cameroun avait rapporté pour la première fois une épidémie de VHE chez les personnes suspectées de fièvre jaune dans la région du Nord-Cameroun (Demanou *et al.*, 2013). Dans cette étude, on pouvait noter une forte prévalence de 89,2% des anticorps IgM anti-VHE et de 2,7% des anticorps IgG anti-VHE. La même année, Feldt *et al.* (2014) avaient rapporté chez les patients vivant avec le VIH une prévalence en anticorps IgG anti-VHE de 14,2% chez les adultes et de 2% chez les enfants.

I.2.1.4. Prévalence du VHE dans la population animale au Cameroun

Une seule étude a été réalisée sur le VHE chez les porcs au Cameroun. Dans cette étude, l'ARN du VHE a été détecté dans 1,4% (2/139) échantillons de foie de porcs prélevés à Yaoundé et dans 2,6% (1/39) échantillons de foie prélevés à Bamenda. Les 167 échantillons de Douala étaient tous négatifs pour l'ARN du VHE (de Paula *et al.*, 2013).

I.2.2. Mode de contamination du virus de l'hépatite E

Les voies de transmission du VHE sont complexes et peuvent impliquer des transmissions de virus via l'eau contaminée par les matières fécales, les produits sanguins, la nourriture, l'environnement et le contact direct aussi bien avec les animaux qu'avec les humains. Certaines de ces voies sont bien démontrées, tandis que d'autres sont seulement suspectées. Plus important encore, les voies de transmission dépendent du génotype du virus (Figure 9) (Spahr *et al.*, 2017).

I.2.2.1. Transmission oro-fécale

Le VHE est généralement transmis à l'homme par voie féco-orale dans les zones où le niveau d'hygiène collectif ou individuel est insuffisant. Le VHE de génotype 1 et 2 sont principalement réservés aux humains et ont été responsables de grandes épidémies d'hépatite E. Selon l'Organisation mondiale de la santé (OMS), un tiers de la population mondiale (plus de deux milliards de personnes) vit dans des zones hyper-endémiques pour ces génotypes (OMS, 2015). Chaque année, environ 20 millions d'infections à VHE sont signalées en Afrique et en Asie de l'Est (Rein *et al.*, 2012). La contamination de l'eau potable et de la nourriture par des excréments humains est soupçonnée d'être la principale voie de transmission du VHE dans ces régions endémiques. En effet, chez les individus infectés, le VHE est excrété dans les fèces sur plusieurs jours (Kasorndorkbua *et al.*, 2004). De faibles niveaux d'hygiène et un accès limité à l'eau potable représentent donc un risque élevé de survenue d'épidémies d'hépatite E dans les pays en développement. Ce mode de transmission doit être plus exploré en Afrique car le VHE a été détecté dans les eaux usées en Tunisie (Beji-Hamza *et al.*, 2015).

I.2.2.2. Transmission materno-fœtale

La transmission verticale du VHE de la mère à l'enfant en zone d'endémie varie de 33 à 100% selon les études (Khuroo *et al.*, 2009). La mortalité excessivement élevée chez les femmes enceintes est jusqu'ici associé exclusivement au génotype 1 (Mirazo *et al.*, 2014). Aucune étude n'a rapporté un cas de mortalité chez la femme enceinte associé aux génotypes 3 ou 4 (Mirazo *et al.*, 2014). En Afrique, bien que les études soient rares, une infection de

génotype 2 qui a entraîné une insuffisance hépatique fulminante chez une femme enceinte a été documentée en Namibie (Maila *et al.*, 2004). Le VHE provoque une grave atteinte hépatique chez les nourrissons avec de forts taux de morbidité et mortalité néonatale pouvant atteindre 40 % (Khuroo *et al.*, 1995 ; Rayis *et al.*, 2013). Le VHE est transmis d'une mère infectée au fœtus par des voies intra-utérines et périnatales. Chez les bébés survivants, l'évolution clinique de l'infection par le VHE est spontanément résolutive avec seulement une très courte période de virémie (Khuroo *et al.*, 2009).

I.2.2.3. Transmission parentérale

La transmission parentérale ne semble pas être une voie fréquente et importante de propagation du VHE. Ces dernières années, les études ont rapporté les cas de transmission par transfusion sanguine chez des patients transfusés à partir de donneurs de sang asymptomatiques aussi bien dans les pays en voie de développement que dans les pays industrialisés (Kumar *et al.*, 2013). En France, les analyses génétiques des séquences de VHE des donneurs et des receveurs de sang ont été effectuées. Les séquences très identiques ont été récupérées de ces deux groupes de personnes dans lesquels les génotypes 1 et 3 étaient impliqués (Colson *et al.*, 2007). En Allemagne, la séroprévalence des IgG anti-VHE a été estimée à 6,8% et la prévalence de l'ARN du VHE ont été identifiées dans 0,08% du sang provenant des dons. Ainsi une approche de dépistage du VHE chez les donneurs de sang à travers les techniques d'amplification des ARN a été développée en Allemagne (Juhl *et al.*, 2014). Des cas de transmission du VHE chez les patients hémodialysés ou après transplantation avec un risque de développer une infection chronique ont été signalés à travers le monde (Kamar *et al.*, 2011 ; Kamar *et al.*, 2008 ; Mitsui *et al.*, 2004).

I.2.2.4. Transmission zoonotique

Les inoculations réussies *in vitro* des souches du VHE dès 1990, avaient apporté des preuves de franchissement de la barrière d'espèce par le VHE. C'est ainsi que la possibilité d'un réservoir animal chez le porc ou d'autres animaux a été évoquée (Mushahwar, 2008).

Le VHE reste infectieux jusqu'à 60°C, suggérant la possibilité de sa transmission par la consommation de produits tels que les organes et les tissus crus ou légèrement cuits

(Pavio *et al.*, 2015). Plusieurs cas de transmission zoonotiques directes du VHE à l'homme ont été recensés après la consommation de la viande de cerf sous forme de shushi, barbecue de porc ou sanglier, foie de porc grillé ou cru (Li *et al.*, 2005 ; Tei *et al.*, 2003 ; Yazaki *et al.*, 2003). L'homologie des séquences entre les souches humaines et celles isolées dans les denrées alimentaires conservées variait de 99,5% à 100% (Tei *et al.*, 2003). Des souches de VHE génotypes 3 ou 4, isolés du foie, saucisse de foie de porc, figatelles, abats et viandes de sanglier, ont été rapportés à travers le monde (Berto *et al.*, 2013 ; Colson *et al.*, 2010 ; Meng, 2011 ; Miyashita *et al.*, 2012 ; Pavio *et al.*, 2014).

Des preuves de la transmission du VHE par contact direct de l'homme avec des animaux ont été rapportées. Plusieurs études ont montré que les personnes en contact professionnel avec des porcs domestiques tels que les abatteurs, les éleveurs de porcs ou les vétérinaires présentent des prévalences d'anticorps anti-VHE significativement plus élevées que la population générale (de Carvalho *et al.*, 2013). La même chose a été démontrée pour les personnes ayant des contacts fréquents avec les sangliers et leurs excréments comme les forestiers et les chasseurs (Dremsek *et al.*, 2012 ; Schielke *et al.*, 2015).

La transmission du VHE par le lait semble être une autre possibilité d'infection par le VHE (Rivero-Juarez *et al.*, 2016). Une étude chinoise récente indique l'excrétion du génotype 4 dans le lait de vache (Huang *et al.*, 2016). Dans une autre étude, du matériel génomique de VHE a été identifié dans l'urine de porcs infectés, qui peut jouer un rôle majeur dans la transmission du VHE (Kasorndorkbua *et al.*, 2004).

Le rôle de l'environnement dans la transmission du VHE de l'animal à l'homme ne doit pas être négligé. Une étude conduite en Tunisie a isolé à partir d'eaux usées du matériel génétique du VHE proches des séquences porcines (Beji-Hamza *et al.*, 2015). Ceci suggère la possibilité de transmission par un contact direct ou ingestion orale d'eaux contaminées (Teo, 2010).

1.2.2.5. Transmission nosocomiale

La transmission du VHE dans un contexte nosocomial est également possible. Il a été rapporté un cas d'épidémie hospitalière où le personnel s'est contaminé lors de la prise en charge d'un patient souffrant d'une hépatite virale E (Robson *et al.*, 1992). En France, l'étude

publiée par Kaba *et al.* (2010) au sein d'une population de sans domicile fixe (SDF), avait révélé une association entre le portage d'IgG anti-VHE et la toxicomanie qui pourrait représenter une voie de contamination par le virus (Kaba *et al.*, 2010).

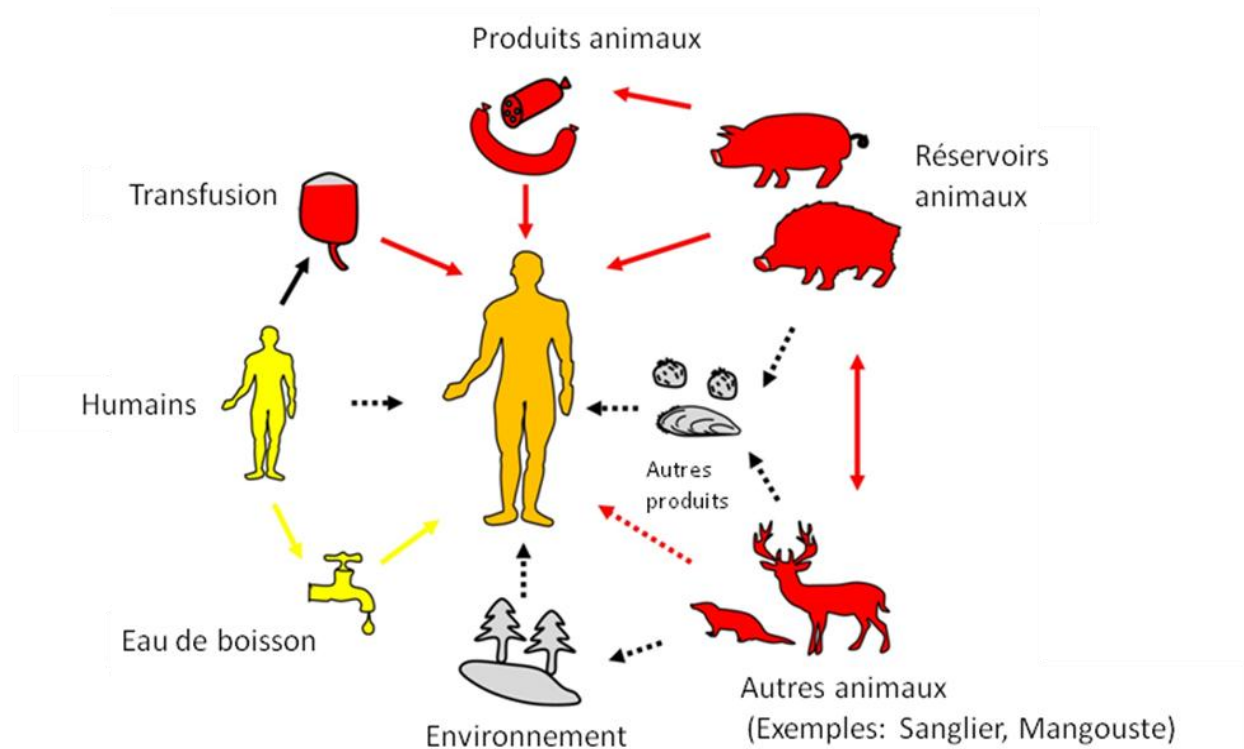


Figure 9 : Voies de transmission des 4 principaux géotypes du VHE pathogène à l'homme (Spahr *et al.*, 2017).

I.2.3. Cinétique d'apparition des marqueurs d'infection par le virus de l'hépatite E

La cinétique d'apparition des marqueurs biologiques de l'infection virale E est décrite sur la figure 10. Les IgM anti-VHE apparaissent précocement au début de la maladie et peuvent persister jusqu'à 32 semaines (Huang *et al.*, 2010). Les IgG anti-VHE apparaissent peu de temps après les IgM anti-VHE et persistent habituellement plusieurs années (Khudyakov *et al.*, 1993). Les transaminases atteignent un pic vers 6 semaines pour se normaliser à la 10^{ème} semaine. Les IgM anti-VHE culminent pendant la phase aiguë de la maladie et disparaissent entre 3 et 6 mois. Les IgG anti-VHE apparaissent au pic des transaminases et suivent une ascension pendant la phase symptomatique. Elles ont été détectées jusqu'à 12 ans après l'infection. Le virus peut être détecté dans le sang et les selles par RT-PCR entre 7 et 15 jours avant l'élévation des transaminases. La virémie persiste

pendant la phase symptomatique de 21 à 28 jours pour se négativer dans les suites de la régression clinique. Le pic de la virémie se situe pendant la période d'incubation et la phase précoce de la maladie. L'excrétion fécale est prolongée de 2 semaines par rapport à la virémie (Chandra *et al.*, 2008 ; Dalton *et al.*, 2008).

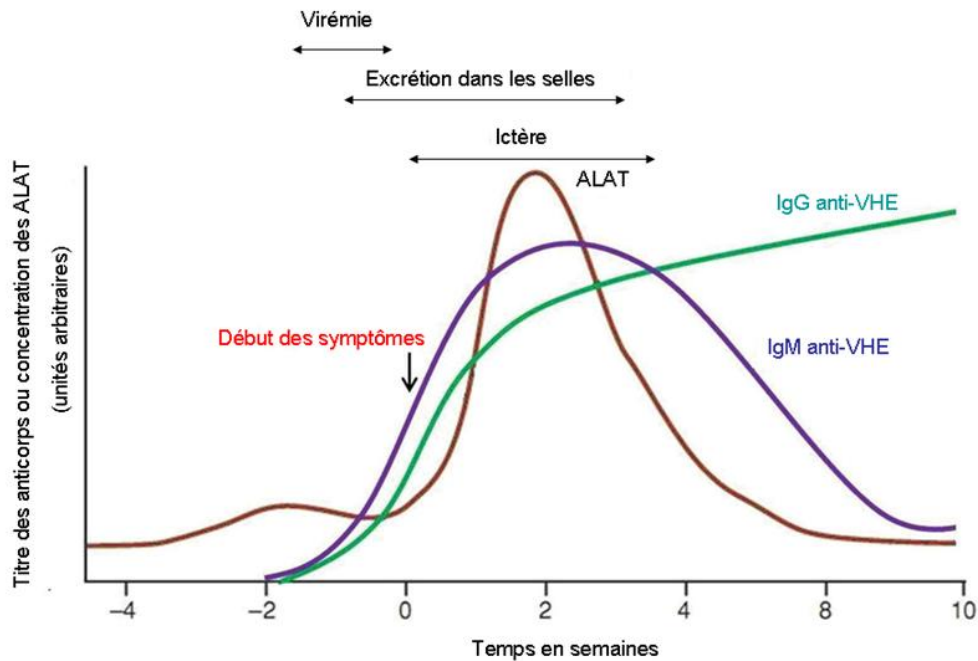


Figure 10 : Cinétique d'apparition des anticorps et évolution des alanines amino-transférases (ALAT) lors de l'infection par le VHE (Aggarwal *et al.*, 2011).

I.2.4. Diagnostic du virus de l'hépatite E

Les signes cliniques (jaunisse ou ictère) de l'infection par le VHE ne permettent pas de différencier l'hépatite virale E des autres formes virales à cause de leur similarité. Les connaissances épidémiologiques actuelles montrent à suffisance que le VHE doit être considéré au même titre que le virus de l'hépatite A (VHA), le virus de l'hépatite B (VHB) ou le virus de l'hépatite C (VHC). Le diagnostic biologique de l'hépatite virale E repose sur la détection de l'ARN du virus ou des marqueurs sérologiques spécifiques tels que les anticorps (IgM anti-VHE, IgG anti-VHE).

I.2.4.1. Diagnostic sérologique des anticorps anti-VHE

Les outils de diagnostic sérologique permettant la mise en évidence indirecte du VHE sont principalement basés sur la recherche des IgG et IgM anti-VHE par les techniques ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay). Il existe plusieurs trousse sérologiques commercialisées afin de détecter les IgG et IgM spécifiques du VHE (Al-Sadeq *et al.*, 2018). Elles sont basées principalement sur des méthodes immunoenzymatiques ou immunochromatographiques. L'existence d'un seul sérotype permet l'utilisation de protéines isolées des génotypes 1 et 2 pour la recherche des anticorps anti-VHE (Emerson *et al.*, 2001). Les antigènes utilisés sont issus d'ORF2 et ORF3. Elles se différencient par les séquences d'acides aminés des antigènes coâtés dérivés de l'ORF2, de l'ORF3 et par leurs modes de production (protéines recombinantes ou peptides de synthèse) ce qui leur confère des performances variables. Ces trousse ont été développées principalement à partir de virus de génotypes 1 et/ou 2 (Nicand *et al.*, 2009).

I.2.4.2. Diagnostic moléculaire de l'ARN du VHE

L'ARN viral est présent dans le plasma, les selles, la bile et le tissu lymphatique des humains et animaux infectés. Le diagnostic biologique de certitude de l'hépatite E repose sur la mise en évidence du génome viral principalement dans le sang et/ou les selles par RT-PCR (Mushahwar, 2008). Le génome du VHE est détecté par technique de RT-PCR en point final ou RT-PCR temps réel. Des systèmes multiplex ont également été développés (Merviel *et al.*, 2012 ; Phan *et al.*, 2005). La région majoritairement amplifiée se situe au niveau de la région de l'ORF2 codant pour la protéine de capsid qui est très conservée (Nicand *et al.*, 2009).

I.2.4.2.1. RT-PCR quantitatif

La réaction en chaîne de la polymérase, en temps réel, permet la détection et/ou la quantification de l'ARN viral. Plusieurs technologies de détection sont possibles pour cette méthode de PCR, mais on peut les séparer en 2 groupes : les agents se liant à l'ADN double brin (ex : SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (ex : Taqman). Un signal fluorescent est détecté et quantifié pendant l'amplification et l'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons produits durant la réaction. La

détection se fait en temps réel, après chaque cycle de PCR, sans avoir à faire d'électrophorèse. Ceci permet d'avoir une réponse plus rapide, plus sensible et plus spécifique sur la présence ou l'absence du VHE dans l'échantillon. De nombreuses techniques par RT-PCR temps réel sont décrites dans la littérature (Merviel *et al.*, 2012). Certaines peuvent détecter les 4 génotypes et peuvent être quantitatives avec des limites de détection variant de 4, 5 à 1000 copies/ml ou de 1 à 20 copies/réaction. Li *et al.* (2006) démontrent l'utilisation de la technologie SYBR Green I dans la détection du VHE par la PCR en temps réel mais la technologie Taqman® est largement répandue. Des écarts de sensibilité entre les techniques moléculaires ont été rapportés (Baylis *et al.*, 2011).

I.2.4.2.2. RT-PCR nichée

La RT-PCR nichée est une méthode développée pour s'assurer que la bande visualisée sur gel est bien celle recherchée. Cette technique consiste à réaliser deux PCR successives en utilisant des couples d'amorces encadrant une séquence incluse dans celle qui est amplifiée par le premier couple d'amorces. Si le premier couple d'amorces se lie à une séquence non-spécifique, lors de la deuxième amplification, les amorces ne pourront pas s'hybrider et il n'y aura pas d'amplification. Cette méthode permet d'augmenter la spécificité et la sensibilité, ce qui est souhaité lorsque la quantité d'ARN de départ est faible. Plusieurs techniques de RT-PCR « maison » en point final ou conventionnelle sont décrites dans la littérature (Cooper *et al.*, 2005 ; Huang *et al.*, 2002 ; Inoue *et al.*, 2006). Une étude des chercheurs américains a permis de développer une RT-PCR nichée universelle pour le VHE qui permet de détecter les souches de VHE les plus divergentes (Huang *et al.*, 2002). Un alignement multiple de 18 différentes séquences de l'ORF2, de souches connues de VHE (humaines et porcines) a été réalisé. À partir de celui-ci, deux paires d'amorces dégénérées ont été construites pour la réalisation de la RT-PCR nichée, permettant ainsi de cibler une grande population d'isolats de VHE. Les amorces ont été testées par l'équipe de Huang et collaborateurs avec une souche du génotype 1 (Sar-55) et deux autres souches de génotype 3 (US2 humain et swUS1). Une partie conservée du gène de l'ORF2, gène de la capsid, a été choisie pour la détection du VHE (Huang *et al.*, 2002).

I.2.5. Traitement de l'infection par le virus de l'hépatite E

Le VHE provoque une maladie spontanément résolutive chez les personnes immunocompétentes avec un traitement uniquement symptomatique. Chez les patients immunodéprimés développant une hépatite fulminante ou chronique, une baisse de l'immunodépression, la monothérapie avec l'interféron-alpha ou la ribavirine ont donné des résultats encourageant dans certains cas (Alric *et al.*, 2011). Toutefois ces deux molécules sont contre-indiquées chez les transplantés car induisant des effets indésirables graves (risque de rejet, anémie hémolytique sévère, etc.) (Tan *et al.*, 2011). La diminution de la dose des immunosuppresseurs comme approche thérapeutique de première intention chez les patients greffés doit être envisagé, car cela a conduit à une éradication du virus dans un bon nombre de cas testés (Parvez, 2013).

I.2.6. Prévention de l'infection par le virus de l'hépatite E

La prévention de la maladie se limite, dans les régions d'endémie, à l'amélioration des conditions sanitaires. Collectivement, l'approvisionnement des réseaux hydriques avec une eau exempte de pathogènes devrait être mis en place pour limiter le risque d'exposition. De même, un système efficace de traitement des eaux usées contribuerait à limiter le risque d'épidémie dans les zones où le VHE est endémique.

Par contre, individuellement, les infections peuvent être réduites en améliorant les conditions sanitaires. Le lavage efficace des mains est la première mesure préventive à l'échelle individuelle. Limiter la consommation de viande crue ou insuffisamment cuite constitue une autre mesure efficace. Une cuisson suffisante des aliments à risque (>70°C pendant au moins 20 minutes) est conseillée (Emerson *et al.*, 2005). Cette mesure s'adresse plus particulièrement aux personnes immunodéprimées et aux personnes ayant une hépatopathie sous-jacente. De même, il est reconnu que les porcs et d'autres animaux excrètent de grandes quantités de virus dans leurs fèces, posant ainsi un problème environnemental et de sécurité alimentaire. C'est ainsi que dans les pays développés où les transmissions zoonotiques ont été fortement documentés, il devient prioritaire d'identifier tous les réservoirs possibles de VHE (Pavio, 2006).

Actuellement, aucun vaccin n'est disponible pour l'infection par le VHE. A ce jour, Des essais, en phase III, prometteurs ont été conduits pour deux types de vaccins recombinants exprimant la protéine de capsid ORF2 de génotype 1 du VHE. Le premier correspond à la protéine tronquée de capsid (acides aminés 112-607) d'un isolat du Pakistan. Le deuxième vaccin est basé sur l'expression bactérienne de la protéine recombinante correspondant aux acides aminés 368–660 de l'ORF2 d'un isolat de Chine (Zhu *et al.*, 2010). Ce vaccin est actuellement commercialisé et disponible en Chine (OMS, 2014). Ces vaccins seraient très utiles dans les pays à ressources limitées où les génotypes 1 et 2 sont endémiques mais leur efficacité est remise en question dans les zones non endémique où prédominent les autres génotypes (Mirazo *et al.*, 2014). Le développement de vaccins pan-génotypiques prenant en compte les autres génotypes, et particulièrement le génotype 3, permettrait la prévention de l'infection chronique et pourrait être considérée comme une mesure d'immunoprophylaxie chez les receveurs d'organes (Arends *et al.*, 2014).

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES

II.1. Cadre d'étude

II.1.1. Présentation des sites d'étude

La présente étude a été menée au Cameroun, pays d'Afrique centrale situé entre les parallèles de latitude 01°40' et 13° 04'N et les méridiens de longitude 08°40' et 16° 10'E. De forme générale triangulaire, il s'étend sur environ 800 km à la base et 1500 km sur la plus grande longueur et l'altitude atteint 4070 m de hauteur, pour une superficie d'environ 475.442 km². Il comporte administrativement dix régions. Sa capitale politique est Yaoundé et celle économique Douala (Onana, 2018). Les échantillons des humains ont été collectés dans les régions du Centre, du Nord et du Sud tandis que ceux des animaux ont été prélevés dans les régions du Nord, de l'Ouest, du Sud-Ouest, de l'Est, du Centre et du Littoral. Les analyses sérologiques, les analyses moléculaires, le séquençage et les analyses phylogénétiques ont été réalisées au laboratoire de virologie du Centre Pasteur du Cameroun et à l'Unité des maladies infectieuses, « Hospital Universitario Reina Sofía, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC) », Cordoba, Espagne.

II.1.2. Période et type d'étude

Il s'agit d'une étude descriptive transversale qui s'étendait de 2009 à 2015 pour la partie rétrospective et de 2017 à 2020 pour la partie prospective.

II.2. Population d'étude

La présente étude a porté sur :

- Trois groupes de personnes à risque de développer les formes graves de l'infection par le VHE que sont les personnes vivant avec le VIH (PVVIH), les femmes enceintes et les personnes âgées de plus de 60 ans. Ont été aussi incluses dans cette étude pour la confirmation moléculaire, les personnes suspectées de fièvre jaune dans la région de l'Extrême Nord dont les échantillons envoyés pour analyses au CPC étaient tous négatifs à la fièvre jaune et autres arbovirus mais positifs aux anticorps anti-VHE.

- Deux espèces animales potentiellement réservoirs du VHE au Cameroun à savoir les porcs et les primates non humains (PNH).

II.2.1. Critères d'inclusion et de non-inclusion

II.2.1.1. Critères d'inclusion

Etaient incluses dans cette étude :

- Toutes personnes âgées de plus de 60 ans, négatives au VIH;
- Toutes femmes enceintes négatives au VIH;
- Toutes personnes vivant avec le VIH non enceintes pour les femmes PVVIH, âgées de moins de 60 ans;
- Tous primates non humains et porcs bien identifiés.

II.2.1.2. Critères de non-inclusion

Toutes les personnes (femmes enceintes, personnes vivant avec le VIH, personnes âgées) et tous les animaux (porcs et primates non humains) ne répondant pas aux critères sus-cités n'étaient pas inclus dans notre études.

II.2.2. Considérations éthiques et administratives

II.2.2.1. Pour les porcs

L'étude menée chez les porcs avait reçu l'approbation du Ministère de l'Elevage, des Pêches et des Industries Animales du Cameroun enregistrée au numéro N°000050/L/MINEPIA/SG/DREPIA/CE.

II.2.2.2. Pour les primates non humains

Une convention a été signée entre le Centre Pasteur du Cameroun et le Ministère de la Faune et la Forêt stipulant que le CPC assurerait le diagnostic et le suivi biologique de ces

animaux mis en quarantaine et la biothèque pourrait servir pour la recherche. Cette convention a été enregistrée sous le numéro 435/1999.

II.3. Méthodes

II.3.1. Echantillonnage

II.3.1.1. Echantillons humains

Les échantillons humains analysés dans le cadre de cette étude rétrospective proviennent des études antérieures menées dans les régions du Sud, du Nord et du Centre entre 2009 et 2015. Ces échantillons étaient disponibles dans les sérothèques du laboratoire de Virologie du CPC et représentant trois groupes de personnes à risque de développer les formes graves de VHE (personnes vivant avec le VIH, femmes enceintes, personnes âgées) d'une part et un groupe constitué des personnes suspectées de fièvre jaune d'autre part.

En Mars 2009, des échantillons de personnes âgées (≥ 60 ans) ont été prélevés à Ebolowa, dans le sud du Cameroun dans le cadre d'une étude ayant pour but de définir les facteurs de risque d'infection par le virus de l'hépatite C. Un total de 450 de ces échantillons a été sélectionné et analysé dans le cadre de notre étude pour décrire l'épidémiologie de l'infection par le VHE chez les personnes âgées dans la ville d'Ebolowa.

De Janvier à Septembre 2014, une étude a été menée au Centre Pasteur du Cameroun et avait inclus 270 personnes vivant avec le VIH (PVVIH), recrutés de manière consécutive à l'hôpital central de Yaoundé, le centre hospitalier universitaire de Yaoundé et l'hôpital de district de Cité Verte. Nous avons utilisé ces mêmes échantillons pour décrire l'épidémiologie de l'infection par le VHE chez les PVVIH dans la ville de Yaoundé.

De Mars à Décembre 2015, une étude a été menée au Centre Pasteur du Cameroun chez 183 femmes enceintes prélevées au dispensaire catholique de Nkoabang à Yaoundé. Ces échantillons ont été utilisés dans notre étude dans le but de décrire l'épidémiologie de l'infection par le VHE chez les femmes enceintes dans la ville de Yaoundé.

De Septembre à Octobre 2013, une épidémie caractérisée par la fièvre et l'ictère était survenue dans deux villages voisins dans la région du Nord-Cameroun. En raison d'une suspicion d'infection par le virus de la fièvre jaune, les échantillons de sang prélevés ont été

envoyés au Centre Pasteur de Cameroun pour confirmation. Cependant, tous les échantillons prélevés se sont révélés négatifs pour la fièvre jaune et d'autres arbovirus. Ces échantillons ont ensuite été testés par sérologie pour vérifier la présence d'anticorps anti-VHE. Une prévalence élevée d'anticorps IgM anti-VHE, marqueur d'infection récente a été trouvée indiquant une épidémie causée plutôt par le VHE. Ces échantillons ont été utilisés dans notre étude dans l'optique de confirmer par la technique moléculaire cette épidémie de l'infection par le VHE.

II.3.1.2. Echantillons animaux

II.3.1.2.1. Echantillons des porcs

Pour la partie rétrospective, de Janvier à Mars 2012, 162 échantillons de sérum ont été prélevés sur des porcs dans quelques abattoirs de la région du Nord (Garoua) et de l'Ouest (Bafoussam) dans le cadre d'une étude sur la prévalence de la grippe A/H1N1 chez les porcs du Cameroun (Njabo *et al.*, 2012). Les échantillons de sang ont été prélevés lors de l'abattage des porcs au poste de saignement comme décrit précédemment (Rose *et al.*, 2011).

Pour la partie prospective, les échantillons de selles et de sang ont été prélevés de manière consécutive sur 453 porcs domestiques dans les abattoirs de la région du Centre (Obala, Yaoundé) et du Littoral (Douala), entre Février 2017 et Septembre 2018. Les échantillons de sang ont été prélevés lors de l'abattage des porcs au poste de saignement comme décrit précédemment (Rose *et al.*, 2011), tandis que les échantillons des selles ont été collectés au niveau l'estomac après leur abattage.

II.3.1.2.2. Echantillons des primates non humains

Les plasmas de primates non humains utilisés dans le cadre de la présente étude provenaient d'études antérieures conçues pour documenter les infections virales chez diverses espèces de primates non humains au Cameroun (Foupouapouognigni *et al.*, 2011 ; Foupouapouognigni *et al.*, 2011). Ces primates non humains comprenaient les grands singes (chimpanzés et gorilles) de la famille des Hominidae et les petits singes de la famille des Cercopithecidae. Les échantillons ont été prélevés sur des singes mis en captivité dans les centres zoologiques de la région du Sud-Ouest (Limbé), du Centre (Mefou, Yaoundé) et de

l'Est (Bélabo) au Cameroun. Ces jeunes animaux étaient arrivés dans ces centres d'accueil soit après confiscation chez les chasseurs ou soit après être devenus orphelins victimes de la chasse. À leur arrivée, ils ont été mis en quarantaine et des échantillons ont été prélevés pour des examens vétérinaires de routine, y compris la détection du virus de l'hépatite B (VHB) et du virus de l'hépatite C (VHC) au Centre Pasteur du Cameroun. Dans l'ensemble, 172 échantillons correspondant à 15 espèces de PNH ont été sélectionnés pour cette étude.

II.3.2. Prélèvements, traitement et conservation des échantillons

Pour la partie prospective de cette étude, les prélèvements de sang humains et porcins ont été faits dans les tubes EDTA pour la réalisation des différents tests sérologiques et moléculaires. Les séras obtenus après centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours/minute ont été aliquotés puis conservés dans un congélateur -80°C ou -20°C pour des analyses ultérieures. Les échantillons fécaux obtenus des porcs ont été obtenus directement de l'estomac et conservés dans des boîtes stériles. Ils ont ensuite été dilués à 10% (p/v) dans du PBS (phosphate-buffered saline), clarifiés par centrifugation à 12000 g pendant 10 min et les aliquots ont été utilisés pour l'extraction de l'ARN viral ultérieurement. Tous les aliquots obtenus ont été conservés dans un congélateur -80°C pour les analyses ultérieures.

Pour la partie rétrospective de cette étude, les échantillons humains, porcins et des primates non humains analysés proviennent de la sérothèque du service de virologie du Centre Pasteur du Cameroun. Cette sérothèque était constituée des aliquots de séras obtenus après centrifugation pendant 10 minutes à 2500 tours/minute puis conservés dans un congélateur -80°C muni d'un système de contrôle journalier de température.

II.3.3. Détermination de la séroprévalence du VHE chez les humains, les primates non humains et les porcs du Cameroun

II.3.3.1. Détection des anticorps IgM anti-VHE et IgG anti-VHE

Cette partie a été totalement réalisée au laboratoire de virologie du Centre Pasteur du Cameroun. Dans la présente étude, les anticorps IgM et IgG anti-VHE ont été évalués en

utilisant les kits commerciaux dénommés « HEV IgM ELISA 3.0 kits » et « HEV IgG ELISA kits » respectivement, suivant les instructions du fabricant (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd).

II.3.3.1.1. Principe du test

Le test VHE ELISA 3.0 est une technique d'immunoabsorption enzymatique développé pour détecter les anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite E dans le sérum ou le plasma. C'est un test immunologique indirect qui utilise un épitope conformationnel hautement conservé codé par le cadre de lecture ouvert 2 (ORF2) du virus. La présence d'anticorps IgM et IgG dans le prélèvement est détectée grâce à des anticorps monoclonaux de souris anti-IgM et anti-IgG humaines marqués par la peroxydase de raiford.

II.3.3.1.2. Mode opératoire

Les dosages des anticorps IgM et IgG anti-VHE ont été réalisés suivant les recommandations du fabricant (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd, Singapore).

Avant la réalisation du test, les réactifs et les échantillons conservés antérieurement sont équilibrés jusqu'à ce qu'ils atteignent la température ambiante sur la paillasse. Les puits des plaques contiennent les antigènes (épitope ORF2 conformationnel) hautement conservés. Les séra ont d'abord été dilués dans du tampon et placés dans des puits de la plaque recouverte par un film. Après incubation de 30 min à $37 \pm 1^\circ \text{C}$, puis lavage de la plaque, le conjugué (peroxydases de raiford) a été ajouté et incubé pendant 30 min à $37 \pm 1^\circ \text{C}$. Les plaques ont été lavées et 100 μL de solution de substrat (tétraméthylbenzidine) ont été ajoutés entraînant une coloration bleue dans les puits contenant les anticorps recherchés. Après 15 min d'incubation, la couleur bleue vire au jaune après l'ajout de 50 μL de la solution d'arrêt (acide chlorhydrique). L'intensité du produit réactionnel jaune est mesurée par spectrophométrie à 450 nm et est proportionnelle à la quantité d'anticorps présente dans le prélèvement. Pour chaque analyse, des contrôles positifs et négatifs, fournis avec le kit, ont été utilisés.

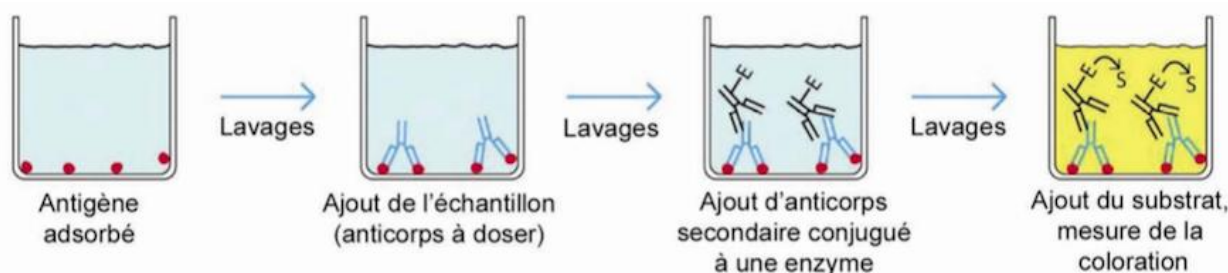


Figure 11 : Principe d'un test immuno-enzymatique indirect.

II.3.3.1.3. Calcul et interprétation des résultats

II.3.3.1.3.1. Pour IgM anti-VHE

La valeur seuil pour les anticorps IgM anti-VHE a été fixée à 0,400 ajoutée à l'absorbance moyenne des contrôles négatifs.

$$V_s = \text{Moyenne des contrôles négatifs} + 0.400$$

La présence ou l'absence d'anticorps IgM anti-VHE a été déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle la valeur seuil obtenue. Les échantillons fournissant des densités optiques supérieures ou égales à la valeur seuil ont été classés positifs et tous les échantillons fournissant les densités optiques inférieures à la valeur seuil ont été classés négatifs.

II.3.3.1.3.2. Pour IgG anti-VHE

La valeur seuil pour les anticorps IgG anti-VHE a été fixée à 0,500 ajoutée à l'absorbance moyenne des contrôles négatifs.

$$V_s = \text{Moyenne des contrôles négatifs} + 0.500$$

La présence ou l'absence d'anticorps IgG anti-VHE a été déterminée en comparant pour chaque échantillon l'absorbance enregistrée à celle de la valeur seuil obtenue. Les échantillons fournissant des densités optiques supérieures ou égales à la valeur seuil ont été classés positifs et tous les échantillons fournissant les densités optiques inférieures à la valeur seuil ont été classés négatifs.

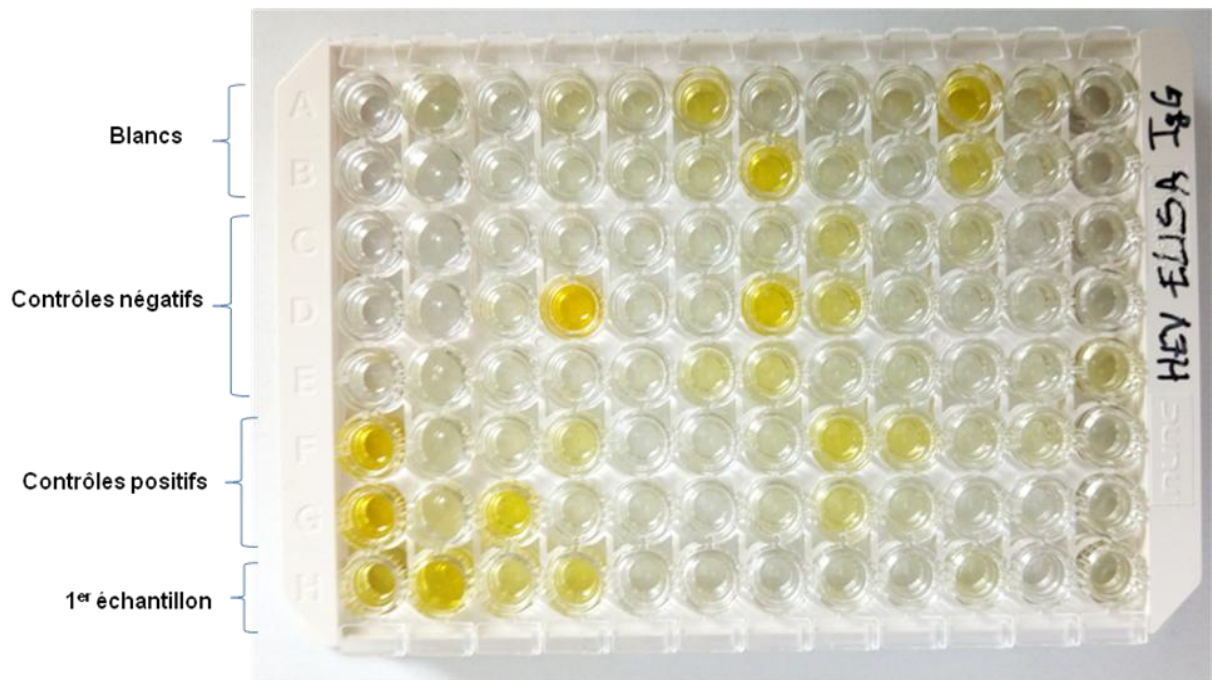


Figure 12 : Exemple de microplaque ELISA après lecture au spectrophotomètre.

II.3.4. Caractérisation génétique du VHE chez les porcs, les humains et les primates non humains au Cameroun

II.3.4.1. Sélection des échantillons

Les échantillons positifs aux anticorps IgM anti-VHE ont été sélectionnés pour la caractérisation génétique des souches de VHE chez les humains (femmes enceintes, personnes âgées, PVVIH et personnes suspectées de fièvre jaune) et les animaux (porcs et primates non humains).

II.3.4.2. Caractérisation génétique des souches du VHE chez les humains et animaux

Les analyses moléculaires ont été réalisées avec deux protocoles différents. En effet, tous les échantillons humains et animaux sélectionnés pour la biologie moléculaire ont été d'abord analysés avec le protocole mis en place au laboratoire de virologie du CPC. Les échantillons négatifs avec ce premier protocole étaient à nouveau analysés avec un autre

protocole disponible à l'Unité des maladies infectieuses, «Hospital Universitario Reina Sofía, Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Cordoba, Espagne».

II.3.4.2.1. Caractérisation génétique des souches du VHE chez les porcs

Le protocole utilisé au laboratoire de virologie du Centre Pasteur du Cameroun est celui développé par Huang *et al.* (2006). Il comprend une extraction suivie d'une RT-PCR nichée.

II.3.4.2.1.1. Extraction manuelle de l'ARN du VHE avec le « QIAamp® Viral Mini Kit »

Un volume de 140 µL de sérum (humains, porcs et PNH) et de selles (seulement pour les porcs) étaient extraits manuellement avec le kit commercial QIAamp Viral Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) selon les recommandations du fabricant (Annexe). Avant l'extraction, les échantillons des selles des porcs subissaient d'abord une étape de prétraitement qui consistait à les diluer à 10% (p/v) dans du PBS (phosphate-buffered saline) et à les clarifier par centrifugation à 12 000 g pendant 10 minutes.

II.3.4.2.1.1.1. Principe de l'extraction

Le principe d'extraction de l'ARN par le Kit « Qiagen » repose sur la rétention spécifique de l'ARN par chromatographie d'échange d'ions à travers une phase stationnaire solide constituée d'une membrane faite à base de la silice.

II.3.4.2.1.1.2. Mode opératoire

L'extraction de l'ARN a été réalisée dans une salle (Salle d'extraction), équipée et réservée à cet effet. Dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 à 2 ml bien identifiés, ont été déposées successivement : 140 µL de sérum, 560 µL de la solution de tampon de lyse préalablement préparée (Buffer AVL + carrier RNA). Le mélange a été homogénéisé pendant 15 secondes à l'aide d'un vortex puis centrifugé brièvement pendant 30 secondes. Les tubes ont été incubés à température ambiante pendant 10 minutes. Le mélange a ensuite été précipité par ajout de 560 µL d'éthanol absolu. L'adsorption de l'ARN sur la colonne a été

réalisée à travers deux passages de 630 µL du lysat sur la colonne suivi d'une centrifugation à 6000g pendant une minute. Après l'adsorption de l'ARN, la colonne est d'abord lavée par dépôt sur la colonne de 500 µL du tampon AW1 et centrifugation à 6000 g pendant 1 minute ; puis par dépôt de 500 µL du tampon AW2 et centrifugation à 20000 g pendant 3 minutes. Les colonnes ont été transférées sur des tubes collecteurs de déchets pour une centrifugation à 20000g pendant 1 minute dans le but d'éliminer toute trace d'éthanol qui pourrait inhiber la réaction de PCR. Enfin, les colonnes ont été transférées sur les tubes Eppendorf de 1,5 ml et l'ARN a été élué en mettant 60 µL de tampon AVE sur la colonne, incubation à température ambiante pendant 2 à 3 minutes et centrifugation à 6000 g pendant 1 minute. Les éluats d'ARN ainsi obtenus ont été étiquetés et conservés à -80°C pour les analyses.

II.3.4.2.1.2. Amplification d'ARN du VHE chez les porcs par RT-PCR nichée

L'amplification d'une portion de la région ORF2 du VHE a été réalisée par la RT-PCR nichée ou en point final. La première PCR a été réalisée en utilisant le système de RT-PCR en une étape avec SuperScript™ III One-Step RT-PCR System (Life Technologies Corporation, USA) et un couple d'amorces. La composition du mélange réactionnel est présentée dans le tableau 1. La taille des produits attendus après cette première PCR était de 731 nucléotides.

Tableau I : Composition du mélange réactionnel de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les porcs

Réactifs	Volume à pipeter (µL)	Concentration
Platinum Taq	N x 2	–
Amorce 3156N	N x 1	10 µM
Amorce 3157N	N x 1	10 µM
MgSO4	N x 2,3	50 mM
Tampon PCR	N x 25	2X
RNAsin	N x 2,3	–
dNTP	N x 1,5	10 mM
Eau	N x 7,2	–

N = nombre total pour lequel on prépare le Mix. $N = n + 1$ si $n < 25$ ou $N = n + 2$ si $n > 25$. n étant le nombre d'échantillons à analyser.

Le thermocycleur Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 a été utilisé avec le programme d'amplification contenu dans le tableau 2.

Tableau II : Programme de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les porcs

Étapes	Températures	Durée	Nombre de cycle
Transcription reverse	50°C	30 minutes	1
Activation de Platinum Taq	94°C	2 minutes	1
Dénaturation	94°C	15 secondes	40
Hybridation	60°C	30 secondes	40
Elongation	72° C	1 minute	40
Elongation final	72 ° C	5 minutes	1

Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées au cours de la RT-PCR sont présentées dans le tableau 3.

Tableau III : Séquences des amorces utilisées au cours de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les porcs

Noms	Séquences
3156N	5'-AATTATGCCTCAGTACTCGGAGTTG-3'
3157N	5'-CCCTTAGTCCTTGCTGACGCATTCTC-3'

Le produit de la RT-PCR a ensuite été utilisé comme matrice pour la PCR nichée. Un volume de 5 µL du produit de la RT-PCR a été utilisé dans un volume réactionnel total de 50 µL contenant 1 µL de Taq polymérase 5 U / µL, 2 µL d'amorce sens et antisens 10 µM (3158N et 3159N), 5 µL du tampon 5X, 2 µL de MgCL2 50mM, 2 µL de dNTP 10mM et 31 0,2 µL d'eau (Tableau 4).

Tableau IV : Composition de mélange réactionnel de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les porcs

Réactifs	Volume à pipeter (µL)	Concentration
Taq polymerase	N x 1	5 U / µL
Amorce 3158N	N x 2	10 µM
Amorce 3159N	N x 2	10 µM
MgCL ₂	N x 2	50 mM
Tampon PCR	N x 5	10X
dNTPs	N x 2	10 mM
H ₂ O	N x 31	–
Produit de la première PCR	N x 5	–

N = nombre total pour lequel on prépare le Mix. N = n + 1 si n < 25 ou N = n + 2 si n > 25. n étant le nombre d'échantillons à analyser.

Le mélange réactionnel a ensuite été testé en utilisant le programme présenté dans le tableau 5.

Tableau V : Programme de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les porcs

Étapes	Températures	Durée	Nombre de cycle
Activation de Taq polymerase	94°C	5 minutes	1
Dénaturation	94°C	30 secondes	40
Hybridation	55°C	30 secondes	40
Elongation	72° C	60 secondes	40
Elongation final	72 ° C	10 minutes	1

Les séquences nucléotidiques des amorces utilisées au cours de la PCR nichée sont présentées dans le tableau 6.

Tableau VI : Séquences des amorces utilisées au cours de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les porcs

Noms	Séquences
3158N	5'-GTAAATGCTTCTGCATATCATGGCT-3'
3159N	5'-AGCCGACGAAATCAATTCTGTC-3'

II.3.4.2.2. Caractérisation du VHE chez les humains et les primates non humains

Les échantillons humains et primates non humains négatifs après les tests moléculaires au laboratoire de virologie du CPC ont d'abord été extraits et ensuite analysés par RT-PCR en temps réel à l'IMIBIC selon la technique développée par Abravanel *et al.* (2012). Les échantillons positifs en RT-PCR temps réel ont été par la suite analysés par la technique de RT-PCR niche développée par Rivero-Juarez *et al.* (2017).

II.3.4.2.2.1. Extraction automatisée de l'ARN du VHE avec « QIAamp® MinElute Virus Spin Kit »

L'ARN viral a été extrait de 200 µl de sérum en utilisant le kit « QIAamp MinElute Virus Spin » (QIAGEN, Hilden, Allemagne) suivant les instructions du fabricant. Ce protocole d'extraction d'ARN a été effectué avec la procédure automatisée utilisant l'automate QIAcube (QIAcube, QIAGEN, Hilden, Allemagne).

II.3.4.2.2.1.1. Principe de l'extraction

Le kit « QIAamp MinElute Virus Spin » tout comme le kit « QIAamp® Viral Mini Kit » précédemment décrit, utilise la technologie des membranes de silice (QIAamp) pour l'isolement et la purification des acides nucléiques viraux à partir d'échantillons biologiques. La procédure QIAamp MinElute Virus Spin, qui comprend 4 étapes (lyse, fixation, lavage et élution), est effectuée sur des colonnes QIAamp MinElute® de manière totalement automatisée sur le QIAcube®. La procédure est conçue pour minimiser le risque de contamination croisée entre échantillons et permettre une manipulation sans danger des

échantillons potentiellement infectieux. D'une grande simplicité, la procédure QIAamp MinElute Virus Spin convient au traitement simultané de 12 échantillons. Le kit QIAamp MinElute Virus Spin peut servir à l'isolation d'ARN viral issu d'une vaste gamme de virus à ARN.

II.3.4.2.2.1.2. Mode opératoire

La purification des acides nucléiques viraux à l'aide du kit « QIAamp MinElute Virus Spin » a été réalisée de manière entièrement automatisée sur le QIAcube. Cet automate innovant utilise une technologie de pointe pour traiter les colonnes de centrifugation QIAGEN®, ce qui permet d'intégrer sans faille la préparation automatisée, à faible débit, des échantillons au flux de travail du laboratoire. La procédure de préparation des échantillons avec le QIAcube est identique à la procédure manuelle (c'est-à-dire lyse, fixation, lavage et élution), ce qui permet d'utiliser le kit « QIAamp MinElute Virus Spin » pour purifier des acides nucléiques viraux de haute qualité. La lyse des échantillons s'effectue dans des conditions hautement dénaturantes à des températures élevées. Elle est réalisée en présence de protéase QIAGEN et de tampon AL qui, ensemble, assurent l'inactivation des RNases. Les conditions de fixation sont ajustées par ajout d'éthanol afin de permettre une fixation optimale des ARN viraux à la membrane. Les lysats sont alors transférés sur la colonne QIAamp MinElute et les acides nucléiques viraux sont adsorbés sur la membrane en gel de silice tandis que les lysats passent à travers par centrifugation. Les conditions salines et de pH garantissent que les protéines et d'autres contaminants, qui peuvent inhiber l'amplification en chaîne par polymérase et d'autres réactions enzymatiques en aval, ne sont pas retenus par la membrane QIAamp MinElute. Les acides nucléiques restent liés à la membrane tandis que les contaminants sont efficacement éliminés au cours de 3 étapes de lavage. En une seule étape, l'ARN viral de haute pureté est élué dans le tampon AVE.

II.3.4.2.2.2. Amplification de l'ARN du VHE chez les humains et les primates non humain par RT-PCR temps réel

II.3.4.2.2.2.1. Principe de la RT-PCR temps réel

La RT-PCR temps réel ou la RT-qPCR est une technique qui permet de faire une PCR quantitative à partir d'un échantillon d'ARN. L'ARN est tout d'abord rétrotranscrit grâce à une

enzyme appelée transcriptase inverse, qui permet la synthèse de l'ADN complémentaire (ADNc). Ce dernier est ensuite utilisé pour réaliser une PCR quantitative. La transcriptase inverse ou rétro-transcriptase (en anglais reverse transcriptase ou RT) est une enzyme utilisée par les rétrovirus qui transcrivent l'information génétique des virus de l'ARN en ADN. La PCR quantitative ou qPCR ou PCR en temps réel, est une méthode particulière de réaction en chaîne par polymérase permettant de mesurer la quantité initiale d'ADN. En réalité, la PCR quantitative mesure le nombre d'amplicons (portion d'ADN définie par un couple d'amorces). Elle permet de suivre en continu (« en temps réel ») le processus d'amplification PCR en détectant la fluorescence émise par les produits de PCR néo formés.

II.3.4.2.2.2. Mode opératoire

Le protocole utilisé est celui développé précédemment par Abravanel *et al.* (2012). Les amorces et sondes suivantes ciblant la région de chevauchement ORF2/ORF3 ont été utilisées pour amplifier un fragment de 70 nucléotides (Abravanel *et al.*, 2012).

La solution de master mix était préparée dans la salle de préparation des mix. Le calcul pour chaque réactif du mix était fonction du nombre d'échantillons que l'on devait tester. La composition du mélange réactionnel pour l'amplification par RT-PCR temps réel du VHE chez les humains et les PNH est décrite dans le Tableau 7.

Tableau VII : Composition du mélange réactionnel de la RT-PCR temps réel pour l'amplification du VHE chez les humains et les PNH

Réactifs utilisés	Volume à pipeter
Amorce HEV5260 (20 µM)	N x 1 µl
Amorce HEV5330 (20 µM)	N x 1 µl
Sonde HEV5283 (15 µM)	N x 1 µl
dNTP (10 mM)	N x 1 µl
Tampon 5X	N x 5 µl
Taq polymerase	N x 1 µl
H ₂ O	N x 15 µl
Total	N x 25 µl

N = nombre total pour lequel on prépare le Mix. $N = n + 1$ si $n < 25$ ou $N = n + 2$ si $n > 25$. n étant le nombre d'échantillons à analyser.

Après avoir homogénéisé en agitant à l'aide d'un vortex pendant 5 secondes puis centrifuger brièvement le tube de 1,5 ml contenant le mélange réactionnel, 25 µl du mélange réactionnel ont été distribués dans chaque puits de la plaque de PCR. La plaque a ensuite été couverte avec un film adhésif, transportée dans la pièce d'extraction où 10 µl de contrôle positif, contrôle négatif et d'ARN ont été ajoutés. La plaque était ensuite transportée en salle d'amplification où l'étape d'amplification a été réalisée en utilisant le programme résumé dans le tableau 8. Cette amplification commençait par une reverse transcription à 50°C pendant 30 minutes, suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 15 minutes. L'ADN a été amplifié avec 45 cycles de PCR à 94°C pendant 1 minute, 51°C pendant 1 minute et 72°C pendant 1 minute.

Tableau VIII : Programme de la RT-PCR temps réel pour l'amplification du VHE chez les humains et les PNH

Etapes	Température	Durée	Nombre de cycle
Retro-transcription	50°C	30 minutes	1
Dénaturation	95°C	15 minutes	1
Dénaturation	94°C	1 minute	45
Hybridation	51°C	1 minute	45
Elongation	72°C	1 minute	45
Conservation	4°C	∞	–

Les réactifs, les séquences d'amorces et de sondes utilisés sont présentés dans le tableau 9.

Tableau IX : Réactifs, séquences et caractéristiques des amorces et de la sonde utilisés lors de la RT-PCR temps réel pour l'amplification du VHE chez es humains et les PNH

Réactifs, sonde et amorces

One step RT-PCR kit (210215 ; QIAgen, Hilden, Germany)

Amorce sens HEV5260 (5'-GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3')

Amorce anti-sens HEV5330 (5'-AGGGGTTGGTTGGATGAA-3')

Sonde HEV5283 (5'-FAM-TGATTCTCAGCCCTTCGC-TAMRA-3')

Le thermocycleur « CFX Connect Real Time PCR System » a été utilisé pour l'amplification du VHE par RT-PCR temps réel. Avant de lancer l'amplification, il était d'abord question de préparer le thermocycleur en entrant le plan de plaque et le programme d'amplification puis enregistrer ce programme. Après avoir placé la microplaque dans le thermocycleur, l'appareil a été fermé et l'amplification a été lancée en cliquant sur « Run ». A la fin de la manipulation, une validation était nécessaire avant l'interprétation des résultats. Ainsi, la manipulation était validée si :

- Les témoins négatifs n'avaient pas de courbe sigmoïdale ;
- Et si les contrôles positifs avaient une courbe sigmoïdale.

Les échantillons déclarés positifs étaient ceux dont la courbe était semblable à celle du contrôle positif. De même, les échantillons déclarés négatifs avaient une courbe identique à celle du contrôle négatif. Une courbe standard externe en série a été appliquée pour calculer la charge virale VHE en utilisant la souche standard OMS VHE (Gen Bank : M73218) fournie par Paul-Ehrlich-Institut (code 6329/10). La charge virale a été exprimée en copies / ml (Baylis *et al.*, 2013).

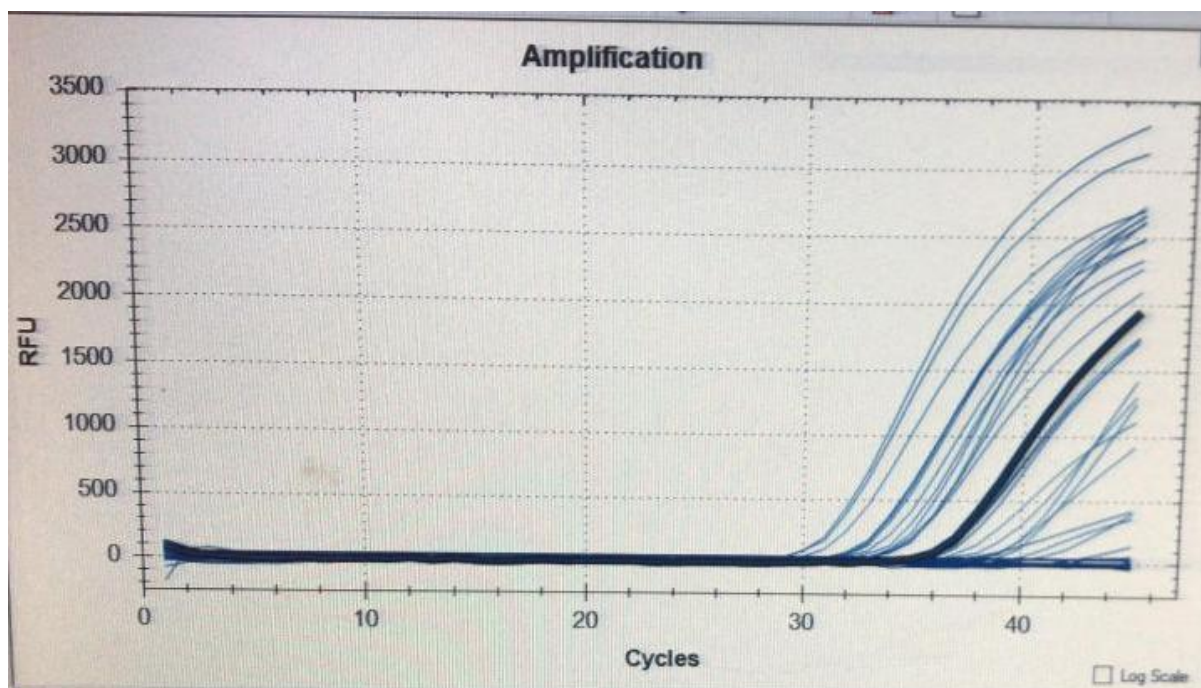


Figure 13 : Exemple de présentation des amplifications après RT-PCR temps réel.

II.3.4.2.2.3. Amplification de l'ARN du VHE chez les humains par RT-PCR nichée

Les échantillons positifs en RT-PCR temps réel ont été amplifiés pour les analyses phylogénétiques par la RT-PCR nichée selon la technique développée par Rivero-Juarez *et al.* (2017). Tous les échantillons des PNH étaient négatifs en RT-PCR temps réel et n'étaient donc pas analysés par RT-PCR nichée.

La RT-PCR a été réalisée en utilisant le système de RT-PCR en une seule étape avec QIAGEN One Step RT-PCR Kit et un couple d'amorces (Tableau 10).

Tableau X : Séquences des amorces utilisées au cours de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les humains

Noms	Séquences
HEV_5920S	5'-CAAGGHTGGCGYTCKGTTGAGAC-3'
HEV_6425A	5'-CCCTTRTCCTGCTGAGCRTTCTC-3'

La composition du mélange réactionnel utilisé pour l'amplification par RT-PCR nichée du VHE chez les humains est présentée dans le tableau 11.

Tableau XI : Composition du mélange réactionnel de la RT-PCR pour l'amplification du VHE chez les humains

Réactifs	Volume à pipeter (µL)	Concentration
Taq polymerase	N x 2	5 U / µL
Amorce HEV_5920S	N x 2,5	10 µM
Amorce HEV_6425A	N x 2,5	10 µM
Tampon PCR	N x 10	5X
dNTP	N x 2	10 mM
H ₂ O	N x 21	–

N = nombre total pour lequel on prépare le Mix. $N = n + 1$ si $n < 25$ ou $N = n + 2$ si $n > 25$. n étant le nombre d'échantillons à analyser.

Le thermocycleur « BioRad T100 Thermocycler » a été utilisé avec le programme d'amplification contenu dans le tableau 12.

Tableau XII : Programme d'amplification par RT-PCR du VHE chez les humains

Étapes	Températures	Durée	Nombre de cycle
Transcription reverse	50°C	30 minutes	1
Dénaturation	95°C	15 minutes	1
Dénaturation	94°C	1 minute	45
Hybridation	51°C	1 minute	45
Elongation	72° C	1 minute	45
Elongation finale	72°C	10 minutes	1
Conservation	4°C	∞	–

Le produit de la RT-PCR a ensuite été utilisé comme matrice pour la PCR nichée. Un volume de 2,5 µL du produit de la RT-PCR a été utilisé dans un volume réactionnel total de 50 µL contenant 25 µL d'une solution 2X pré-mélangé (Master Mix PCR) contenant la Taq

DNA Polymérase, les dNTP et le Tampon (Promega), 2,5 µL d'amorce sens, 2,5 µL d'amorce anti-sens 10 µM, et 17,5 µL d'eau (Tableau 13).

Tableau XIII : Composition de mélange réactionnel de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains

Réactifs	Volume à pipeter (µl)	Concentration
Master Mix	N x 25	2X
Amorce HEV_5930S	N x 2,5	10 µM
Amorce HEV_6334A	N x 2,5	10 µM
H ₂ O	N x 31	–
Produit de la première PCR	N x 2,5	–

N = nombre total pour lequel on prépare le Mix. $N = n + 1$ si $n < 25$ ou $N = n + 2$ si $n > 25$. n étant le nombre d'échantillons à analyser.

Le mélange réactionnel a ensuite été testé en utilisant le programme présenté dans le tableau 14. Les produits de la seconde PCR avaient une taille de 467 paires de bases (bp).

Tableau XIV : Programme d'amplification par PCR nichée du VHE chez les humains.

Etapes	Températures	Durée	Nombre de cycle
Activation de Taq polymerase	94°C	5 minutes	1
Dénaturation	94°C	1 minute	45
Hybridation	51°C	1 minute	45
Elongation	72°C	1 minute	45
Elongation final	72°C	5 minutes	1
Conservation	4°C	∞	–

Les séquences des amorces utilisées au cours de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains sont présentées dans le tableau 15.

Tableau XV : Séquences des amorces utilisées au cours de la PCR nichée pour l'amplification du VHE chez les humains.

Noms	Séquences
HEV_5930S	5'-GYTCKGTTGAGACCWCBGGBGT-3'
HEV_6334A	5'-TTMACWGTCRGGCTCGCCATTGGC-3'

II.3.4.3. Révélation des amplicons par électrophorèse sur le gel d'agarose

Pour toutes les PCR classiques effectuées, les produits d'amplification ont été révélés par électrophorèse sur un gel d'agarose.

II.3.4.3.1. Principe de la révélation sur gel d'agarose

La technique d'électrophorèse sur gel d'agarose est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. Les amplicons sont séparés en fonction de leur poids moléculaire sur un gel d'agarose. Le gel d'agarose forme un réseau de pores à travers lesquels les molécules d'ADN chargées négativement migrent dans un champ électrique du pôle négatif au pôle positif. L'effet « tamis » du gel d'agarose entraîne une migration différentielle des molécules en fonction de leurs tailles : les petites molécules migrent plus vite tandis que les molécules plus grandes sont freinées à travers les pores du gel. Le gel green contenu dans le gel d'agarose s'intercale entre les paires de base de la double hélice d'ADN. Ce dernier émet une fluorescence lorsqu'il est excité sur un transilluminateur UV qui permet la visualisation des bandes d'ADN. La séparation du marqueur de poids moléculaire sur le même gel et dans les mêmes conditions permet l'estimation de la taille de l'amplicon obtenu. Le produit d'amplification ayant la taille du produit attendu correspond au produit d'intérêt matérialisant l'amplification au cours des différentes PCR.

II.3.4.3.2. Mode opératoire de la révélation sur gel d'agarose

Pour la préparation de nos gels 1.5%, 4,5 g d'agarose (1,5 g pour le petit gel) ont été pesés et mélangés dans 300 ml (100 ml pour le petit gel) de tampon TBE (Tris-borates-EDTA) 1X. Le mélange a été porté en ébullition dans un four à micro-onde jusqu'à l'obtention d'un mélange clair. Après refroidissement, 10 µl de gel green ont été ajoutées au mélange qui est ensuite coulé dans un moule auquel ont été adaptés les peignes permettant d'obtenir les puits. Le gel solidifié a été transféré du moule dans le bac de migration contenant le tampon TBE.

Les produits à migrer ont été préparés en mélangeant 8 µl de produit de la PCR nichée avec 2 µl de tampon de migration et ont été introduits dans les puits identifiés respectivement. Le couvercle du bac de migration a été posé dessus et les deux bornes ont été connectées à un voltmètre. Les migrations ont été effectuées sous un voltage de 95V pendant 45 minutes.

Après la migration, les gels ont été transférés dans un transilluminateur UV auquel est incorporée une caméra. La photo du gel a été sauvegardée dans un ordinateur connecté au transilluminateur.

II.3.4.3.3. Purifications des produits de PCR

Avant le séquençage, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide des kits «QIAquick® PCR Purification» du fabricant QIAGEN. C'est un kit qui comporte un tampon de précipitation, un tampon d'élution, un tampon de lavage et les colonnes de chromatographie. Son principe est basé sur la rétention des fragments d'ADN sur les pores de la colonne de chromatographie. Un volume de 175 µl de tampon de précipitation a été ajouté à chaque produit à purifier. Le mélange a été ensuite transféré au dessus de la colonne de chromatographie portée à une centrifugation de 12000 tr/min pendant 2 minutes. La colonne a ensuite été lavée avec 450 µl de tampon de lavage et portée à centrifugation à 12000 tr/min pendant 1 minute. L'ADN ainsi purifié a été élué avec 30 µl de tampon d'élution.

II.3.4.4. Séquençage des produits d'amplification

Seuls les échantillons présentant des bandes à la taille attendue ont été envoyés pour séquençage. Le séquençage des produits de PCR a été effectué via la firme GENEWIZ connue sous le nom COGENICS de United Kingdom. Le séquençage automatique a été effectué à l'aide de l'équipement ABI PRISM 3140 en utilisant la méthode dite de terminaison des chaînes de Sanger grâce au kit « BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v 3.1 » développée par APPLIED BIOSYSTEMS.

Le séquençage est une méthode qui consiste à déterminer la succession des nucléotides sur l'ADN. Le principe développé par Sanger repose sur la propriété de l'ADN polymérase à incorporer à la fois les nucléotides (dNTPs) et les analogues des nucléotides notamment les 2',3'-dideoxynucleotides (ddNTPs) dans les chaînes d'ADN naissantes. Au cours de l'amplification de séquençage, lorsqu'un ddNTP est incorporé à l'extrémité 3' de la chaîne naissante, l'élongation de cette dernière s'achève sélectivement au niveau de A, C, G ou T. Cet arrêt de l'élongation est dû au fait que les ddNTPs ne possèdent pas le groupement 3'-OH. La trousse du kit «BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction v3.1 » utilise quatre marqueurs fluorescents permettant de marquer les ddNTPs. Les ddNTPs fluorescents sont additionnés aléatoirement à toutes les positions de la chaîne naissante à travers une réaction de séquençage cyclique. La séparation des produits de la réaction marqués par les quatre fluorochromes est également faite par électrophorèse et la collecte des données est faite immédiatement après le début de l'électrophorèse. La figure 14 ci-dessous présente le principe du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

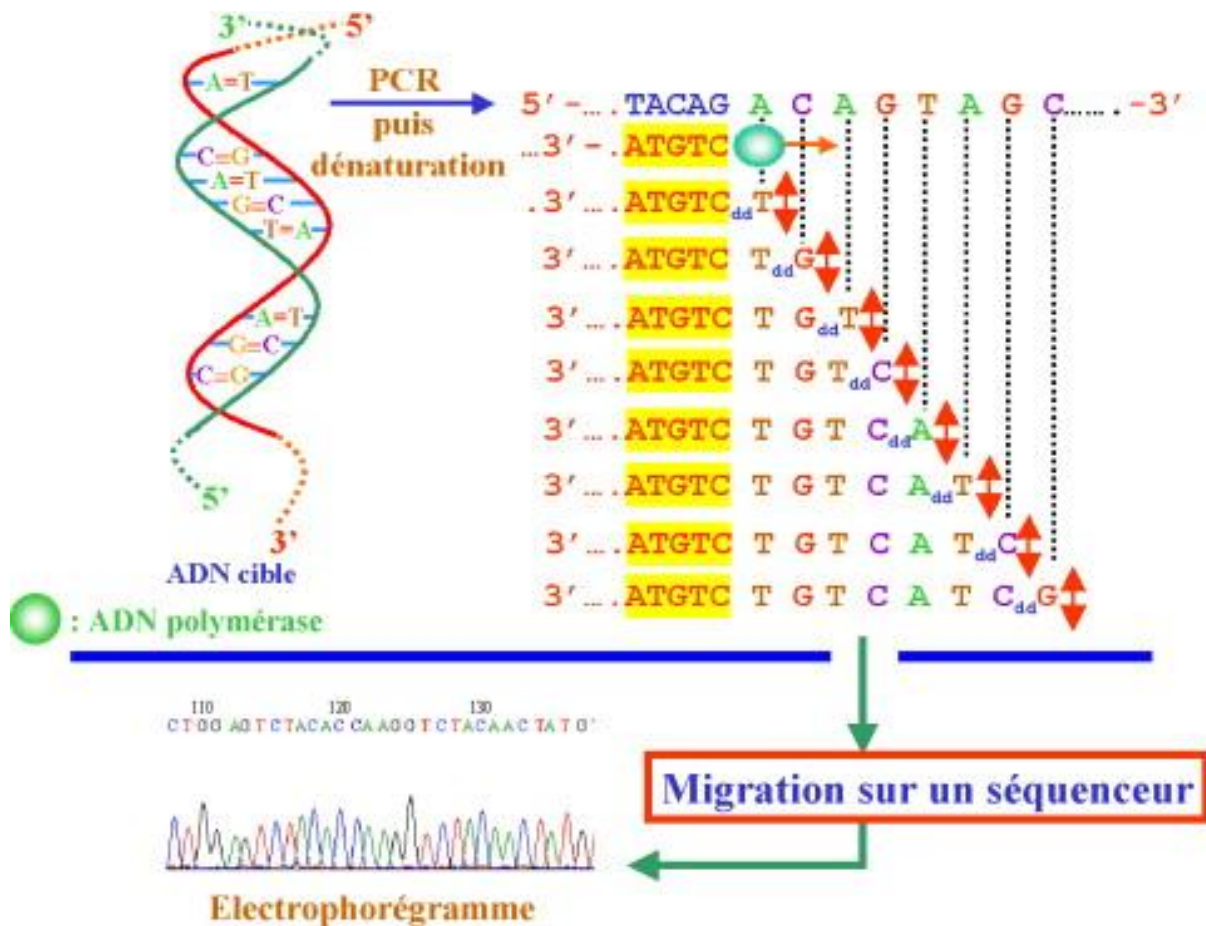


Figure 14 : Principe du séquençage selon la méthode de Sanger (Lamoril *et al.*, 2008).

II.3.4.5. Analyses phylogénétiques

La phylogénie moléculaire a pour but de comprendre l'histoire évolutive d'une famille de gènes par la comparaison des séquences dites homologues, c'est-à-dire qui ont dérivé par des divergences successives à partir d'une séquence ancestrale commune. Les progrès de la biologie moléculaire et des techniques statistiques ont largement contribué au développement de cette discipline. L'étude phylogénétique proprement dite comporte 4 étapes:

1. Mise en forme et alignement des séquences ;
2. Application d'une méthode de génération d'arbres ;
3. Evaluation statistique de la robustesse de la typologie obtenue ;
4. Lecture et manipulation des arbres.

II.3.4.5.1. Mise en forme et alignement

Les séquences générées par le séquenceur sous format texte ont été systématiquement vérifiées pour corriger les erreurs de lecture. Pour les amplicons séquencés dans les deux brins, les séquences consensus ont été éditées et exportées sous format FASTA à partir du logiciel CLC MainWorkbench 5.5.2 (CLC bio, Aarhus, Danemark). Les séquences ont été manipulées, de la correction aux alignements multiples grâce au logiciel CLC MainWorkbench 5.5.2 (CLC bio, Aarhus, Denmark). Les alignements multiples générés par le dit logiciel ont utilisé l'algorithme d'alignement multiple de Clustalx (Thompson *et al.*, 1997).

II.3.4.5.2. Application des méthodes de génération d'arbres

A partir des alignements multiples des séquences des souches étudiées et des souches de références, l'analyse phylogénétique est réalisée pour générer l'arbre phylogénétique décrivant l'histoire évolutive de ces séquences. Nous avons utilisé la méthode phénétique (méthode du plus proche voisin ou Neighbor-Joining en anglais) basée sur les distances génétiques.

II.3.4.5.3. Evaluation statistique de la robustesse de la typologie obtenue

Le « bootstrap » est un test d'évaluation statistique de la robustesse des typologies des arbres, par ré-échantillonnage au hasard et avec remise des données alignées. Afin d'obtenir une bonne évaluation, nous avons opté pour 1000 ré-échantillonnages (bootstrap). Le logiciel d'analyse phylogénétique génère à partir d'un jeu de séquences alignées, 1000 jeux « artificiels » de séquences alignées par tirages aléatoires avec remise des différentes colonnes de l'alignement original sont représentées plusieurs fois, tandis que d'autres ne sont pas présentes. On utilise ces 1000 jeux « artificiels » de données pour générer 1000 matrices de distances, puis 1000 arbres « artificiels ». A chaque nœud de l'arbre consensus est affecté un pourcentage qui correspond à la proportion des arbres « artificiels » présentant ce nœud : c'est la valeur de « bootstrap », qui mesure la robustesse interne des différents nœuds

observés. Le seuil considéré est généralement de 70%. C'est le seuil choisi dans les analyses faites au cours de cette étude.

II.3.4.5.4. Dessin, lecture et manipulation des arbres

Les séquences ont été éditées et assemblées avec CLC Main Workbench version 5.5. Les séquences de référence de VHE incluses dans l'analyse phylogénétique ont été obtenues à partir de GenBank. Les arbres phylogénétiques ont été générés par la version 6.0 de MEGA en utilisant une méthode d'assemblage voisin. Les arbres phylogénétiques ont été construits par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques ont été calculées par le modèle de Kimura 2 parameters. Le nombre de répliques bootstrap a été fixé à 1 000 et seules les valeurs de bootstrap > 70 ont été marquées sur les principales branches d'arbre. Les souches de référence de GenBank sont incluses et pour chacune d'elle, le numéro d'accession, le pays d'origine, l'hôte et le génotype sont indiqués.

II.3.4.5.5. Dépôt des séquences dans les banques de données

Les séquences nucléotidiques du génome des VHE, déterminées au cours de cette étude ont été déposées dans la banque de données GenBank (National Center of Biotechnology Information : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>).

II.3.5. Evaluation de la possibilité de transmission inter-espèces du VHE entre les humains et les animaux au Cameroun

II.3.5.1. Sélection des échantillons

Les échantillons avec des séquences exploitables ont été sélectionnés pour l'évaluation de la transmission inter-espèce du VHE entre les animaux et les humains au Cameroun.

II.3.5.2. Mode opératoire

L'évaluation de la possibilité de transmission inter-espèce du VHE a été faite en mettant ensemble et en comparant sur un même arbre phylogénétique, les séquences nucléotidiques du VHE obtenues chez les porcs et celles obtenues chez les humains dans notre étude et d'autres études à travers le monde à l'aide du logiciel MEGA.

II.3.6. Analyses statistiques des données obtenues

Nous avons utilisé les logiciels Excel 2010 et SPSS pour enregistrer et analyser les données. Le test de Chi deux a été utilisé pour comparer les prévalences avec un seuil de signification de 0,05.

CHAPITRE III : RESULTATS

III.1. Séroprévalence du VHE chez les humains, les primates non humains et les porcs

III.1.1. Séroprévalence du VHE chez les humains

Un total de 903 échantillons incluant 450 personnes âgées, 183 femmes enceintes et 270 personnes vivant avec le VIH, a été analysé dans le cadre de cette étude pour la recherche des anticorps IgG et IgM anti-VHE. Parmi ces échantillons, 283 (31,3%; IC95%: 28,4% - 34,4%) étaient positifs pour au moins l'un des anticorps anti-VHE avec 22,0% (199/903) positifs en IgM anti-VHE seule, 5,8% (52/903) positifs en IgG anti-VHE seule et 3,5% (32/903) positifs aux deux anticorps simultanément.

Chez les personnes vivant avec le VIH, 17,8% (48/270) étaient positives à au moins l'un des anticorps anti-VHE (Tableau 16). Parmi ceux-ci, 7,0% (19/270) étaient positifs en IgM anti-VHE, 8,5% (23/270) en IgG anti-VHE et 2,2% (6/270) aux deux marqueurs simultanément (Tableau 16). Cette prévalence en IgM et IgG anti-VHE ne montre pas de différences statistiquement significatives selon le sexe, l'âge et le taux de CD4 ($P > .05$) (Tableau 17).

Chez les femmes enceintes, 18,0% (33/183) étaient positives à au moins l'un des marqueurs sérologiques de l'infection par le VHE. Les IgM et IgG anti-VHE étaient détectées respectivement chez 13,1% (24/183) et 3,3% (6/183) des échantillons analysés avec et 1,6% (3/183) des cas de co-détection (Tableau 16). Cette prévalence en IgM et IgG anti-VHE ne montre aucune différence statistiquement significative selon l'âge ($P > 0,05$) (Tableau 17).

Chez les personnes âgées, 45,0% (202/450) étaient positives à au moins l'un des anticorps dirigés contre le VHE. Les IgM et IgG anti-VHE étaient présentes dans 34,7% (156/450), 5,1% (23/450), respectivement. On observe 5,1% (23/450) de détection simultanée de ces deux marqueurs (Tableau 16). La séroprévalence des IgM et IgG anti-VHE ne montre pas de différences statistiquement significatives selon le sexe et l'âge ($P > 0,05$) (Tableau 17). Concernant les facteurs de risque alimentaires, aucun n'était significativement associé à une infection par le VHE dans toutes les populations étudiées ($P > 0,05$). Le tableau 17 résume la séroprévalence des anticorps IgG et IgM anti-VHE et les facteurs de risque chez les patients infectés par le VIH, les femmes enceintes et les personnes âgées inclus dans cette étude.

Tableau XVI : Résultats de la détection des anticorps anti-VHE dans 3 groupes de personnes à risque étudiées

Groupe de personnes testées				
Type d'anticorps recherchés	Personnes âgées (%)	Femmes enceintes (%)	Personnes vivant avec le VIH (%)	Total N (%)
IgM et/ou IgG positifs	202 (44,9)	33 (18,0)	48 (17,8)	283 (31,3)
IgM positifs et IgG négatifs	156 (34,7)	24 (13,1)	19 (7,0)	199 (22,0)
IgG positifs et IgM négatifs	23 (5,1)	6 (3,3)	23 (8,5)	52 (5,8)
IgM et IgG positifs	23 (5,1)	3 (1,6)	6 (2,2)	32 (3,5)
IgM et IgG négatives	248 (55,1)	150 (82,0)	222 (82,2)	620 (68,7)
Total	450	183	270	903

Tableau XVII : Séroprévalence du VHE, caractéristiques démographiques et alimentaires au sein des personnes à risque.

Caractéristiques	Types d'anticorps recherchés					
	IgM anti-VHE		IgG anti-VHE		IgM et IgG anti-VHE	
	Prévalence n/N (%)	Valeur-p	Prévalence n/N (%)	Valeur-p	Prévalence n/N (%)	valeur-p
Patients infectés par le VIH						
Sexe						
M	2/88 (2.3)		5/88 (5.7)		2/88 (2.3)	
F	17/182 (9.3)	0.6	18/182 (10.0)	0.3	4/182 (2.2)	0.9
Age						
20-29	4/68 (5.9)		5/68 (7.3)		1/68 (1.5)	
30-39	6/92 (6.5)		7/92 (7.6)		2/92 (2.2)	
40-49	3/69 (4.3)	0.1	6/69 (8.7)	0.1	2/69 (2.9)	0.3
≥50	6/41 (14.6)		5/41 (12.2)		1/41 (2.4)	
Taux CD4						
<200	4/33 (12.3)		4/33 (12.3)		2/33 (6.1)	
≥200	3/56 (5.4)	0.4	9/56 (16.1)	0.2	4/56 (7.1)	1.0
Données absentes	12/181 (6.6)		6/181 (3.3)		13/181 (7.2)	
Consommation de viande de porc						
Oui	15/161 (9.5)		15/161 (9.3)		5/161 (3.1)	
Non	3/20 (15.0)	0.3	1/20 (5.0)	0.5	1/20 (5)	0.1
Données absentes	1/89 (1.1)		3/89 (3.4)		13/89 (14.6)	
Consommation de l'eau du puits						

Oui	11/83 (13.3)			10/83 (12.1)			3/83 (3.6)		
Non	8/98 (8.1)	0.2		6/98 (6.1)	0.1		3/98 (3.2)	0.2	
Données absentes	0/89 (0.0)			3/89 (3.4)			13/89 (14.6)		
Nettoyage des mains après les toilettes									
Oui	10/106 (9.4)			6/106 (5.7)			4/106 (3.8)		
Non	9/75 (12)	0.07		10/75 (13.3)	0.1		2/75 (2.7)	0.7	
Données absentes	0/89 (0.0)			3/89 (13.3)			13/89 (14.6)		
Total	19/270 (7.0)			23/270 (8.5)			6/270 (2.2)		
Femmes enceintes									
Age									
≤20	4/25	16		1/25	4		1/25	4.0	
21-30	13/121	10.7	0.3	3/121	3.3	0.5	1/121	0.8	0.9
>30	7/37	18.9		2/37	5.4		1/37	2.7	
Consommation de la viande du porc									
Oui	14/130	10.8		4/130	3.1		2/130	1.5	
Non	10/53	18.9	0.1	2/53	3.8	0.9	1/53	1.9	1.0
Consommation de l'eau du puits									
Oui	11/78	14.1		2/78	2.5		1/78	1.3	
Non	13/105	12.4	1.0	4/105	3.8	1.0	2/105	1.9	0.4
Consommation de crudités									
Oui	8/56	14.3		2/56	3.6		1/56	1.8	
Non	16/127	12.6	0.9	4/127	3.2	1.0	2/127	1.6	1.0
Contact ou élevage porcin									
Oui	10/57	17.5		2/57	3.5		2/57	3.5	
Non	14/126	11.1	0.3	4/126	3.2	1.0	1/126	0.8	0.9
Lavage des mains avant la manipulation des aliments									
Oui	14/93	15.1		4/93	4.3		1/93	1.1	
Non	10/90	11.1	0.7	2/90	3.3	0.5	2/90	2.2	0.7
Total	24/183	13.1		6/183	3.3		3/183	1.6	
Personnes âgées									
Sexe									
M	64/177 (36.2)			22/177 (12.4)			12/177 (6.8)		
F	92/273 (33.7)	0.3		24/273 (8.8)	0.8		11/273 (4.0)	0.1	
Age									
60-69	81 /221 (36.6)			11/221 (5.0)			9/221 (4.1)		
70-79	56/168 (33.3)	0.7		10/168 (6.0)	0.2		12/168 (7.1)	0.2	
≥80	19/61 (31.2)			2/61 (3.3)			2/61 (3.3)		
Total	156/450 (34.7)			23/450 (5.1)			23/450 (4.9)		

Abréviations: IgG: Immunoglobuline G, IgM: Immunoglobuline M, M: Homme, F: Femme, n: Nombre des positifs, N: Nombre testé.

III.1.2. Séroprévalence du VHE chez les porcs

Dans le cadre de la présente étude, 615 échantillons de sérum de porcs ont été collectés et analysés pour la recherche des anticorps IgG et IgM anti-VHE. Au total, 286 (46,5% ; IC 95% : 42,6% - 50,5%) étaient positifs pour au moins l'un des marqueurs sérologiques de l'infection par le VHE (IgM et / ou IgG). Parmi ceux-ci, 25,2% (155/615) étaient positifs pour les IgM anti-VHE, 14,1% (86/615) pour les IgG anti-VHE et 7,3% (45/615) pour les deux. Les résultats des analyses sérologiques réalisées chez les porcs sont résumés dans le tableau 18.

Parmi les porcs collectés à Yaoundé, 58,1% (176/303) étaient positifs pour au moins un marqueur sérologique anti-VHE avec 25,1% (76/303) de positivité en IgM anti-VHE uniquement, 20,5% (62/303) en IgG anti-VHE uniquement et 12,5% (38/303) aux deux marqueurs à la fois. A Douala, 25,5% (26/102) des échantillons étaient positifs pour au moins un marqueur sérologique. Parmi ceux-ci, le pourcentage de positivité était de 4,9% (5/102) en IgM anti-VHE uniquement, 17,6% (18/102) en IgG anti-VHE uniquement et 2,9% (3/102) aux deux marqueurs à la fois. A Obala, 29,2% (14/48) échantillons étaient positifs en IgM anti-VHE mais aucun échantillon n'était positif en IgG anti-VHE. A Bafoussam, 35,9% (28/78) des porcs prélevés étaient positifs à au moins un marqueur sérologique anti-VHE avec 26,9% (21/78) de positivité en IgM anti-VHE uniquement, 3,8% (3/78) en IgG anti-VHE uniquement et 5,1% (4/78) aux deux marqueurs anti-VHE à la fois. A Garoua, 50% (42/84) des porcs prélevés étaient positifs à au moins un marqueur sérologique anti-VHE. Parmi ceux-ci, 46,4% (39/84) étaient positifs en IgM anti-VHE, 3,6% (3/84) en IgG anti-VHE et aucun échantillon n'était positif aux deux marqueurs à la fois (Tableau 18).

Les prévalences en IgM et IgG anti-VHE en fonction de l'année de prélèvement et des villes de prélèvement, avaient montré des différences statistiquement significatives ($P > 0,05$) (Tableau 19). Par contre, aucune différence significative n'a été trouvée entre les prévalences des anticorps anti-VHE en fonction du sexe et de l'âge des porcs collectés ($P > 0,05$) (Tableau 19).

Tableau XVIII : Séroprévalences du VHE chez les porcs

Type d'anticorps recherchés	Sites de prélèvement et séroprévalences					Total N (%)
	Yaoundé n (%)	Douala n (%)	Obala n (%)	Garoua n (%)	Bafoussam n (%)	
IgM et/ou IgG positifs	176 (58,1)	26 (25,5)	14 (29,2)	42 (50)	28 (35,9)	286 (46,5)
IgM positif et IgG négatif	76 (25,1)	5 (4,9)	14 (29,2)	39(46,4)	21 (26,9)	155 (25,2)
IgG positif et IgM négatif	62 (20,5)	18 (17,6)	0	3 (3,6)	3 (3,8)	86 (14,1)
IgM et IgG positives	38 (12,5)	3 (2,9)	0	0	4 (5,1)	45 (7,3)
IgM et IgG negatives	127 (41,9)	76 (74,5)	34 (70,8)	42 (50)	50 (64,1)	329 (53,5)
Total	303	102	48	84	78	615

Abréviations : IgG: Immunoglobuline G, IgM: Immunoglobuline M, VHE: Virus de l'hépatite E

Tableau XIX : Séroprévalence du VHE en fonction de l'âge, le sexe, la ville et l'année de prélèvement.

Caractéristiques	Nombre de porcs testés	Types d'anticorps recherchés, séroprévalences et valeur-P					
		IgG positifs, n (%)	Valeur-p	IgM positifs, n (%)	Valeur-p	IgG et IgM positifs, n (%)	Valeur-p
Ages							
<6 mois	163	20 (12,3)		61 (37,4)		9 (5,5)	
>6 mois	452	66 (14,6)	0.3	94 (20,8)	0.1	36 (8,0)	0.4
Années							
2012	162	6 (3,7)		60 (37,0)		4 (2,5)	
2017	150	18 (12,0)	0.02	19 (12,7)	0.001	3 (2,0)	<0.006
2018	303	62 (35,2)		76 (25,1)		38 (12,5)	
Sexes							
Male	267	36 (13,5)		81 (30,3)		13 (4,9)	
Femelle	348	50 (14,4)	0.9	74 (21,3)	0.4	32 (9,2)	0.2
Villes							
Douala	102	18 (17,6)		5 (4,9)		3 (2,9)	
Yaounde	303	62 (20,5)		76 (25,1)		38 (12,5)	
Obala	48	0	0.003	14 (29,2)	<0.001	0	0.001
Garoua	84	3 (3,6)		39 (46,4)		0	
Bafoussam	78	3 (3,8)		21 (26,9)		4 (5,1)	

Abréviations : IgG: Immunoglobuline G, IgM: Immunoglobuline M, VHE: Virus de l'hépatite E

III.1.3. Séroprévalence du VHE chez les primates non humains

Dans cette étude, 172 échantillons des primates non humains collectés entre 1997 et 2006 appartenant à deux familles et à 15 espèces, ont été sélectionnés et analysés pour la recherche des anticorps anti-VHE. Au total, 5,2% (9/172 échantillons étaient positifs pour les anticorps IgG anti-VHE, tandis que 2,3% (4/172) étaient positifs pour les IgM anti-VHE (4/172). Les Hominidae avaient une prévalence plus élevée d'IgG anti-VHE (6/81) tandis que les Cercopithecidae avaient plutôt une prévalence plus élevée en anticorps IgM (3/91).

Les anticorps IgG anti-VHE ont été détectés dans 1 des 9 (11,1%) *mandrillus sphinx*, 2 des 14 (14,3%) *Gorilla gorilla*, 4 des 67 (5,9%) *Pan troglodytes* et 2 des 23 (8,7%) *Mandrillus leucophaeus*, respectivement. Les anticorps IgM anti-VHE ont été détectés chez 1 des 18 (5,5%) *Papio anubis*, 2 des 7 *Cercocebus agilis* (28,6%) et 1 des 67 (1,5%) *Pan troglodytes*, respectivement. Nous n'avons pas trouvé de PNH avec à la fois des anticorps IgG et IgM anti-VHE. Le tableau 20 montre la séroprévalence du VHE dans les différentes espèces de PNH.

Tableau XX : Séroprévalence du VHE dans diverses espèces de PNH

Noms communs des espèces testées	Noms scientifiques des espèces testées	Type d'anticorps et prévalences	
		IgG anti-VHE n/N (%)	IgM anti-VHE n/N (%)
Grands singes	Hominidae		
Chimpanzé	<i>Pan troglodytes</i>	4/67 (5.9)	1/67 (1.5)
Gorille	<i>Gorilla gorilla</i>	2/14 (14.8)	0/14
Petits singes	Cercopithecidae		
Drill	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	2/23 (8.7)	0/23
Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	1/9 (11.1)	0/9
Babouin vert	<i>Papio Anubis</i>	0/18	1/18 (5.5)
Singe rouge	<i>Erythrocebus patas</i>	0/4	0/4
Cercopithèque de Brazza	<i>Cercopithecus neglectus</i>	0/2	0/2
Moustacs à Oreilles rouses	<i>Cercopithecus erythrotis</i>	0/4	0/4
Hocheur	<i>Cercopithecus nictitans</i>	0/8	0/8
Cercopithèque mona	<i>Cercopithecus mona</i>	0/4	0/4
Cercopithèque tantale	<i>Cercopithecus aethiops</i>	0/2	0/2
Moustacs	<i>Cercopithecus cephus</i>	0/2	0/2
Mangabay bonnet rouge	<i>Cercocebus torquatus</i>	0/7	0/7
Cercocebe agile	<i>Cercocebus agilis</i>	0/7	2/7 (28.6)
Colobe noir	<i>Colobus satanus</i>	0/1	0/1
Total		9/172 (5.2)	4/172 (2.3)

Abréviations: n: nombre d'échantillons positifs; N: nombre d'échantillons testé; %: prévalence.

III.2. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les humains et les animaux

III.2.1. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les porcs

L'ARN a été détecté sur 8 des 136 (5,9%) échantillons des selles des porcs analysés par RT-PCR nichée. Aucun échantillon de sérum n'était positif en biologie moléculaire. Tous les échantillons positifs provenaient d'échantillons de selles prélevés sur des porcs à Yaoundé. Les séquences nucléotidiques des souches de VHE isolées chez les porcs dans cette étude ont été déposées dans GenBank avec les numéros d'accès suivants : MN723545, MN723546, MN723547, MN723548, MN723549, MN723550, MN723551 et MN723552. Les analyses phylogénétiques des 8 isolats du VHE porcine avaient montré que ces 8 souches du Cameroun appartenaient au génotype 3 et étaient regroupées avec des souches de VHE humaines, caprines, ovines et porcines de différentes régions géographiques du monde, en particulier avec les souches porcines du Canada et des États-Unis et des souches de VHE des isolées dans les eaux usées en Argentine (Figure 16).

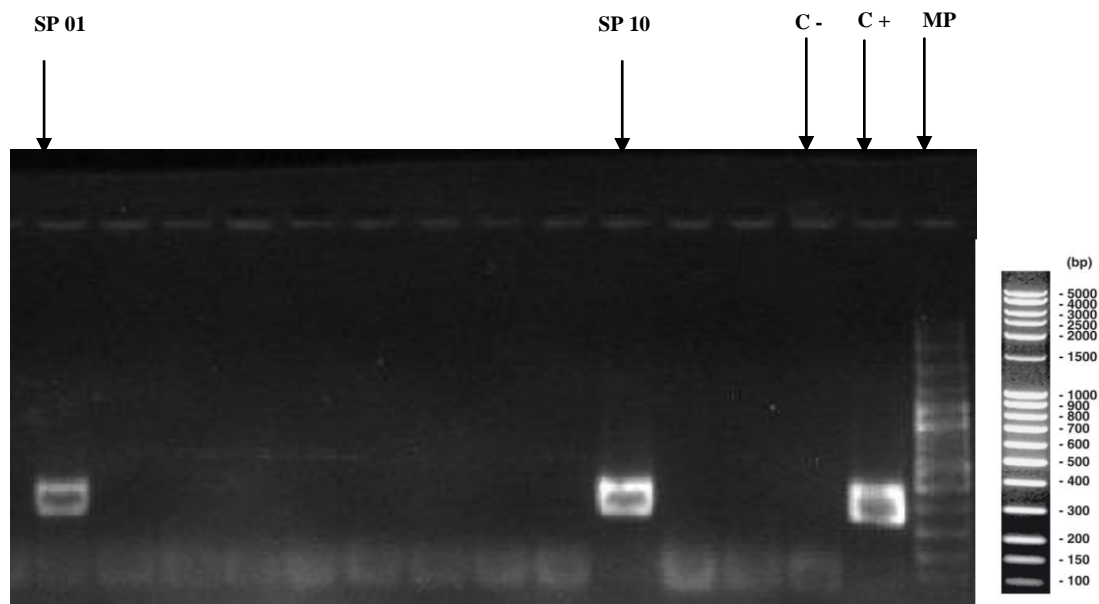


Figure 15 : Gel après amplification par RT-PCR nichée d'un fragment de 348 pb de l'ORF2.

Abréviations : MP : marqueur de poids moléculaire (100bp) ; C + : Contrôle positif ; C - : Contrôle négatif

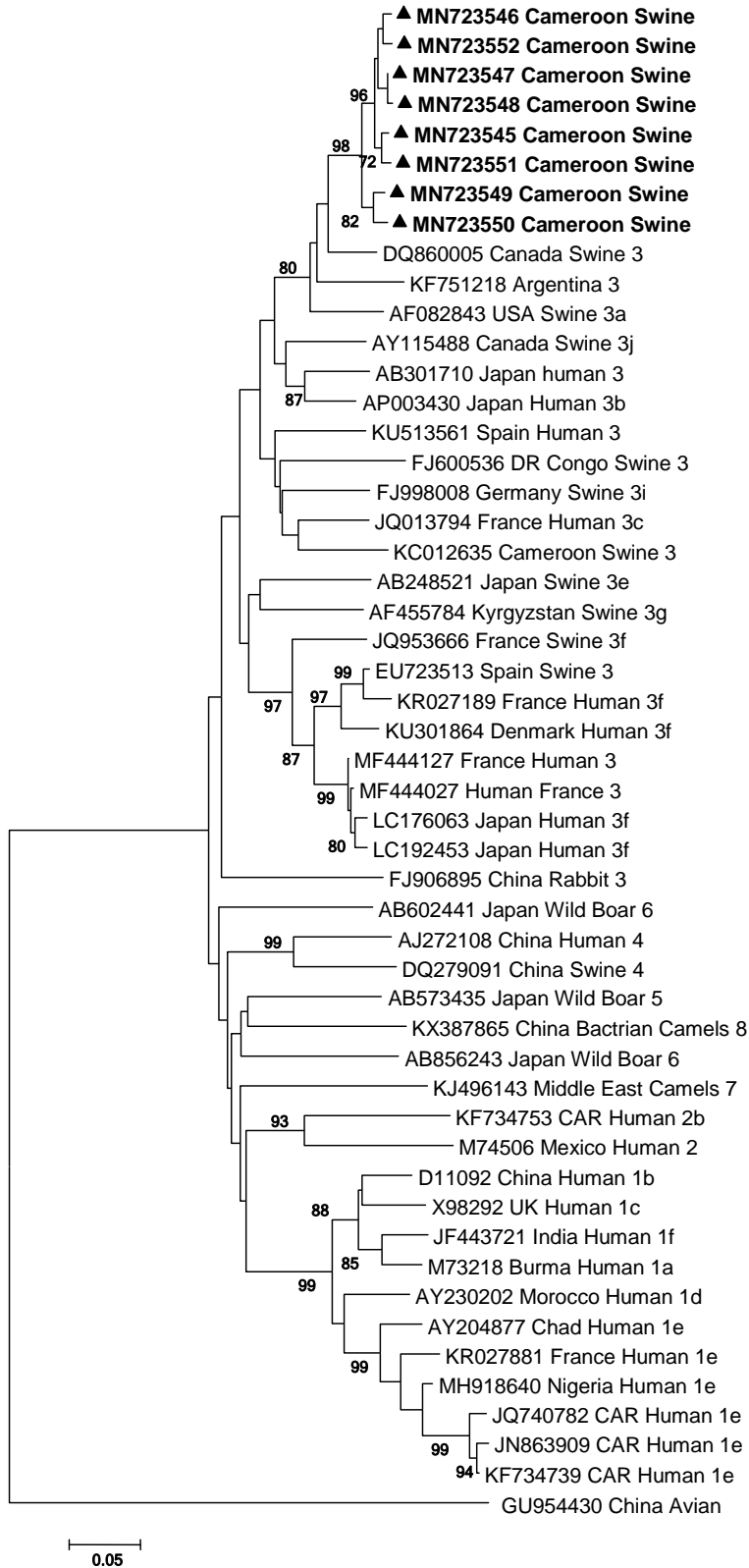


Figure 16 : Arbre phylogénétique des séquences du VHE identifiées chez les porcs basé sur un fragment de la région ORF2.

L'arbre a été généré en utilisant la méthode du « plus proche voisin ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura 2 parameters. Seules les valeurs de Bootstrap > 70 ont été présentées. Les souches de référence de GenBank sont incluses et pour chacune d'elle, le numéro d'accèsion, le pays d'origine, l'hôte et le génotype sont indiqués. Les souches identifiées dans cette étude sont indiquées en gras et représentées par les triangles (▲).

III.2.2. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les primates non humains au Cameroun

Dans le souci de détecter l'ARN du VHE chez les primates non humains, non seulement les échantillons positifs aux anticorps anti-VHE ont été analysés, mais également ceux négatifs. Sur les 172 séra des primates non humains analysés en biologie moléculaire aussi bien par le protocole utilisé au laboratoire de virologie du CPC que celui disponible au l'IMIBIC, aucun échantillon n'était positif.

III.2.3. Détection moléculaire de l'ARN du VHE chez les humains au Cameroun

Au total, 115 échantillons humains positifs aux IgM anti-VHE avaient été utilisés pour la caractérisation moléculaire. Ces échantillons comprenaient 24 des personnes suspectées de fièvre jaune, 19 des personnes vivant avec le VIH, 48 des personnes âgées et 24 des femmes enceintes. L'ARN du VHE a été quantifié par RT-PCR temps réel dans 22 échantillons, soit une fréquence de détection d'ARN par RT-PCR temps réel de 19,1% (22/115) avec un IC 95% : 13-27,3%. Ces 22 échantillons positifs en RT-PCR temps réel, comprenaient 1 échantillon des personnes vivant avec le VIH, 1 échantillon des personnes âgées de plus de 60ans et 20 échantillons des personnes suspectées de fièvre jaune (Tableau 21). Aucun échantillon des femmes enceintes n'avait amplifié. La caractérisation génétique de ces 22 échantillons positifs en RT-PCR temps réel par la RT-PCR nichée avait donné 12 positifs appartenant tous aux personnes suspectées de fièvre jaune. Après séquençage, les analyses phylogénétiques des séquences obtenues avec d'autres souches isolées de part le monde et contenues dans GenBank, avaient permis d'identifier 2 génotypes : Le génotype 1 (Sous-type 1e) pour 10 échantillons et le génotype 3 (Sous-type 3f) pour 2 échantillons (Figure 17). Ces séquences ont été déposées dans GenBank avec les numéros d'accès

suivants : MT250069, MT250070, MT250071, MT250072, MT250079, MT250080, MT250073, MT250074, MT250075, MT250076, MT250077, MT250078.

Tableau XXI : Résultats des RT-PCR temps réel et nichée des échantillons humains

N°	Age (Année)	Sexe	Symptômes	Site de collecte	Statut VIH	Génotype	Ct	Copies/ mL
1	18	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	31,3	241930
2	45	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	33,02	83914
3	47	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	35,16	22470
4	16	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	29,94	558890
5	26	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	32,96	87060
6	32	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	36,44	10220
7	30	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	33,08	80860
8	44	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	3f	38,74	2480
9	25	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	35,21	21790
10	31	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	3f	33,11	79380
11	16	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	35,34	20110
12	19	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	31,65	195030
13	27	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	37,67	4790
14	29	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	31,98	159170
15	49	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	31,21	255710
16	38	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	29,24	859990
17	50	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	35,62	16630
18	21	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	/	31,07	278730
19	44	M	–	Yaoundé/Centre	Positif	/	38,22	3420
20	102	M	–	Ebolowa/Sud	Négatif	/	37,34	5870
21	34	F	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	29,12	925930
22	22	M	jaunisse et fièvre	Touboro/Nord	/	1e	32,41	122150

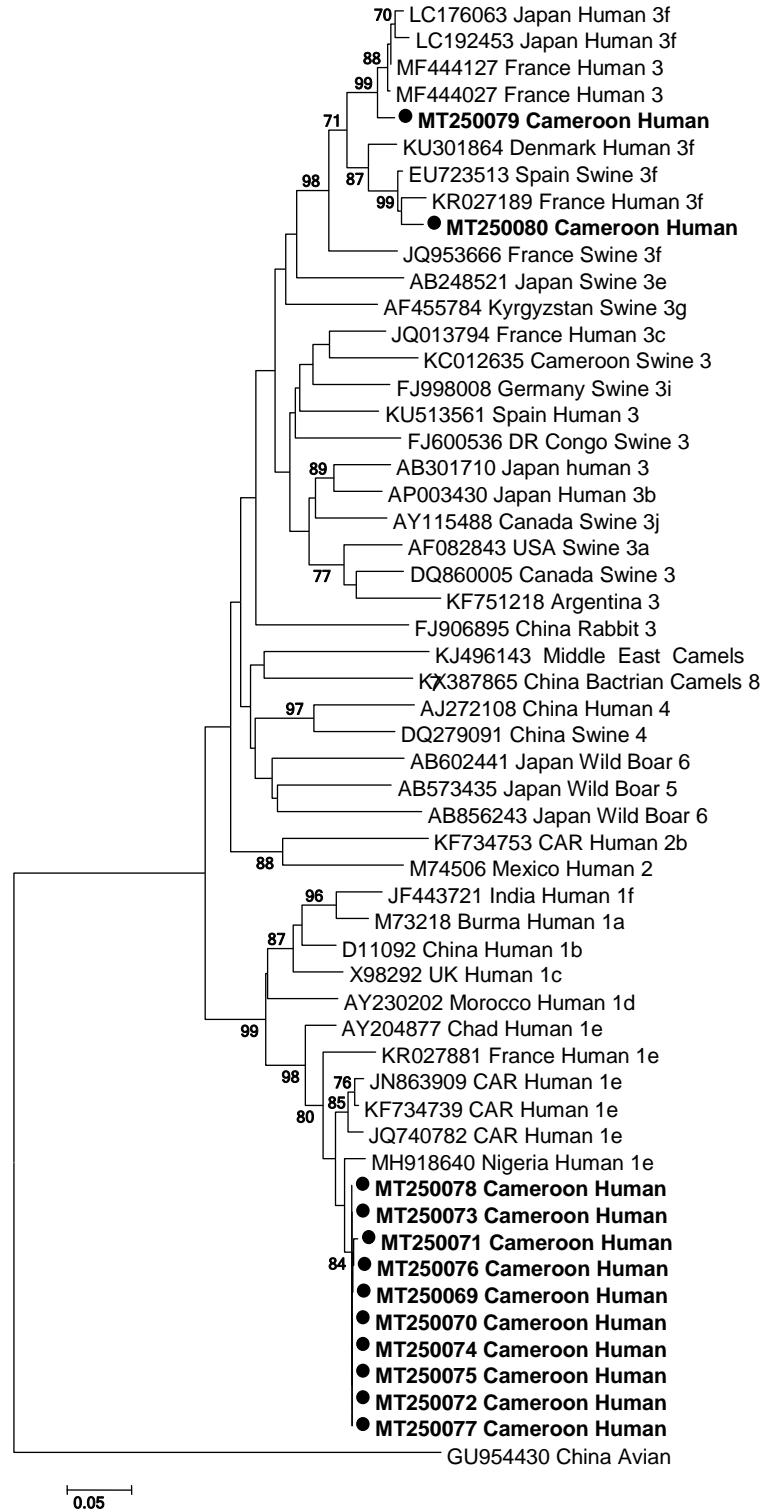


Figure 17 : Arbre phylogénétique des séquences du VHE identifiées chez les humains basé sur un fragment de l'ORF2.

L'arbre a été généré en utilisant la méthode du « plus proche voisin ». Les distances génétiques ont été calculées en utilisant la méthode Kimura 2 parameters. Seules les valeurs

de Bootstrap > 70 ont été présentées. Les souches de référence de GenBank sont incluses et pour chacune d'elle, le numéro d'accession, le pays d'origine, l'hôte et le génotype sont indiqués. Les souches identifiées dans notre étude chez les humains sont en gras et représentées par les cercles (●).

III.3. Etude de la possibilité de transmission inter-espèces du VHE entre les humains et les animaux au Cameroun

Il ressort des analyses phylogénétiques réalisées que nos séquences matchent avec diverses séquences détectées à travers le monde et forment avec celles-ci trois clusters. Les huit génotypes identifiés chez les porcs appartiennent à un même cluster que les génotypes 3 identifiés chez les porcs et les humains dans les pays développés tels que le Canada, le Japon, les USA, l'Allemagne et l'Espagne (Figure 18). Les douze génotypes identifiés chez les humains forment deux clusters. Le premier cluster est constitué par dix génotypes 1, sous-types 1e et le deuxième cluster par deux génotypes 3, sous-types 3f (Figure 18). Les analyses phylogénétiques montrent que les deux génotypes 3 identifiés chez les humains et les 8 génotypes 3 identifiés chez les porcs matchent avec les séquences de VHE identifiées chez les humains et les porcs dans les pays développés où la transmission zoonotique du VHE est fréquemment rapportée et où elle est la principale voie de transmission du VHE (Figure 18). Cette similitude ou ce rapprochement entre les séquences du VHE détectées chez les porcs et les humains dans notre étude et les séquences du VHE responsables de la transmission zoonotique dans les pays développés laissent penser à une possibilité de transmission inter-espèces du VHE au Cameroun.

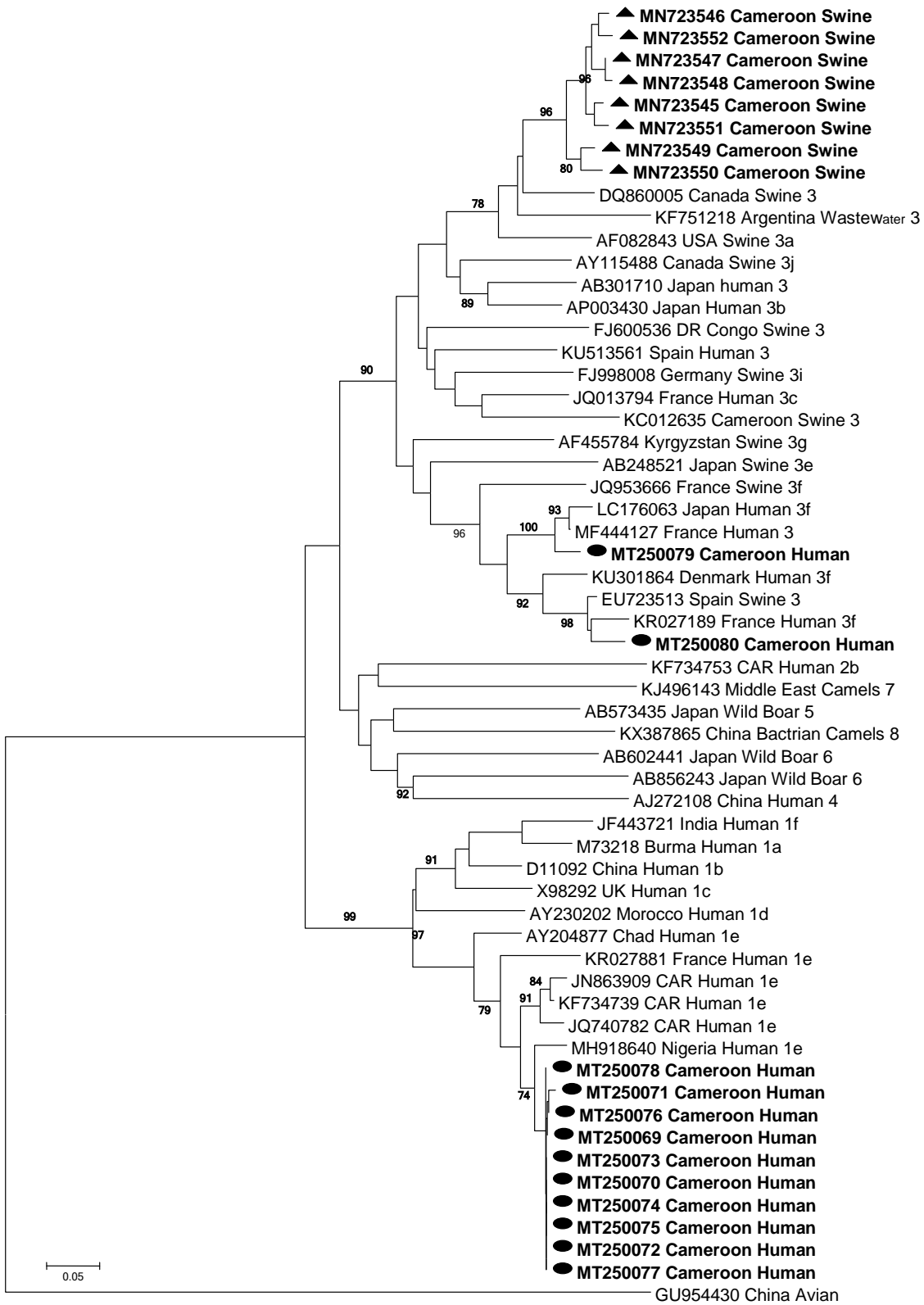


Figure 18 : Arbre phylogénétique des séquences du VHE identifiées chez les humains et les porcs basé sur un fragment de l'ORF2.

Cet arbre phylogénétique a été construit par la méthode du plus proche voisin et les distances génétiques ont été calculées par le modèle de Kimura 2 parameters. Seules les valeurs de Bootstrap > 70 ont été présentées. Les souches de référence de GenBank sont incluses et pour chacune d'elle, le numéro d'accession, le pays d'origine, l'hôte et le génotype sont indiqués. Les souches identifiées dans notre étude chez les humains sont en gras et représentées par les cercles (●) tandis que celles détectées chez les porcs sont représentées par les triangles (▲).

CHAPITRE IV : DISCUSSION

L'objectif général de la présente étude était de mieux documenter l'épidémiologie de l'infection par le VHE au Cameroun. Plus spécifiquement, il était question de : i) déterminer la séroprévalence du VHE d'une part chez les personnes à risque de développer les formes graves de l'infection par le VHE que sont les femmes enceintes, les personnes âgées et les personnes vivant avec le VIH, d'autre part chez les primates non humains et les porcs du Cameroun; ii) caractériser génétiquement les souches de VHE qui circulent dans les populations humaine et animale du Cameroun; et enfin iii) évaluer la possibilité de transmission inter-espèces du VHE entre ces deux populations.

Le VHE est endémique dans la population humaine étudiée. En effet, la séroprévalence globale du VHE au sein des personnes à risque de développer les formes graves de l'infection par le VHE était de 31,3%. Cette séroprévalence est supérieure à celle de 14,2% rapportée par une étude antérieure au sein des personnes vivant avec le VIH dans la région du Nord-Ouest mais inférieure à celle de 94,6% rapportée chez les personnes suspectées de fièvre jaune dans la région du Nord (Demanou *et al.*, 2013 ; Feldt *et al.*, 2013). Toutes ces données indiquent que le Cameroun appartiendrait à une zone de forte endémicité selon la classification de Ruggeri *et al.*, (2013). Des fortes séroprévalences globales ont aussi été rapportées dans beaucoup d'études africaines confirmant ainsi l'hyper-endémicité de VHE dans certains pays de ce continent (Kim *et al.*, 2014). Chez les femmes enceintes et les patients infectés par le VIH, la séropositivité aux IgM anti-VHE (13,1% pour les femmes enceintes et 7,0% des patients infectés par le VIH) était relativement faible par rapport à celle (34,7%) trouvée chez les personnes âgées. Par contre, pour tous les trois groupes, les prévalences en IgG anti-VHE étaient relativement faibles (3,3% pour les femmes enceintes, 8,5% pour les patients infectés par le VIH et 5,1% de la population âgée). Les études publiées au Nigeria et en République Centrafricaine montrent des prévalences des IgM anti-VHE chez les PVVIH inférieure au Nigéria (1,3%) et similaire en République Centrafricaine (7,5%) à celle trouvée dans la présente étude (7,0%) (Demi Sibiro *et al.*, 2018 ; Junaid *et al.*, 2014). Par contre, les prévalences en IgG anti-VHE trouvées dans ces études chez les PVVIH (30% pour le Nigeria et 68% pour la RCA) sont supérieures à celle de 8,5% trouvée dans la présente étude (Demi Sibiro *et al.*, 2018 ; Junaid *et al.*, 2014). Au Cameroun, une étude menée chez les PVVIH à Bamenda (région du Nord-Ouest) présente une prévalence en IgG anti-VHE élevée (11,1%) que celle trouvée dans la présente étude (8,5%) et une prévalence

en IgM anti-VHE plus faible (0%) que celle trouvée dans notre travail (7,0%) (Feldt *et al.*, 2013). Chez les femmes enceintes, la positivité des IgM anti-VHE de 13,1% obtenue, était inférieure aux 64,4% rapportés au Ghana mais supérieure à 0,5% obtenue en Éthiopie (Abebe *et al.*, 2017 ; Adjei *et al.*, 2009). Parallèlement, la prévalence en anticorps IgG anti-VHE dans la présente étude était inférieure (3,3%) à celle rapportée dans d'autres pays africains qui variait entre 12% et 59% (Abebe *et al.*, 2017 ; Adjei *et al.*, 2009 ; Caron *et al.*, 2008 ; Hannachi *et al.*, 2011 ; Stoszek *et al.*, 2006). La forte prévalence en anticorps IgM anti-VHE (34,7%) par rapport aux IgG anti-VHE (5,1%) observée dans notre étude chez les personnes âgées a déjà été rapportée au Ghana en 2010 (Adjei *et al.*, 2010). La comparaison entre les études de séroprévalence du VHE est toujours difficile. Les disparités observées entre ces études peuvent être attribuées aux différences observées dans les caractéristiques des populations étudiées et à l'utilisation de différents tests sérologiques avec des sensibilités variables.

La présence des anticorps IgM anti-VHE matérialise une infection récente du VHE et deux hypothèses peuvent être émises pour expliquer leur forte prévalence dans les groupes de personnes à risque étudiés. Premièrement, le VHE circulerait de façon épidémique au Cameroun et le caractère asymptomatique de cette infection serait à l'origine de sa circulation silencieuse. Ce pendant dans les cas où les infections par le VHE seraient symptomatiques, le diagnostic serait orienté vers une autre infection. C'était le cas dans une étude publiée en 2013 dans le Nord-Cameroun (Demanou *et al.*, 2013). En effet, dans deux villages de la région du Nord-Cameroun, une épidémie d'une maladie avec pour symptômes la fièvre et l'ictère ou jaunisse ayant entraîné la mort de deux personnes dont une femme enceinte s'était déclarée. Les autorités sanitaires locales avaient suspecté une infection par le virus de la fièvre jaune et les échantillons ont été prélevés et envoyés au CPC, laboratoire national de référence de la fièvre jaune pour confirmation. Les résultats de laboratoire avaient montré que le virus de la fièvre jaune n'était pas responsable de cette épidémie. Des analyses supplémentaires parmi lesquelles celle du VHE ont été réalisées dont le but de déterminer l'étiologie de cette épidémie. La recherche des anticorps anti-VHE avait montré que le VHE était responsable de cette épidémie. Cette position est consolidée par une autre étude publiée en République Centrafricaine chez les patients suspectés de fièvre jaune (Tricou *et al.*, 2020). En effet, cette étude rétrospective montre qu'une épidémie de VHE s'était produite entre 2008 et 2009 mais avait été assimilée à la fièvre jaune à cause des symptômes similaires entre

ces deux infections. Toutes ces données révèlent que dans un contexte comme celui du Cameroun où l'infection par le VHE n'ait pas fait l'objet de diagnostic comme les autres formes d'hépatite, celle-ci passera toujours inaperçue.

Dans le cadre de la présente étude l'hypothèse d'une épidémie semble peu probable. En effet, en regardant les groupes de personnes à risque à l'origine de cette forte prévalence en IgM anti-VHE c-à-d les personnes âgées (avec 34,7% IgM contre 5,1% IgG) et les femmes enceintes (avec 13,1% IgM anti-VHE contre 3,3% IgG anti-VHE), on constate qu'ils ont été prélevés dans des villes différentes (Yaoundé pour les femmes enceintes et Ebolowa pour les personnes âgées) et à des périodes différentes (2009 pour les personnes âgées et 2015 pour les femmes enceintes). Cette hypothèse est d'autant moins probable quand en regardant l'unique étude disponible au Cameroun sur le VHE chez les femmes enceintes réalisée dans la même ville et la même année que notre étude, nous observons une prévalence faible en IgM anti-VHE (0%) par rapport à celle trouvée dans notre étude (Noufensi *et al.*, 2016). La deuxième hypothèse émise pour expliquer la forte prévalence en anticorps IgM anti-VHE est que le VHE fait des réactions croisées avec d'autres virus. En effet, les études antérieures avaient montré qu'une infection aiguë causée par Cytomégalovirus ou Epstein-Barr virus peut induire des fausses réactivités aux anticorps IgM anti-VHE avec les tests communément utilisés dans le diagnostic du VHE (Fogeda *et al.*, 2009 ; Hyams *et al.*, 2014). C'est ainsi que quelque soit l'hypothèse mise en exergue, il est recommandé des études supplémentaires incluant la détection de l'ARN pour confirmer des fortes prévalences des IgM anti-VHE, marqueurs d'infection récente. Raison pour laquelle nous avons inclus dans notre étude les échantillons des personnes suspectées de fièvre jaune afin de confirmer la première épidémie de VHE rapportée en 2013 au Cameroun.

Des analyses sérologiques ont révélé la présence d'anticorps anti-VHE chez les porcs. Cette séroprévalence globale du VHE élevée était de 46,5% confirmant que le VHE circule de manière endémique dans la population porcine. Cette étude est la première de séroprévalence du VHE chez les porcs à être réalisée au Cameroun. Les résultats de cette étude sont similaires à ceux obtenus en Uruguay en 2018 (Mirazo *et al.*, 2018). Par contre, ils sont supérieurs à ceux rapportés au Nigeria et au Mexique mais inférieurs à ceux rapportés à Madagascar et en Écosse (Crossan *et al.*, 2015 ; Garcia-Hernandez *et al.*, 2017 ; Owolodun *et al.*, 2014 ; Temmam *et al.*, 2013). Ces différences pourraient s'expliquer, au moins en partie, par les différents systèmes d'élevage des porcs, les pratiques de gestion et d'hygiène de

routine appliquées dans ces élevages et les conditions environnementales qui caractérisent les différentes zones (Junaid *et al.*, 2014). Ces différences peuvent également être associées aux différentes méthodes de diagnostic du VHE utilisées dans ces différentes études. La présente étude montre une prévalence élevée en IgM anti-VHE (25,2%) par rapport aux IgG anti-VHE (14,1%). Cette forte séroprévalence pourrait s'expliquer par le fait que la majorité des porcs de cette étude avaient plus de 6 mois, or une étude espagnole avait montré que les porcs de plus de 12 semaines ont une prévalence en IgM anti-VHE plus élevée que la prévalence en IgG anti-VHE (Seminati *et al.*, 2008). En outre, certaines études publiées ont montré que les humains et les autres animaux, y compris les porcs, transmettent les anticorps IgG anti-VHE maternels à travers le placenta, ce qui peut fournir une protection pendant un certain temps et peut contribuer aux combinaisons de classes d'anticorps différentes selon l'âge (Borghesi *et al.*, 2014).

Le VHE circule dans la population de primates non humains du Cameroun. A notre connaissance, aucune donnée de la circulation du VHE n'était disponible dans cette population en Afrique en général et au Cameroun en particulier. Nous documentons ici la première étude qui montre la présence d'anticorps anti-VHE chez les PNH au Cameroun. Quatre espèces de PNH présentaient des marqueurs sérologiques IgG anti-VHE: les chimpanzés, le gorille, le drill et le mandrill. Une étude antérieure avait également montré la présence d'anticorps IgG anti-VHE chez les gorilles et les drills en Allemagne (Spahr *et al.*, 2018). Des études ont montré la présence d'anticorps IgG anti-VHE chez d'autres espèces de primates non humains, notamment les singes japonais, les singes rhésus, les singes cynomolgus, les singes taiwanais et les mangabeys à nuque blanche (Hirano *et al.*, 2003 ; Huang *et al.*, 2011 ; Melegari *et al.*, 2018). Trois PNH à savoir le chimpanzé, le babouin olive et le mangabey agile analysés dans notre étude avaient présenté les marqueurs IgM anti-VHE indiquant une infection récente par le VHE. Très peu d'études ont pu détecter des anticorps IgM anti-VHE chez les PNH. En Chine, une étude a montré la présence d'IgM anti-VHE chez le singe rhésus en 2011 (Huang *et al.*, 2011). De manière générale, les prévalences des anticorps anti-VHE chez les PNH observées à travers les études publiées sont relativement faibles par rapport à celles trouvées chez les principaux réservoirs confirmés que sont les porcs et les sangliers.

Dans cette étude, la RT-PCR temps réel a permis d'obtenir une fréquence de détection d'ARN de 19,1% (22/115) chez les patients positifs en anticorps IgM anti-VHE. Parmi ces 22

échantillons positifs en RT-PCR temps réel, 20 (83.3%) échantillons appartenait aux personnes suspectées de fièvre jaune, 1 (5.3%) aux PVVIH, 1 (2.1%) aux personnes âgées et 0 (0%) aux femmes enceintes. Cette forte fréquence de détection chez les personnes suspectées de la fièvre jaune permet de confirmer le caractère épidémique du VHE au Cameroun à travers la confirmation de l'épidémie de VHE produite pour la première fois dans la région du Nord-Cameroun en 2013. La caractérisation génétique du VHE chez ces personnes suspectées de fièvre jaune par RT-PCR nichée, montre le génotype 1, le sous-type 1e, responsable de plusieurs épidémies de VHE au Tchad, au Nigéria et en République Centrafricaine (Akanbi *et al.*, 2019 ; Tricou *et al.*, 2020 ; van Cuyck *et al.*, 2003). Par contre, les faibles fréquences de détection chez les femmes enceintes, les PVVIH et les personnes âgées nous permettent de rejeter l'hypothèse d'une circulation épidémique du VHE dans ces groupes de personnes à risque de développer les formes graves de VHE étudiés dans la présente étude. Un autre résultat important de notre travail est la détection du génotype 3, sous-type 3f chez deux patients. La détection du génotype 3 chez les humains en Afrique est rare et a été rapporté uniquement dans deux études (Kim *et al.*, 2014). Il est connu que le génotype 3 du VHE est l'un des génotypes responsables de la transmission zoonotique du VHE jusqu'ici dans les pays industrialisés (Song *et al.*, 2014). Sa présence chez les humains en Afrique où les génotypes incriminés dans les cas sporadiques et épidémiques sont les génotypes 1 et 2, laisse penser à l'existence d'une autre voie de transmission de VHE en Afrique en général et au Cameroun en particulier. C'est dans l'optique de vérifier cette hypothèse que l'un des objectifs spécifiques de ce travail était de vérifier s'il existerait une possibilité de transmission zoonotique de VHE au Cameroun.

La technique moléculaire RT-PCR nichée a montré la présence du génotype 3 du VHE dans 5,9% (8/136) échantillons des selles des porcs prélevés dans la ville de Yaoundé. C'est la deuxième étude au Cameroun qui montre la circulation du VHE chez les porcs. En effet, de Paula et Collaborateurs avaient détecté en 2013 le génotype 3 du VHE chez 1,4% (2/139), 2,6% (1/39) et 0% (0/167) des échantillons de foie de porcs prélevés dans les villes de Yaoundé, Bamenda et Douala, respectivement (de Paula *et al.*, 2013). La caractérisation moléculaire du génotype 3 de VHE chez les porcs dans la présente étude, confirme bien que les porcs constituent les réservoirs du VHE au Cameroun. Le fait que les échantillons des selles des porcs positifs en IgM ont été testés, pourrait expliquer la différence observée au niveau des prévalences obtenues. Diverses études ont signalé la présence du génotype 3 du

VHE dans les populations porcines dans différentes parties du monde. En Afrique, bien qu'étant limitées, les études de détection du VHE chez les porcs ont été rapportées dans quelques pays. En Afrique du Sud, une étude réalisée par Adelabu *et al.* (2017) avait montré la présence du génotype 3 du VHE dans 4,4% (7/160) échantillons des selles. En République Démocratique du Congo, le génotype 3 a été mis en évidence dans 2,5% (1/40) d'échantillons des selles (Kaba *et al.*, 2010). Au Nigéria, 76.7% (69/90) échantillons des selles des porcs testés, présentaient le génotype 3 du VHE (Owolodun *et al.*, 2014). Au Burkina Faso et à Madagascar, les génotypes 3 du VHE avaient été détectés chez 0,6% (1/157) et 1,2% (3/250) d'échantillons de foies de porcs testés, respectivement (Temmam *et al.*, 2013 ; Traore *et al.*, 2015).

Aucun échantillon des primates non humain n'était positif après amplification par RT-PCR temps réel et classique. Ces résultats sont similaires à ceux obtenus dans d'autres études menées à travers le monde. Des études sérologiques et moléculaires menées chez différentes espèces de PNH en Italie et en Allemagne en 2018, avaient montré la présence des anticorps anti-VHE mais l'absence de l'ARN dans les sera analysés (Melegari *et al.*, 2018 ; Spahr *et al.*, 2018). Malgré l'absence d'ARN du VHE dans ces échantillons de primates non humains, les résultats sérologiques laissent croire que ces animaux pourraient être des réservoirs du VHE au Cameroun car les IgM anti-VHE ont été détectées dans 2,3% (4/172) d'échantillons testés.

La présente étude a permis de détecter une diversité génétique de VHE au Cameroun avec le génotype 1, sous-type 1e et le génotype 3, sous-type 3f détectés chez les personnes suspectées de fièvre jaune dans la région du Nord-Cameroun et le génotype 3 détecté chez les porcs. La détection du génotype 3 chez les humains en Afrique est rare et n'a été rapportée que dans deux études (Kim *et al.*, 2014). Il est connu que le génotype 3 est l'un des génotypes responsables de la transmission zoonotique du VHE rapportée dans les pays développés (Song *et al.*, 2014). La présence de ce génotype chez les humains en Afrique où les génotypes impliqués dans les cas sporadiques et épidémiques sont les génotypes 1 et 2, suggère l'existence d'une autre voie de transmission du VHE en Afrique en général et au Cameroun en particulier. Afin de vérifier l'hypothèse d'une éventuelle transmission zoonotique du VHE au Cameroun, nous avons inclus dans les analyses phylogénétiques, en plus des séquences de VHE obtenues dans notre étude chez les humains et les porcs, les séquences de VHE obtenues chez les humains et les animaux dans d'autres parties du monde. Les analyses

phylogénétiques ont montré que toutes les huit séquences de VHE identifiées chez les porcs et deux des séquences détectées chez les humains dans notre étude appartiennent au même cluster. Ces séquences matchent avec les séquences de VHE de génotype 3 identifiées chez les humains et les porcs dans les pays développés, où il est responsable de la transmission zoonotique du VHE. Toutes ces observations valident l'hypothèse de la possibilité de transmission zoonotique ou inter-espèce du VHE au Cameroun, comme c'est le cas dans les pays développés. En Afrique, la seule voie de transmission de VHE rapportée jusqu'ici est la transmission oro-fécale via la consommation d'eau contaminée (Kim *et al.*, 2014). Nos résultats rapportent pour la première fois une possibilité de transmission zoonotique de VHE en Afrique. Ce pendant, des études ultérieures seront menées pour bien élucider cette voie de transmission de VHE au Cameroun. En effet, une étude de caractérisation moléculaire du VHE sera menée au sein des personnes en contact régulier avec les réservoirs du VHE (vétérinaires, fermiers, personnels des abattoirs) afin de comparer les génotypes présents chez ces derniers à ceux identifiés chez les animaux.

CONCLUSION, PERSPECTIVES ET RECOMMANDATIONS

Conclusion

Le présent travail avait pour objectif général de documenter l'épidémiologie de l'infection par le VHE au Cameroun. Ce travail a permis d'obtenir une bonne connaissance sur l'épidémiologie du VHE chez les personnes à risque de développer les formes graves de l'infection par le VHE (femmes enceintes, PVVIH et personnes âgées) d'une part et les animaux réservoirs du VHE (porcs et PNH) d'autre part au Cameroun.

Au sein des femmes enceintes, des personnes âgées et des personnes vivant avec le VIH, on observe des séroprévalences du VHE élevées quelque soit la population étudiée. Au sein des populations animales analysées, on note des séroprévalences du VHE élevées chez les porcs et relativement faible chez les primates non humains.

La présente étude a permis de confirmer la circulation du VHE dans la population humaine et porcine du Cameroun. La caractérisation génétique a permis d'identifier le génotype 1, sous-type 1e responsable des épidémies de VHE dans certains pays voisins du Cameroun et le génotype 3, sous-type 3f dans la population humaine. Dans la population animale le génotype 3, a été identifié chez les porcs alors qu'aucun génotype n'a été détecté chez les primates non humains.

Les résultats de la présente étude montrent que les génotypes 3 du VHE détectés chez les humains et les porcs forment un cluster avec les souches de VHE responsable de la transmission zoonotique dans les pays industrialisés. Ils permettent de confirmer l'hypothèse d'une possible transmission inter-espèces de VHE au Cameroun mais d'autres études seront menées dans le but de bien élucider cette voie de transmission du VHE.

Perspectives

Cette étude met en exergue l'importance de mettre en œuvre d'autres études dans le but d'avoir une connaissance globale de l'épidémiologie de l'infection par le VHE au Cameroun où les données sont encore très rares. Des travaux supplémentaires sont envisagés et permettront de :

- Déterminer la séroprévalence du VHE dans d'autres régions et dans la population générale en vue de déterminer la prévalence nationale du VHE et étendre cette étude aux autres réservoirs potentiels du VHE tels que les suidés sauvages, les rats, les chauves-souris et les lapins;
- Caractériser les génomes complets des génotypes détectés dans le cadre de notre étude afin de réaliser les analyses mutationnelles, phylodynamiques et phylogéographiques ;
- Mener une étude de caractérisation moléculaire du VHE au sein de la population des personnes en contact régulier avec les réservoirs du VHE (vétérinaires, fermiers, personnels des abattoirs) afin de bien élucider la transmission zoonotique du VHE au Cameroun.

Recommandations

Afin de limiter la propagation silencieuse du virus de l'hépatite E au Cameroun, nous recommandons :

- Au ministère de la santé publique, d'introduire le dépistage du VHE au même titre que le dépistage des autres formes d'hépatites virales surtout chez les personnes à risque de développer les formes fulminantes de VHE.
- Aux médecins, de demander les examens de VHE chez les patients présentant les symptômes caractéristiques des maladies hépatites dont l'étiologie reste inconnue après les analyses des infections autres que le VHE.
- A la population générale, d'adopter les mesures d'hygiènes rigoureuses à travers la consommation d'eau de qualité connue et une bonne cuisson de la viande des animaux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abebe, M., Ali, I., Ayele, S., Overbo, J., Aseffa, A., & Mihret, A. (2017). Seroprevalence and risk factors of Hepatitis E Virus infection among pregnant women in Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS ONE*, *12*(6), e0180078. doi: 10.1371/journal.pone.0180078
- Abid, S., & Khan, A. H. (2002). Severe hemolysis and renal failure in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficient patients with hepatitis E. *Am J Gastroenterol*, *97*(6), 1544-1547. doi: 10.1111/j.1572-0241.2002.05740.x
- Abravanel, F., Sandres-Saune, K., Lhomme, S., Dubois, M., Mansuy, J. M., & Izopet, J. (2012). Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol*, *50*(3), 897-902. doi: 10.1128/jcm.05942-11
- Adelabu, O. A., Chuks Iweriebor, B., Nwodo, U. U., Obi, L. C., & Okoh, A. I. (2017). Incidence and Molecular Characterization of Hepatitis E Virus from Swine in Eastern Cape, South Africa. *Adv Virol*, *2017*, 1073253. doi: 10.1155/2017/1073253
- Adjei, A. A., Tettey, Y., Aviyase, J. T., Adu-Gyamfi, C., Mingle, J. A., & Nartey, E. T. (2010). Unexpected elevated alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase levels and hepatitis E virus infection among persons who work with pigs in accra, Ghana. *Virol J*, *7*, 336. doi: 10.1186/1743-422x-7-336
- Adjei, A. A., Tettey, Y., Aviyase, J. T., Adu-Gyamfi, C., Obed, S., Mingle, J. A., . . . Adiku, T. K. (2009). Hepatitis E virus infection is highly prevalent among pregnant women in Accra, Ghana. *Virol J*, *6*, 108. doi: 10.1186/1743-422x-6-108
- Aggarwal, R. (2011). Hepatitis E: Historical, contemporary and future perspectives. *J Gastroenterol Hepatol*, *26 Suppl 1*, 72-82. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06540.x
- Aggarwal, R., & Jameel, S. (2011). Hepatitis E. *Hepatology*, *54*(6), 2218-2226. doi: 10.1002/hep.24674
- Aguiar, R. C., Takeyama, K., He, C., Kreinbrink, K., & Shipp, M. A. (2005). B-aggressive lymphoma family proteins have unique domains that modulate transcription and exhibit poly(ADP-ribose) polymerase activity. *J Biol Chem*, *280*(40), 33756-33765. doi: 10.1074/jbc.M505408200
- Ahmad, I., Holla, R. P., & Jameel, S. (2011). Molecular virology of hepatitis E virus. *Virus Res*, *161*(1), 47-58. doi: 10.1016/j.virusres.2011.02.011
- Akanbi, O. A., Harms, D., & Wang, B. (2019). Complete Genome Sequence of a Hepatitis E Virus Genotype 1e Strain from an Outbreak in Nigeria, 2017. *PLoS ONE*, *14*(1), e0201378. doi: 10.1371/journal.pone.0201378

- Al-Sadeq, D. W., Majdalawieh, A. F., Mesleh, A. G., Abdalla, O. M., & Nasrallah, G. K. (2018). Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J Med Microbiol*. doi: 10.1099/jmm.0.000706
- Alkali, B. R., Shuaibu, A. B., Bello, M., Abubakar, M. B., & Daneji, A. I. (2018). Sero-prevalence of hepatitis E virus (HEV) genotype 3 in goats from Sokoto Metropolis, Nigeria. *African Journal of Microbiology Research*, 12(33), 815-819.
- Alric, L., Bonnet, D., Beynes-Rauzy, O., Izopet, J., & Kamar, N. (2011). Definitive clearance of a chronic hepatitis E virus infection with ribavirin treatment. *Am J Gastroenterol*, 106(8), 1562-1563. doi: 10.1038/ajg.2011.158
- Arankalle, V. A., Joshi, M. V., Kulkarni, A. M., Gandhe, S. S., Chobe, L. P., Rautmare, S. S., . . . Padbidri, V. S. (2001). Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat*, 8(3), 223-227.
- Arends, J. E., Ghisetti, V., Irving, W., Dalton, H. R., Izopet, J., Hoepelman, A. I., & Salmon, D. (2014). Hepatitis E: An emerging infection in high income countries. *J Clin Virol*, 59(2), 81-88. doi: 10.1016/j.jcv.2013.11.013
- Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E. S., Braginsky, D. M., Savinov, A. P., & Poleschuk, V. F. (1983). Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*, 20(1), 23-31.
- Baylis, S. A., Blumel, J., Mizusawa, S., Matsubayashi, K., Sakata, H., Okada, Y., . . . Hanschmann, K. M. (2013). World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerg Infect Dis*, 19(5), 729-735. doi: 10.3201/eid1905.121845
- Baylis, S. A., Hanschmann, K. M., Blumel, J., & Nubling, C. M. (2011). Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification technique-based assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. *J Clin Microbiol*, 49(4), 1234-1239. doi: 10.1128/jcm.02578-10
- Beji-Hamza, A., Hassine-Zaafrane, M., Khelifi-Gharbi, H., Della Libera, S., Iaconelli, M., Muscillo, M., . . . La Rosa, G. (2015). Hepatitis E virus genotypes 1 and 3 in wastewater samples in Tunisia. *Arch Virol*, 160(1), 183-189. doi: 10.1007/s00705-014-2251-8
- Berto, A., Grierson, S., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., Johne, R., Reetz, J., . . . Banks, M. (2013). Hepatitis E virus in pork liver sausage, France. *Emerg Infect Dis*, 19(2), 264-266. doi: 10.3201/eid1902.121255

- Bertoletti, A., Ferrari, C., Fiaccadori, F., Penna, A., Margolskee, R., Schlicht, H. J., . . . Chisari, F. V. (1991). HLA class I-restricted human cytotoxic T cells recognize endogenously synthesized hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(23), 10445-10449. doi: 10.1073/pnas.88.23.10445
- Bhagat, S., Wadhawan, M., Sud, R., & Arora, A. (2008). Hepatitis viruses causing pancreatitis and hepatitis: a case series and review of literature. *Pancreas*, 36(4), 424-427. doi: 10.1097/MPA.0b013e31815d9d53
- Borghesi, J., Mario, L. C., Rodrigues, M. N., Favaron, P. O., & Miglino, M. A. (2014). Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans—A Review. *Open Journal of Animal Sciences*, 04(05), 323-336.
- Bose, P. D., Das, B. C., Kumar, A., Gondal, R., Kumar, D., & Kar, P. (2011). High viral load and deregulation of the progesterone receptor signaling pathway: association with hepatitis E-related poor pregnancy outcome. *J Hepatol*, 54(6), 1107-1113. doi: 10.1016/j.jhep.2010.08.037
- Buisson, Y., Coursaget, P., Bercion, R., Anne, D., Debord, T., & Roue, R. (1994). Hepatitis E virus infection in soldiers sent to endemic regions. *Lancet*, 344(8930), 1165-1166.
- Caballero-Gomez, J., Rivero-Juarez, A., Cano-Terriza, D., Rialde, M. A., Lopez-Lopez, P., Frias, M., . . . Garcia-Bocanegra, I. (2019). Survey for Hepatitis E virus infection in non-human primates in zoos in Spain. *Transbound Emerg Dis*, 66(4), 1771-1775. doi: 10.1111/tbed.13196
- Capai, L., Falchi, A., & Charrel, R. (2019). Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature. *11*(1). doi: 10.3390/v11010084
- Caron, M., & Kazanji, M. (2008). Hepatitis E virus is highly prevalent among pregnant women in Gabon, central Africa, with different patterns between rural and urban areas. *Virol J*, 5, 158. doi: 10.1186/1743-422x-5-158
- Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., & Jameel, S. (2008). Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J Biosci*, 33(4), 451-464. doi: 10.1007/s12038-008-0064-1
- Colson, P., Borentain, P., Queyriaux, B., Kaba, M., Moal, V., Gallian, P., . . . Gerolami, R. (2010). Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. *J Infect Dis*, 202(6), 825-834. doi: 10.1086/655898

- Colson, P., Coze, C., Gallian, P., Henry, M., De Micco, P., & Tamalet, C. (2007). Transfusion-associated hepatitis E, France. *Emerg Infect Dis*, *13*(4), 648-649. doi: 10.3201/eid1304.061387
- 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*(4), 1684-1688. doi: 10.1128/jcm.43.4.1684-1688.2005
- Crossan, C., Grierson, S., Thomson, J., Ward, A., Nunez-Garcia, J., Banks, M., & Scobie, L. (2015). Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect*, *143*(10), 2237-2240. doi: 10.1017/s0950268814003100
- Dalton, H. R., Bendall, R., Ijaz, S., & Banks, M. (2008). Hepatitis E: an emerging infection in developed countries. *Lancet Infect Dis*, *8*(11), 698-709. doi: 10.1016/s1473-3099(08)70255-x
- Dalton, H. R., Bendall, R. P., Keane, F. E., Tedder, R. S., & Ijaz, S. (2009). Persistent carriage of hepatitis E virus in patients with HIV infection. *N Engl J Med*, *361*(10), 1025-1027. doi: 10.1056/NEJMc0903778
- Dalton, H. R., Bendall, R. P., Rashid, M., Ellis, V., Ali, R., Ramnarace, R., . . . Henley, W. E. (2011). Host risk factors and autochthonous hepatitis E infection. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, *23*(12), 1200-1205. doi: 10.1097/MEG.0b013e32834ca4da
- Dalton, H. R., Hazeldine, S., Banks, M., Ijaz, S., & Bendall, R. (2007). Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet*, *369*(9569), 1260. doi: 10.1016/s0140-6736(07)60595-9
- Davern, T. J., Chalasani, N., Fontana, R. J., Hayashi, P. H., Protiva, P., Kleiner, D. E., . . . Hoofnagle, J. H. (2011). Acute hepatitis E infection accounts for some cases of suspected drug-induced liver injury. *Gastroenterology*, *141*(5), 1665-1672.e1661-1669. doi: 10.1053/j.gastro.2011.07.051
- Dawson, G. J., Chau, K. H., Cabal, C. M., Yarbough, P. O., Reyes, G. R., & Mushahwar, I. K. (1992). Solid-phase enzyme-linked immunosorbent assay for hepatitis E virus IgG and IgM antibodies utilizing recombinant antigens and synthetic peptides. *J Virol Methods*, *38*(1), 175-186. doi: 10.1016/0166-0934(92)90180-1
- de Carvalho, L. G., Marchevsky, R. S., dos Santos, D. R., de Oliveira, J. M., de Paula, V. S., Lopes, L. M., . . . Pinto, M. A. (2013). Infection by Brazilian and Dutch swine

- hepatitis E virus strains induces haematological changes in *Macaca fascicularis*. *BMC Infect Dis*, 13, 495. doi: 10.1186/1471-2334-13-495
- de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Allepuz, A., Mateu, E., Vidal, D., . . . Segales, J. (2008). Epidemiological study of hepatitis E virus infection in European wild boars (*Sus scrofa*) in Spain. *Vet Microbiol*, 129(1-2), 163-170. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.11.002
- de Paula, V. S., Wiele, M., Mbunkah, A. H., Daniel, A. M., Kingsley, M. T., & Schmidt-Chanasit, J. (2013). Hepatitis E virus genotype 3 strains in domestic pigs, Cameroon. *Emerg Infect Dis*, 19(4), 666-668. doi: 10.3201/eid1904.121634
- Demanou, M., Mahamat, A., Nimpa, M. M., & Njouom, R. (2013). First documented outbreak of Hepatitis E in Northern Cameroon. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*, 6(6), 682-683.
- Demi Sibiro, O. A., Manirakiza, A., & Komas, N. P. (2018). Seroprevalence of Hepatitis E Virus Infection Among People Living With HIV in the Central African Republic. *Open Forum Infect Dis*, 5(12), ofy307. doi: 10.1093/ofid/ofy307
- Dong, C., Zafrullah, M., Mixson-Hayden, T., Dai, X., Liang, J., Meng, J., & Kamili, S. (2012). Suppression of interferon-alpha signaling by hepatitis E virus. *Hepatology*, 55(5), 1324-1332. doi: 10.1002/hep.25530
- Dremsek, P., Wenzel, J. J., Johne, R., Ziller, M., Hofmann, J., Groschup, M. H., . . . Ulrich, R. G. (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(2), 189-200. doi: 10.1007/s00430-011-0221-2
- Egloff, M. P., Malet, H., Putics, A., Heinonen, M., Dutartre, H., Frangeul, A., . . . Canard, B. (2006). Structural and functional basis for ADP-ribose and poly(ADP-ribose) binding by viral macro domains. *J Virol*, 80(17), 8493-8502. doi: 10.1128/jvi.00713-06
- El-Tras, W. F., Tayel, A. A., & El-Kady, N. N. (2013). Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt. *Zoonoses Public Health*, 60(3), 244-251. doi: 10.1111/j.1863-2378.2012.01516.x
- Emerson, S. U., Arankalle, V. A., & Purcell, R. H. (2005). Thermal stability of hepatitis E virus. *J Infect Dis*, 192(5), 930-933. doi: 10.1086/432488
- Emerson, S. U., Nguyen, H. T., Torian, U., Burke, D., Engle, R., & Purcell, R. H. (2010). Release of genotype 1 hepatitis E virus from cultured hepatoma and polarized intestinal cells depends on open reading frame 3 protein and requires an intact PXXP motif. *J Virol*, 84(18), 9059-9069. doi: 10.1128/jvi.00593-10

- Emerson, S. U., & Purcell, R. H. (2001). Recombinant vaccines for hepatitis E. *Trends Mol Med*, 7(10), 462-466.
- Emerson, S. U., & Purcell, R. H. (2003). Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*, 13(3), 145-154. doi: 10.1002/rmv.384
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., & Ball, L. A. (2005). Virus taxonomy: VIIIth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *London: Elsevier Academic Press*, 1162.
- Favorov, M. O., Fields, H. A., Purdy, M. A., Yashina, T. L., Aleksandrov, A. G., Alter, M. J., . . . Margolis, H. S. (1992). Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol*, 36(4), 246-250. doi: 10.1002/jmv.1890360403
- Feldt, T., Sarfo, F. S., Zoufaly, A., Phillips, R. O., Burchard, G., van Lunzen, J., . . . Eis-Hubinger, A. M. (2013). Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon. *J Clin Virol*, 58(1), 18-23. doi: 10.1016/j.jcv.2013.05.004
- Fogeda, M., de Ory, F., Avellon, A., & Echevarria, J. M. (2009). Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol*, 45(3), 259-261. doi: 10.1016/j.jcv.2009.05.022
- Foupouapouognigni, Y., Mba, S. A., Betsem a Betsem, E., Rousset, D., Froment, A., Gessain, A., & Njouom, R. (2011). Hepatitis B and C virus infections in the three Pygmy groups in Cameroon. *J Clin Microbiol*, 49(2), 737-740. doi: 10.1128/JCM.01475-10
- Foupouapouognigni, Y., Mba, S. A., & Njouom, R. (2011). Prevalence of hepatitis B virus infection among Cercopithecidae monkeys in Cameroon. *J Med Primatol*, 40(3), 194-196. doi: 10.1111/j.1600-0684.2011.00471.x
- Fry, K. E., Tam, A. W., Smith, M. M., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., . . . et al. (1992). Hepatitis E virus (HEV): strain variation in the nonstructural gene region encoding consensus motifs for an RNA-dependent RNA polymerase and an ATP/GTP binding site. *Virus Genes*, 6(2), 173-185. doi: 10.1007/bf01703066
- Garcia-Hernandez, M. E., Cruz-Rivera, M., Sanchez-Betancourt, J. I., Rico-Chavez, O., Vergara-Castaneda, A., Trujillo, M. E., & Sarmiento-Silva, R. E. (2017). Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res*, 13(1), 289. doi: 10.1186/s12917-017-1208-z

- Garkavenko, O., Obriadina, A., Meng, J., Anderson, D. A., Benard, H. J., Schroeder, B. A., . . . Crosson, M. C. (2001). Detection and characterisation of swine hepatitis E virus in New Zealand. *J Med Virol*, *65*(3), 525-529.
- Gerolami, R., Moal, V., & Colson, P. (2008). Chronic hepatitis E with cirrhosis in a kidney-transplant recipient. *N Engl J Med*, *358*(8), 859-860. doi: 10.1056/NEJMc0708687
- Ghoneim, N. H., Abdel-Aziz Abdel-Moein, K., Hamza, D. A., & Hagag, N. M. (2016). Occurrence of human hepatitis E virus in Norway rats: A zoonotic potential with great public health implications. *Asian Pac J Trop Dis*, *6*(9), 718-721.
- Gorbalenya, A. E., Koonin, E. V., & Lai, M. M. (1991). Putative papain-related thiol proteases of positive-strand RNA viruses. Identification of rubi- and aphthovirus proteases and delineation of a novel conserved domain associated with proteases of rubi-, alpha- and coronaviruses. *FEBS Lett*, *288*(1-2), 201-205. doi: 10.1016/0014-5793(91)81034-6
- Graff, J., Torian, U., Nguyen, H., & Emerson, S. U. (2006). A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus. *J Virol*, *80*(12), 5919-5926. doi: 10.1128/jvi.00046-06
- Grandadam, M., Tebbal, S., Caron, M., Siriwardana, M., Larouze, B., Koeck, J. L., . . . Nicand, E. (2004). Evidence for hepatitis E virus quasispecies. *J Gen Virol*, *85*(Pt 11), 3189-3194. doi: 10.1099/vir.0.80248-0
- Guidotti, L. G., & Chisari, F. V. (2006). Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol*, *1*, 23-61. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230
- Hamid, S. S., Atiq, M., Shehzad, F., Yasmeen, A., Nissa, T., Salam, A., . . . Jafri, W. (2002). Hepatitis E virus superinfection in patients with chronic liver disease. *Hepatology*, *36*(2), 474-478. doi: 10.1053/jhep.2002.34856
- Hannachi, N., Hidar, S., Harrabi, I., Mhalla, S., Marzouk, M., Ghzel, H., . . . Boukadida, J. (2011). [Seroprevalence and risk factors of hepatitis E among pregnant women in central Tunisia]. *Pathol Biol (Paris)*, *59*(5), e115-118. doi: 10.1016/j.patbio.2009.06.004
- Hirano, M., Ding, X., Tran, H. T., Li, T. C., Takeda, N., Sata, T., . . . Abe, K. (2003). 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*(1), 8-11.

- Holla, R. P., Ahmad, I., Ahmad, Z., & Jameel, S. (2013). Molecular virology of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*, 33(1), 3-14. doi: 10.1055/s-0033-1338110
- Hsieh, S. Y., Meng, X. J., Wu, Y. H., Liu, S. T., Tam, A. W., Lin, D. Y., & Liaw, Y. F. (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(12), 3828-3834.
- Huang, C. C., Nguyen, D., Fernandez, J., Yun, K. Y., Fry, K. E., Bradley, D. W., . . . Reyes, G. R. (1992). Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology*, 191(2), 550-558.
- Huang, F., Li, Y., Yu, W., Jing, S., Wang, J., Long, F., . . . Pan, Q. (2016). Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*, 64(2), 350-359. doi: 10.1002/hep.28668
- Huang, F., Yu, W., Hua, X., Jing, S., Zeng, W., & He, Z. (2011). Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E Virus in *Macaca mulatta* from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat Mon*, 11(9), 745-749. doi: 10.5812/kowsar.1735143X.730
- Huang, F. F., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Halbur, P. G., Schommer, S. K., Pierson, F. W., . . . 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(4), 1326-1332.
- Huang, S., Zhang, X., Jiang, H., Yan, Q., Ai, X., Wang, Y., . . . Xia, N. (2010). Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. *PLoS One*, 5(10), e13560. doi: 10.1371/journal.pone.0013560
- Hyams, C., Mabayoje, D. A., Copping, R., Maranao, D., Patel, M., Labbett, W., . . . Webster, D. P. (2014). Serological cross reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol*, 86(3), 478-483. doi: 10.1002/jmv.23827
- Inoue, G., Michitaka, K., Takahashi, K., Abe, N., Oka, K., Nunoi, H., . . . Onji, M. (2006). A case of acute hepatitis E developed in a housewife who had cooked and eaten wild boar meat a month before. *Acta Hepatologica Japonica*, 47, 459-464.
- Inoue, J., Takahashi, M., Yazaki, Y., Tsuda, F., & Okamoto, H. (2006). Development and validation of an improved RT-PCR assay with nested universal primers for detection

- of hepatitis E virus strains with significant sequence divergence. *J Virol Methods*, 137(2), 325-333. doi: 10.1016/j.jviromet.2006.07.004
- Jean, B. O., Anne, O., Kuan, A. T., Bruno, L. O., Hortense, R., Lamouni, H. Z., . . . Nicolas, B. (2019). Serological Evidence of Hepatitis E Virus in Dromedary Camels in the Sahelian Zone of West Africa. *Journal of Advances in Microbiology*, 15(4), 1-7.
- Jinshan, Jirintai, Manglai, D., Takahashi, M., Nagashima, S., & Okamoto, H. (2010). Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. *Arch Virol*, 155(8), 1217-1226. doi: 10.1007/s00705-010-0706-0
- Johne, R., Dremsek, P., Reetz, J., Heckel, G., Hess, M., & Ulrich, R. G. (2014). Hepeviridae: an expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol*, 27, 212-229. doi: 10.1016/j.meegid.2014.06.024
- Juhl, D., Baylis, S. A., Blumel, J., Gorg, S., & Hennig, H. (2014). Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus infection in German blood donors. *Transfusion*, 54(1), 49-56. doi: 10.1111/trf.12121
- Junaid, S. A., Agina, S. E., & Abubakar, K. A. (2014). Epidemiology and associated risk factors of hepatitis e virus infection in plateau state, Nigeria. *Virology (Auckl)*, 5, 15-26. doi: 10.4137/vrt.s15422
- Junaid, S. A., Agina, S. E., & Jaiye, K. (2014). Seroprevalence of hepatitis E virus among domestic animals in Plateau State-Nigeria. *British Microbiology Research Journal*, 4, 924-934.
- Kaba, M., Brouqui, P., Richet, H., Badiaga, S., Gallian, P., Raoult, D., & Colson, P. (2010). Hepatitis E virus infection in sheltered homeless persons, France. *Emerg Infect Dis*, 16(11), 1761-1763. doi: 10.3201/eid1611.091890
- Kaba, M., Colson, P., Musongela, J. P., Tshilolo, L., & Davoust, B. (2010). Detection of hepatitis E virus of genotype 3 in a farm pig in Kinshasa (Democratic Republic of the Congo). *Infect Genet Evol*, 10(1), 154-157. doi: 10.1016/j.meegid.2009.09.011
- Kadare, G., & Haenni, A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. *J Virol*, 71(4), 2583-2590.
- Kalia, M., Chandra, V., Rahman, S. A., Sehgal, D., & Jameel, S. (2009). Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol*, 83(24), 12714-12724. doi: 10.1128/jvi.00717-09

- Kamar, N., Bendall, R., Legrand-Abravanel, F., Xia, N. S., Ijaz, S., Izopet, J., & Dalton, H. R. (2012). Hepatitis E. *Lancet*, 379(9835), 2477-2488. doi: 10.1016/s0140-6736(11)61849-7
- Kamar, N., Garrouste, C., Haagsma, E. B., Garrigue, V., Pischke, S., Chauvet, C., . . . Rostaing, L. (2011). Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*, 140(5), 1481-1489. doi: 10.1053/j.gastro.2011.02.050
- Kamar, N., Izopet, J., Cintas, P., Garrouste, C., Uro-Coste, E., Cointault, O., & Rostaing, L. (2010). Hepatitis E virus-induced neurological symptoms in a kidney-transplant patient with chronic hepatitis. *Am J Transplant*, 10(5), 1321-1324. doi: 10.1111/j.1600-6143.2010.03068.x
- Kamar, N., Mansuy, J. M., Cointault, O., Selves, J., Abravanel, F., Danjoux, M., . . . Rostaing, L. (2008). Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney- and kidney-pancreas-transplant recipients. *Am J Transplant*, 8(8), 1744-1748. doi: 10.1111/j.1600-6143.2008.02286.x
- Kamar, N., Rostaing, L., Legrand-Abravanel, F., & Izopet, J. (2013). How should hepatitis E virus infection be defined in organ-transplant recipients? *Am J Transplant*, 13(7), 1935-1936. doi: 10.1111/ajt.12253
- Kamar, N., Selves, J., Mansuy, J. M., Ouezzani, L., Peron, J. M., Guitard, J., . . . Rostaing, L. (2008). Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med*, 358(8), 811-817. doi: 10.1056/NEJMoa0706992
- Kamar, N., Weclawiak, H., Guilbeau-Frugier, C., Legrand-Abravanel, F., Cointault, O., Ribes, D., . . . Rostaing, L. (2012). Hepatitis E virus and the kidney in solid-organ transplant patients. *Transplantation*, 93(6), 617-623. doi: 10.1097/TP.0b013e318245f14c
- Kapur, N., Thakral, D., Durgapal, H., & Panda, S. K. (2012). Hepatitis E virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat*, 19(6), 436-448. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01559.x
- Kar, P., Jilani, N., Husain, S. A., Pasha, S. T., Anand, R., Rai, A., & Das, B. C. (2008). Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol*, 103(10), 2495-2501. doi: 10.1111/j.1572-0241.2008.02032.x

- Karpe, Y. A., & Lole, K. S. (2011). Deubiquitination activity associated with hepatitis E virus putative papain-like cysteine protease. *J Gen Virol*, 92(Pt 9), 2088-2092. doi: 10.1099/vir.0.033738-0
- Kasorndorkbua, C., Guenette, D. K., Huang, F. F., Thomas, P. J., Meng, X. J., & Halbur, P. G. (2004). Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J Clin Microbiol*, 42(11), 5047-5052. doi: 10.1128/jcm.42.11.5047-5052.2004
- Kaur, M., Hyams, K. C., Purdy, M. A., Krawczynski, K., Ching, W. M., Fry, K. E., . . . Carl, M. (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(9), 3855-3858. doi: 10.1073/pnas.89.9.3855
- Kenfak-Foguena, A., Schöni-Affolter, F., Bürgisser, P., Witteck, A., Darling, K. E. A., Kovari, H., . . . Cavassini, M. (2011). Hepatitis E Virus Seroprevalence and Chronic Infections in Patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis*, 17(6), 1074-1078. doi: 10.3201/eid1706.101067
- Khudyakov, Y. E., Khudyakova, N. S., Fields, H. A., Jue, D., Starling, C., Favorov, M. O., . . . Margolis, H. (1993). Epitope mapping in proteins of hepatitis E virus. *Virology*, 194(1), 89-96. doi: 10.1006/viro.1993.1238
- Khuroo, M. S. (1980). Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from post-transfusion non-A, non-B type. *Am J Med*, 68(6), 818-824.
- Khuroo, M. S., & Kamili, S. (2009). Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis E virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat*, 16(7), 519-523. doi: 10.1111/j.1365-2893.2009.01101.x
- Khuroo, M. S., Kamili, S., & Jameel, S. (1995). Vertical transmission of hepatitis E virus. *Lancet*, 345(8956), 1025-1026. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90761-0
- Khuroo, M. S., Rustgi, V. K., Dawson, G. J., Mushahwar, I. K., Yattoo, G. N., Kamili, S., & Khan, B. A. (1994). Spectrum of hepatitis E virus infection in India. *J Med Virol*, 43(3), 281-286.
- Kim, J. H., Nelson, K. E., Panzner, U., Kasture, Y., Labrique, A. B., & Wierzbica, T. F. (2014). A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC Infect Dis*, 14, 308. doi: 10.1186/1471-2334-14-308

- Kitajima, M., Matsubara, K., Sour, S., Haramoto, E., Katayama, H., & Ohgaki, S. (2009). First detection of genotype 3 hepatitis E virus RNA in river water in Cambodia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *103*(9), 955-957. doi: 10.1016/j.trstmh.2009.04.004
- Koonin, E. V., Gorbalenya, A. E., Purdy, M. A., Rozanov, M. N., Reyes, G. R., & Bradley, D. W. (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*(17), 8259-8263. doi: 10.1073/pnas.89.17.8259
- Kumar, A., Beniwal, M., Kar, P., Sharma, J. B., & Murthy, N. S. (2004). Hepatitis E in pregnancy. *Int J Gynaecol Obstet*, *85*(3), 240-244. doi: 10.1016/j.ijgo.2003.11.018
- Kumar, N., & Sarin, S. K. (2013). Hepatitis E- Is it a risk to transfusion safety? *Asian J Transfus Sci*, *7*(1), 1-3. doi: 10.4103/0973-6247.106708
- Lamoril, J., Ameziane, N., Deybach, J. C., Bouizegarène, P., & Bogard, M. (2008). Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie DNA sequencing technologies: A revolution in motion. Part one. *Immuno-analyse et biologie spécialisée*, *23*, 260—279.
- Lee, G. H., Tan, B. H., Teo, E. C., Lim, S. G., Dan, Y. Y., Wee, A., . . . Teo, C. G. (2016). Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*, *150*(2), 355-357.e353. doi: 10.1053/j.gastro.2015.10.048
- Li, R. C., Ge, S. X., Li, Y. P., Zheng, Y. J., Nong, Y., Guo, Q. S., . . . Xia, N. S. (2006). Seroprevalence of hepatitis E virus infection, rural southern People's Republic of China. *Emerg Infect Dis*, *12*(11), 1682-1688. doi: 10.3201/eid1211.060332
- Li, S. W., Zhang, J., He, Z. Q., Gu, Y., Liu, R. S., Lin, J., . . . Xia, N. S. (2005). Mutational analysis of essential interactions involved in the assembly of hepatitis E virus capsid. *J Biol Chem*, *280*(5), 3400-3406. doi: 10.1074/jbc.M410361200
- Li, T. C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., . . . Miyamura, T. (2005). Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*, *11*(12), 1958-1960. doi: 10.3201/eid1112.051041
- Li, X., Zhao, C., Harrison, T. J., Song, A., Fan, J., Zhang, J., & Wang, Y. (2008). Investigation of hepatitis E virus infection in swine from Hunan province, China. *J Med Virol*, *80*(8), 1391-1396. doi: 10.1002/jmv.21246

- Liu, H., & Ma, Y. (2020). Hepatitis E virus-associated Guillain-Barre syndrome: Revision of the literature. *Brain Behav*, *10*(1), e01496. doi: 10.1002/brb3.1496
- Loly, J. P., Rikir, E., Seivert, M., Legros, E., Defrance, P., Belaiche, J., . . . Delwaide, J. (2009). Guillain-Barre syndrome following hepatitis E. *World J Gastroenterol*, *15*(13), 1645-1647. doi: 10.3748/wjg.15.1645
- Lorenzo, F. R., Tsatsralt-Od, B., Ganbat, S., Takahashi, M., & Okamoto, H. (2007). Analysis of the full-length genome of hepatitis E virus isolates obtained from farm pigs in Mongolia. *J Med Virol*, *79*(8), 1128-1137. doi: 10.1002/jmv.20905
- 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*(1), 5-36. doi: 10.1002/rmv.482
- MacCallum, F. O. (1972). Early studies of viral hepatitis. *Br Med Bull*, *28*(2), 105-108. doi: 10.1093/oxfordjournals.bmb.a070906
- Maila, H. T., Bowyer, S. M., & Swanepoel, R. (2004). Identification of a new strain of hepatitis E virus from an outbreak in Namibia in 1995. *J Gen Virol*, *85*(Pt 1), 89-95. doi: 10.1099/vir.0.19587-0
- Mansuy, J. M., Abravanel, F., Miedouge, M., Mengelle, C., Merviel, C., Dubois, M., . . . Izopet, J. (2009). Acute hepatitis E in south-west France over a 5-year period. *J Clin Virol*, *44*(1), 74-77. doi: 10.1016/j.jcv.2008.09.010
- Marano, G., Vaglio, S., Pupella, S., Facco, G., Bianchi, M., Calizzani, G., . . . Grazzini, G. (2015). Hepatitis E: an old infection with new implications. *Blood Transfus*, *13*(1), 6-17. doi: 10.2450/2014.0063-14
- Martinelli, N., Pavoni, E., Filogari, D., Ferrari, N., Chiari, M., Canelli, E., & Lombardi, G. (2015). Hepatitis E virus in wild boar in the central northern part of Italy. *Transbound Emerg Dis*, *62*(2), 217-222. doi: 10.1111/tbed.12118
- Matsuura, Y., Suzuki, M., Yoshimatsu, K., Arikawa, J., Takashima, I., Yokoyama, M., . . . Li, T. C. (2007). Prevalence of antibody to hepatitis E virus among wild sika deer, *Cervus nippon*, in Japan. *Arch Virol*, *152*(7), 1375-1381. doi: 10.1007/s00705-007-0965-6
- Melegari, I., Di Profio, F., Marsilio, F., Sarchese, V., Palombieri, A., Friedrich, K. G., . . . Di Martino, B. (2018). Serological and molecular investigation for hepatitis E virus (HEV) in captive non-human primates, Italy. *Virus Res*, *251*, 17-21. doi: 10.1016/j.virusres.2018.04.017

- Meng, X. J. (2010). Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*, *140*(3-4), 256-265. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.017
- 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*(1), 23-30. doi: 10.1016/j.virusres.2011.01.016
- Meng, X. J. (2013). Zoonotic and foodborne transmission of hepatitis E virus. *Semin Liver Dis*, *33*(1), 41-49. doi: 10.1055/s-0033-1338113
- Meng, X. J., Purcell, R. H., Halbur, P. G., Lehman, J. R., Webb, D. M., Tsareva, T. S., . . . Emerson, S. U. (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *94*(18), 9860-9865.
- Merviel, C., Mansuy, J. M., Dubois, M., & Izopet, J. (2012). [Development of a multiplex technique for detecting simultaneously HAV RNA and HEV RNA]. *Pathol Biol (Paris)*, *60*(2), 95-105. doi: 10.1016/j.patbio.2010.04.004
- Mirazo, S., Gardinali, N. R., Cecilia, D., Verger, L., Ottonelli, F., Ramos, N., . . . Arbiza, J. (2018). Serological and virological survey of hepatitis E virus (HEV) in animal reservoirs from Uruguay reveals elevated prevalences and a very close phylogenetic relationship between swine and human strains. *Vet Microbiol*, *213*, 21-27. doi: 10.1016/j.vetmic.2017.11.013
- Mirazo, S., Ramos, N., Mainardi, V., Gerona, S., & Arbiza, J. (2014). Transmission, diagnosis, and management of hepatitis E: an update. *Hepat Med*, *6*, 45-59. doi: 10.2147/hmer.s63417
- Mirazo, S. C. D. A., Quintero, G. D., Cabrera, K., Ramos, N., Orduz, S., & Arbiza, J. (2018). A case of incidental infection of Hepatitis E virus (HEV) genotype 1 in a domestic pig. *Arch Virol*. doi: 10.1007/s00705-018-4025-1
- Mishra, N., Walimbe, A. M., & Arankalle, V. A. (2013). Hepatitis E virus from India exhibits significant amino acid mutations in fulminant hepatic failure patients. *Virus Genes*, *46*(1), 47-53. doi: 10.1007/s11262-012-0833-7
- Mitsui, T., Tsukamoto, Y., Yamazaki, C., Masuko, K., Tsuda, F., Takahashi, M., . . . Okamoto, H. (2004). Prevalence of hepatitis E virus infection among hemodialysis patients in Japan: evidence for infection with a genotype 3 HEV by blood transfusion. *J Med Virol*, *74*(4), 563-572. doi: 10.1002/jmv.20215
- Miyashita, K., Kang, J. H., Saga, A., Takahashi, K., Shimamura, T., Yasumoto, A., . . . Mishiro, S. (2012). Three cases of acute or fulminant hepatitis E caused by ingestion

- of pork meat and entrails in Hokkaido, Japan: Zoonotic food-borne transmission of hepatitis E virus and public health concerns. *Hepatol Res*, 42(9), 870-878. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01006.x
- Mizuo, H., Yazaki, Y., Sugawara, K., Tsuda, F., Takahashi, M., Nishizawa, T., & Okamoto, H. (2005). Possible risk factors for the transmission of hepatitis E virus and for the severe form of hepatitis E acquired locally in Hokkaido, Japan. *J Med Virol*, 76(3), 341-349. doi: 10.1002/jmv.20364
- Moal, V., Textoris, J., Ben Amara, A., Mehraj, V., Berland, Y., Colson, P., & Mege, J. L. (2013). Chronic hepatitis E virus infection is specifically associated with an interferon-related transcriptional program. *J Infect Dis*, 207(1), 125-132. doi: 10.1093/infdis/jis632
- Mochizuki, M., Ouchi, A., Kawakami, K., Ishida, T., Li, T. C., Takeda, N., . . . Tsunemitsu, H. (2006). Epidemiological study of hepatitis E virus infection of dogs and cats in Japan. *Vet Rec*, 159(25), 853-854.
- Moin, S. M., Panteva, M., & Jameel, S. (2007). The hepatitis E virus Orf3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J Biol Chem*, 282(29), 21124-21133. doi: 10.1074/jbc.M701696200
- Munne, M. S., Vladimirov, S., Otegui, L., Castro, R., Brajterman, L., Soto, S., . . . Gonzalez, J. E. (2006). Identification of the first strain of swine hepatitis E virus in South America and prevalence of anti-HEV antibodies in swine in Argentina. *J Med Virol*, 78(12), 1579-1583. doi: 10.1002/jmv.20741
- Mushahwar, I. K. (2008). Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J Med Virol*, 80(4), 646-658. doi: 10.1002/jmv.21116
- Nakamura, M., Takahashi, K., Taira, K., Taira, M., Ohno, A., Sakugawa, H., . . . Mishiro, S. (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(3), 137-140. doi: 10.1016/j.hepres.2005.10.010
- Navaneethan, U., Al Mohajer, M., & Shata, M. T. (2008). Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int*, 28(9), 1190-1199. doi: 10.1111/j.1478-3231.2008.01840.x
- Nicand, E., Bigaillon, C., & Tesse, S. (2009). [Hepatitis E: an emerging disease?]. *Pathol Biol (Paris)*, 57(2), 203-211. doi: 10.1016/j.patbio.2008.04.002

- Ning, H., Yu, S., Zhu, Y., Dong, S., Yu, R., Shen, S., . . . Li, Z. (2008). Genotype 3 hepatitis E has been widespread in pig farms of Shanghai suburbs. *Vet Microbiol*, *126*(1-3), 257-263. doi: 10.1016/j.vetmic.2007.07.001
- Njabo, K. Y., Fuller, T. L., Chasar, A., Pollinger, J. P., Cattoli, G., Terregino, C., . . . Smith, T. B. (2012). Pandemic A/H1N1/2009 influenza virus in swine, Cameroon, 2010. *Vet Microbiol*, *156*(1-2), 189-192. doi: 10.1016/j.vetmic.2011.09.003
- Noufensi, M. R. Y., Kengne, M., Njukeng, P. A., Anong, D. N., Masebe, T. M., Tamoufe, U., . . . Nwobegahay, J. M. (2016). Seroprevalence and risk factors of Hepatitis E virus infection among pregnant women at the Yaounde Central Hospital, Cameroon. *Microbiol Res Int*, *4*(4), 50-54.
- Okamoto, H. (2007). Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res*, *127*(2), 216-228. doi: 10.1016/j.virusres.2007.02.002
- Okamoto, H. (2013). Culture systems for hepatitis E virus. *J Gastroenterol*, *48*(2), 147-158. doi: 10.1007/s00535-012-0682-0
- Onana, J. N. (2018). Cartographie des écosystèmes du Cameroun. *Int J Biol Chem*, *12*(2), 940-957.
- Osterman, A., Vizoso Pinto, M. G., Haase, R., Nitschko, H., Jager, S., Sander, M., . . . Baiker, A. (2012). Systematic screening for novel, serologically reactive Hepatitis E Virus epitopes. *Virol J*, *9*, 28. doi: 10.1186/1743-422x-9-28
- Owolodun, O. A., Gerber, P. F., Gimenez-Lirola, L. G., Kwaga, J. K., & Opriessnig, T. (2014). First report of hepatitis E virus circulation in domestic pigs in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg*, *91*(4), 699-704. doi: 10.4269/ajtmh.14-0144
- Panda, S. K., Thakral, D., & Rehman, S. (2007). Hepatitis E virus. *Rev Med Virol*, *17*(3), 151-180. doi: 10.1002/rmv.522
- Parvez, M. K. (2013). Chronic hepatitis E infection: risks and controls. *Intervirology*, *56*(4), 213-216. doi: 10.1159/000349888
- Pavio, N., Meng, X. J., & Doceul, V. (2015). Zoonotic origin of hepatitis E. *Curr Opin Virol*, *10*, 34-41. doi: 10.1016/j.coviro.2014.12.006
- Pavio, N., Meng, X. J., & Renou, C. (2010). Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res*, *41*(6), 46. doi: 10.1051/vetres/2010018
- Pavio, N., Merbah, T., & Thebault, A. (2014). Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France. *Emerg Infect Dis*, *20*(11), 1925-1927. doi: 10.3201/eid2011.140891

- Peralta, B., Biarnes, M., Ordonez, G., Porta, R., Martin, M., Mateu, E., . . . Meng, X. J. (2009). Evidence of widespread infection of avian hepatitis E virus (avian HEV) in chickens from Spain. *Vet Microbiol*, *137*(1-2), 31-36. doi: 10.1016/j.vetmic.2008.12.010
- Peron, J. M., Bureau, C., Poirson, H., Mansuy, J. M., Alric, L., Selves, J., . . . Vinel, J. P. (2007). Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat*, *14*(5), 298-303. doi: 10.1111/j.1365-2893.2007.00858.x
- Phan, T. G., Nguyen, T. A., Yan, H., Yagyu, F., Kozlov, V., Kozlov, A., . . . Ushuijma, H. (2005). Development of a novel protocol for RT-multiplex PCR to detect diarrheal viruses among infants and children with acute gastroenteritis in Eastern Russia. *Clin Lab*, *51*(7-8), 429-435.
- Pischke, S., Stiefel, P., Franz, B., Bremer, B., Suneetha, P. V., Heim, A., . . . Bara, C. L. (2012). Chronic hepatitis e in heart transplant recipients. *Am J Transplant*, *12*(11), 3128-3133. doi: 10.1111/j.1600-6143.2012.04200.x
- Prabhu, S. B., Gupta, P., Durgapal, H., Rath, S., Gupta, S. D., Acharya, S. K., & Panda, S. K. (2011). Study of cellular immune response against Hepatitis E virus (HEV). *J Viral Hepat*, *18*(8), 587-594. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01338.x
- Pudupakam, R. S., Kenney, S. P., Cordoba, L., Huang, Y. W., Dryman, B. A., Leroith, T., . . . Meng, X. J. (2011). Mutational analysis of the hypervariable region of hepatitis e virus reveals its involvement in the efficiency of viral RNA replication. *J Virol*, *85*(19), 10031-10040. doi: 10.1128/jvi.00763-11
- Purcell, R. H., & Emerson, S. U. (2008). Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol*, *48*(3), 494-503. doi: 10.1016/j.jhep.2007.12.008
- Rayis, D. A., Jumaa, A. M., Gasim, G. I., Karsany, M. S., & Adam, I. (2013). An outbreak of hepatitis E and high maternal mortality at Port Sudan, Eastern Sudan. *Pathog Glob Health*, *107*(2), 66-68. doi: 10.1179/2047773213y.0000000076
- Rein, D. B., Stevens, G. A., Theaker, J., Wittenborn, J. S., & Wiersma, S. T. (2012). The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*, *55*(4), 988-997. doi: 10.1002/hep.25505
- Reyes, G. R., Purdy, M. A., Kim, J. P., Luk, K. C., Young, L. M., Fry, K. E., & Bradley, D. W. (1990). Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science*, *247*(4948), 1335-1339.

- Rivero-Juarez, A., Frias, M., Rodriguez-Cano, D., Cuenca-Lopez, F., & Rivero, A. (2016). Isolation of Hepatitis E Virus From Breast Milk During Acute Infection. *Clin Infect Dis*, 62(11), 1464. doi: 10.1093/cid/ciw186
- Robson, S. C., Adams, S., Brink, N., Woodruff, B., & Bradley, D. (1992). Hospital outbreak of hepatitis E. *Lancet*, 339(8806), 1424-1425.
- Rogee, S., Talbot, N., Caperna, T., Bouquet, J., Barnaud, E., & Pavio, N. (2013). New models of hepatitis E virus replication in human and porcine hepatocyte cell lines. *J Gen Virol*, 94(Pt 3), 549-558. doi: 10.1099/vir.0.049858-0
- Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., . . . Pavio, N. (2011). High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, 34(5), 419-427. doi: 10.1016/j.cimid.2011.07.003
- Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Ponterio, E., Angeloni, G., Trevisani, M., & Ostanello, F. (2013). Zoonotic transmission of hepatitis E virus in industrialized countries. *New Microbiol*, 36(4), 331-344.
- Salines, M., Andraud, M., & Rose, N. (2017). From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res*, 48(1), 31. doi: 10.1186/s13567-017-0436-3
- Saravanabalaji, S., Tripathy, A. S., Dhoot, R. R., Chadha, M. S., Kakrani, A. L., & Arankalle, V. A. (2009). Viral load, antibody titers and recombinant open reading frame 2 protein-induced TH1/TH2 cytokines and cellular immune responses in self-limiting and fulminant hepatitis e. *Intervirology*, 52(2), 78-85. doi: 10.1159/000214862
- Schielke, A., Ibrahim, V., Czogiel, I., Faber, M., Schrader, C., Dremsek, P., . . . Johne, R. (2015). Hepatitis E virus antibody prevalence in hunters from a district in Central Germany, 2013: a cross-sectional study providing evidence for the benefit of protective gloves during disembowelling of wild boars. *BMC Infect Dis*, 15, 440. doi: 10.1186/s12879-015-1199-y
- Schlosser, B., Stein, A., Neuhaus, R., Pahl, S., Ramez, B., Kruger, D. H., . . . Hofmann, J. (2011). Liver transplant from a donor with occult HEV infection induced chronic hepatitis and cirrhosis in the recipient. *J Hepatol*, 56(2), 500-502. doi: 10.1016/j.jhep.2011.06.021
- Schofield, D. J., Glamann, J., Emerson, S. U., & Purcell, R. H. (2000). Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal

- antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol*, 74(12), 5548-5555. doi: 10.1128/jvi.74.12.5548-5555.2000
- Seminati, C., Mateu, E., Peralta, B., de Deus, N., & Martin, M. (2008). Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J*, 175(1), 130-132. doi: 10.1016/j.tvjl.2006.11.018
- Serratrice, J., Disdier, P., Colson, P., Ene, N., de Roux, C. S., & Weiller, P. J. (2007). Acute polyarthritis revealing hepatitis E. *Clin Rheumatol*, 26(11), 1973-1975. doi: 10.1007/s10067-007-0595-0
- Smith, D. B., & Simmonds, P. (2018). Classification and Genomic Diversity of Enterically Transmitted Hepatitis Viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med*. doi: 10.1101/cshperspect.a031880
- Snijder, E. J., Bredenbeek, P. J., Dobbe, J. C., Thiel, V., Ziebuhr, J., Poon, L. L., . . . Gorbalenya, A. E. (2003). Unique and conserved features of genome and proteome of SARS-coronavirus, an early split-off from the coronavirus group 2 lineage. *J Mol Biol*, 331(5), 991-1004. doi: 10.1016/s0022-2836(03)00865-9
- Song, Y. J., Park, W. J., Park, B. J., Lee, J. B., Park, S. Y., Song, C. S., . . . Choi, I. S. (2014). Hepatitis E virus infections in humans and animals. *Clin Exp Vaccine Res*, 3(1), 29-36. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.29
- Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., . . . Okamoto, H. (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(11), 5371-5374. doi: 10.1128/jcm.42.11.5371-5374.2004
- Spahr, C., Knauf-Witzens, T., Dahnert, L., Enders, M., Muller, M., Johne, R., & Ulrich, R. G. (2018). Detection of HEV-specific antibodies in four non-human primate species, including great apes, from different zoos in Germany. *Epidemiol Infect*, 146(1), 119-124. doi: 10.1017/s0950268817002606
- Spahr, C., Knauf-Witzens, T., Vahlenkamp, T., Ulrich, R. G., & Johne, R. (2017). Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. *Zoonoses Public Health*, 65(1), 11-29. doi: 10.1111/zph.12405
- Sridhar, S., Teng, J. L. L., Chiu, T. H., Lau, S. K. P., & Woo, P. C. Y. (2017). Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *Int J Mol Sci*, 18(4), 869. doi: 10.3390/ijms18040869

- Srivastava, R., Aggarwal, R., Bhagat, M. R., Chowdhury, A., & Naik, S. (2008). Alterations in natural killer cells and natural killer T cells during acute viral hepatitis E. *J Viral Hepat*, *15*(12), 910-916. doi: 10.1111/j.1365-2893.2008.01036.x
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Jameel, S., Puri, P., Gupta, V. K., Ramesh, V. S., . . . Naik, S. (2007). Cellular immune responses in acute hepatitis E virus infection to the viral open reading frame 2 protein. *Viral Immunol*, *20*(1), 56-65. doi: 10.1089/vim.2006.0053
- Srivastava, R., Aggarwal, R., Sachdeva, S., Alam, M. I., Jameel, S., & Naik, S. (2011). Adaptive immune responses during acute uncomplicated and fulminant hepatitis E. *J Gastroenterol Hepatol*, *26*(2), 306-311. doi: 10.1111/j.1440-1746.2010.06356.x
- Stoszek, S. K., Abdel-Hamid, M., Saleh, D. A., El Kafrawy, S., Narooz, S., Hawash, Y., . . . Strickland, G. T. (2006). High prevalence of hepatitis E antibodies in pregnant Egyptian women. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *100*(2), 95-101. doi: 10.1016/j.trstmh.2004.12.005
- Suneetha, P. V., Pischke, S., Schlaphoff, V., Grabowski, J., Fytily, P., Gronert, A., . . . Wedemeyer, H. (2012). Hepatitis E virus (HEV)-specific T-cell responses are associated with control of HEV infection. *Hepatology*, *55*(3), 695-708. doi: 10.1002/hep.24738
- Surjit, M., Jameel, S., & Lal, S. K. (2004). The ORF2 protein of hepatitis E virus binds the 5' region of viral RNA. *J Virol*, *78*(1), 320-328. doi: 10.1128/jvi.78.1.320-328.2004
- Takahashi, M., Nishizawa, T., Nagashima, S., Jirintai, S., Kawakami, M., Sonoda, Y., . . . Okamoto, H. (2014). Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res*, *180*, 59-69. doi: 10.1016/j.virusres.2013.12.014
- Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C. C., Bradley, D. W., Fry, K. E., & Reyes, G. R. (1991). Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*, *185*(1), 120-131.
- Tan, H. H., Leong, H. N., Tan, B. H., Oon, L. L., Lim, K. H., Chang, J. P., & Tan, C. K. (2011). Chronic hepatitis e infection resulting in graft failure in a liver transplant tourist. *Case Rep Transplant*, *2011*, 654792. doi: 10.1155/2011/654792
- Tanaka, T., Takahashi, M., Kusano, E., & Okamoto, H. (2007). Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J Gen Virol*, *88*(Pt 3), 903-911. doi: 10.1099/vir.0.82535-0

- Tavitian, S., Peron, J. M., Huynh, A., Mansuy, J. M., Ysebaert, L., Huguet, F., . . . Recher, C. (2010). Hepatitis E virus excretion can be prolonged in patients with hematological malignancies. *J Clin Virol*, *49*(2), 141-144. doi: 10.1016/j.jcv.2010.06.016
- Tei, S., Kitajima, N., Takahashi, K., & Mishiro, S. (2003). Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, *362*(9381), 371-373. doi: 10.1016/S0140-6736(03)14025-1
- Temmam, S., Besnard, L., Andriamandimby, S. F., Foray, C., Rasamoelina-Andriamanivo, H., Heraud, J. M., . . . Porphyre, V. (2013). High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*, *88*(2), 329-338. doi: 10.4269/ajtmh.2012.12-0615
- Teo, C. G. (2010). Much meat, much malady: changing perceptions of the epidemiology of hepatitis E. *Clin Microbiol Infect*, *16*(1), 24-32. doi: 10.1111/j.1469-0691.2009.03111.x
- Teshale, E. H., Grytdal, S. P., Howard, C., Barry, V., Kamili, S., Drobeniuc, J., . . . Holmberg, S. D. (2010). Evidence of person-to-person transmission of hepatitis E virus during a large outbreak in Northern Uganda. *Clin Infect Dis*, *50*(7), 1006-1010. doi: 10.1086/651077
- Thapa, R., Mallick, D., & Ghosh, A. (2009). Childhood hepatitis E infection complicated by acute immune thrombocytopenia. *J Pediatr Hematol Oncol*, *31*(2), 151. doi: 10.1097/MPH.0b013e31818c00db
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, *25*(24), 4876-4882. doi: 10.1093/nar/25.24.4876
- Traore, K. A., Ouoba, J. B., Huot, N., Rogee, S., Dumarest, M., Traore, A. S., . . . Roques, P. (2015). Hepatitis E Virus Exposure is Increased in Pork Butchers from Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*, *93*(6), 1356-1359. doi: 10.4269/ajtmh.15-0321
- TrehanPati, N., Sukriti, S., Geffers, R., Hissar, S., Riese, P., Toepfer, T., . . . Sarin, S. K. (2011). Gene expression profiles of T cells from hepatitis E virus infected patients in acute and resolving phase. *J Clin Immunol*, *31*(3), 498-508. doi: 10.1007/s10875-010-9506-2
- Tricou, V., Bouscaillou, J., Laghoo-Nguembe, G. L., Bere, A., Konamna, X., Selekon, B., . . . Kommas, N. P. (2020). Hepatitis E virus outbreak associated with rainfall in the Central

- African Republic in 2008-2009. *BMC Infect Dis*, 20(1), 260. doi: 10.1186/s12879-020-04961-4
- Tripathy, A. S., Das, R., Rathod, S. B., & Arankalle, V. A. (2012). Cytokine profiles, CTL response and T cell frequencies in the peripheral blood of acute patients and individuals recovered from hepatitis E infection. *PLoS One*, 7(2), e31822. doi: 10.1371/journal.pone.0031822
- Tsega, E., Hansson, B. G., Krawczynski, K., & Nordenfelt, E. (1992). Acute sporadic viral hepatitis in Ethiopia: causes, risk factors, and effects on pregnancy. *Clin Infect Dis*, 14(4), 961-965.
- van Cuyck, H., Juge, F., & Roques, P. (2003). Phylogenetic analysis of the first complete hepatitis E virus (HEV) genome from Africa. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 39(2), 133-139.
- Viswanathan, R. (2013). Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study-epidemiology. 1957. *Natl Med J India*, 26(6), 362-377.
- Ward, P., Muller, P., Letellier, A., Quessy, S., Simard, C., Trottier, Y. L., . . . Brassard, J. (2008). Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can J Vet Res*, 72(1), 27-31.
- Weigand, K., Weigand, K., Schemmerer, M., Muller, M., & Wenzel, J. J. (2018). Hepatitis E Seroprevalence and Genotyping in a Cohort of Wild Boars in Southern Germany and Eastern Alsace. *Food Environ Virol*, 10(2), 167-175. doi: 10.1007/s12560-017-9329-x
- Williams, T. P. E., Kasorndorkbua, C., Halbur, P. G., Haqshenas, G., Guenette, D. K., Toth, T. E., & Meng, X. J. (2001). Evidence of Extrahepatic Sites of Replication of the Hepatitis E Virus in a Swine Model. *Journal of Clinical Microbiology*, 39(9), 3040-3046. doi: 10.1128/jcm.39.9.3040-3046.2001
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Cao, K. Y., Wernery, U., Schountz, T., . . . Yuen, K. Y. (2016). New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis*, 22(12), 2219-2221. doi: 10.3201/eid2212.160979
- Woo, P. C., Lau, S. K., Teng, J. L., Tsang, A. K., Joseph, M., Wong, E. Y., . . . Yuen, K. Y. (2014). New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis*, 20(6), 1044-1048. doi: 10.3201/eid2006.140140
- Yazaki, Y., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T., Sasaki, N., Gotanda, Y., & Okamoto, H. (2003). Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-

- borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *J Gen Virol*, 84(Pt 9), 2351-2357. doi: 10.1099/vir.0.19242-0
- Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M. A., Deckert, A., Dewey, C. E., . . . Giulivi, A. (2001). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8(6), 1213-1219. doi: 10.1128/cdli.8.6.1213-1219.2001
- Zafrullah, M., Ozdener, M. H., Kumar, R., Panda, S. K., & Jameel, S. (1999). Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J Virol*, 73(5), 4074-4082.
- Zhang, W., Shen, Q., Mou, J., Gong, G., Yang, Z., Cui, L., . . . Hua, X. (2008). Hepatitis E virus infection among domestic animals in eastern China. *Zoonoses Public Health*, 55(6), 291-298. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01136.x
- Zheng, Z. Z., Miao, J., Zhao, M., Tang, M., Yeo, A. E., Yu, H., . . . Xia, N. S. (2010). Role of heat-shock protein 90 in hepatitis E virus capsid trafficking. *J Gen Virol*, 91(Pt 7), 1728-1736. doi: 10.1099/vir.0.019323-0
- Zhou, Y. H., Purcell, R. H., & Emerson, S. U. (2005). A truncated ORF2 protein contains the most immunogenic site on ORF2: antibody responses to non-vaccine sequences following challenge of vaccinated and non-vaccinated macaques with hepatitis E virus. *Vaccine*, 23(24), 3157-3165. doi: 10.1016/j.vaccine.2004.12.020
- Zhu, F. C., Zhang, J., Zhang, X. F., Zhou, C., Wang, Z. Z., Huang, S. J., . . . Xia, N. S. (2010). Efficacy and safety of a recombinant hepatitis E vaccine in healthy adults: a large-scale, randomised, double-blind placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, 376(9744), 895-902. doi: 10.1016/s0140-6736(10)61030-6

ANNEXES

Annexe 1: Fiche d'identification des animaux

Date de prélèvement.....

Code de l'animal

Sexe : M F

Age.....

Poids.....

Apparence : malade Bien portant

Région Ville.....

Lieu de prélèvement :

Marché.....

Abattoir.....

Ferme.....

Prélèvement réalisé : Foie Selles Sang Bile

Annexe 2: protocole de traitement de selle pour extraction de l'ARN

1. REACTIFS :

- PBS pour les selles

2. MATERIEL:

- tubes Falcon™ 15 ml
- centrifugeuse réfrigérée
- vortex
- spatule en bois
- tubes Nunc 1,8 ml

3. METHODE :

Procédez dans l'ordre:

- 1) - Etiqueter les tubes Falcon 15 ml et y introduire 12 billes (1g) par tube
- 2) - Ajouter 5 ml de PBS selles dans les tubes
- 3) - Mettre 1g de selles dans les tubes identifiés (**sous la hotte d'extraction de selle**)
- 4) - Vortexer les tubes pendant 30 secondes
- 5) - Conserver le reste des prélèvements de selles à -20°C dans leur flacon d'origine
- 6) -Homogénéiser les suspensions de selles sur le shaker mécanique pendant 10 min
- 7) -Incuber dans un bain Marie à 60°C pendant 5 minutes, puis vortexer vigoureusement pendant 30 secondes
- 8) - Centrifuger 30 min / 3000g (**4200 rpm**) / + 4°C, aspirer le surnageant clarifié

Note : Bien s'assurer de la clarté de la suspension de selle pour éviter le colmatage des colonnes lors de l'extraction.

- 9) - Mettre 1,8 ml de surnageant par tube Nunc bien étiquetés
- 10) - Transférer 1 ml de suspension de selle du premier tube nunc dans un tube de 1,5 ml (*sous la hotte de la pièce d'extraction*) et concentrer les virus en centrifugeant 30 min / 17 000 g / + 4°C
- 11) - Eliminer en pipetant délicatement 860 µl de surnageant et utiliser les 140 µl restant pour l'extraction de l'ARN
- 12) -Ajouter 560 µl de tampon AVL et continuer le l'extraction avec le kit Qiagen sans modification du protocole prescrit par le fabricant (*voir protocole d'extraction de l'ARN, QIAGEN*)

Annexe 3: Protocole d'extraction d'ARN

▪ LYSE

- 1-Distribuer 560 µl de la solution de lyse (Buffer AVL+carrier RNA) dans les tubes de 1,5ml ;
- 2-Ajouter 140 µl de l'échantillon et mélanger au vortex pendant 15 secondes ;
- 3-Incuber à la température ambiante pendant 10 mn et centrifuger brièvement.

▪ FIXATION

- 1-Ajouter 560 µl d'éthanol 96°C, mélanger au vortex pendant 15 secondes ;
- 2-Centrifuger brièvement, transférer 630 µl du mélange dans la colonne ;
- 3-Centrifuger à 8000 rpm pendant 1 mn ou 6 000 g pendant 1 mn ;
- 4-Jeter le tube collecteur, mettre la colonne dans un nouveau tube.

▪ LAVAGE

- 1-Ajouter 500 µl de tampon AW1 ;
- 2-Centrifuger à 8 000 rpm pendant 1 mn ;
- 3-Transférer chaque colonne dans un nouveau tube ;
- 4-Ajouter 500 µl du tampon AW2 ;
- 5-Centrifuger à 2 0000 g ou 14 000 rpm pendant 3 mn ;
- 6-Jeter le tube collecteur et utiliser un autre tube pour une centrifugation à vide à 14000 rpm pendant 1 mn ;
- 7-Eliminer le filtrat et le tube collecteur, transférer chaque colonne dans un nouveau tube 1,5ml.

▪ ELUTION

- 1-Ajouter 60µl de la solution d'éluion (tampon AVE) ;
- 2-Incuber à la température ambiante pendant 1 mn ;
- 3-Centrifuger à 6 000 g pendant mn, jeter la colonne et garder le tube contenant l'ARN, à conserver à -20°C.

Annexe 4 : Autorisation du MINEPIA

REPUBLIQUE DU CAMEROUN
PAIX – TRAVAIL - PATRIE

MINISTERE DE L'ELEVAGE DES PECHEES ET DES
INDUSTRIES ANIMALES

SECRETARIAT GENERAL

DELEGATION REGIONALE DU CENTRE

BP 930 Yaoundé, Tél : 222 31 09 28



REPUBLIC OF CAMEROON
PEACE – WORK- FATHERLAND

MINISTRY OF LIVESTOCK FISHERIES
AND ANIMAL INDUSTRIES

GENERAL SECRETARIAT

REGIONAL DELEGATION OF CENTER

N° 00050 /L/MINEPIA/SG/DREPIA-CE

Yaoundé, le 29 MAI 2018

LE DELEGUE REGIONAL

A

MADAME LE CHEF DE CENTRE ZOOTECHNIQUE
ET VETERINAIRE DE MVOG-ADA

Objet : Autorisation de prélèvement des porcs
dans la ville de Yaoundé

Madame le Chef de Centre Zootechnique et Vétérinaire,

Dans le cadre d'une étude sur : « Prévalence, diversité génétique et transmission inter-espèce du virus de l'hépatite E au Cameroun », Monsieur Abdou Fatawou MODIYINDI, étudiant en cycle Doctorat effectuera ses activités de recherche en vue de l'obtention de son diplôme de Doctorat/Phd. Ce dernier fera des prélèvements sur les porcs au marché de Mvog-Ada.

Je viens par la présente vous instruire de vouloir bien prendre toutes les dispositions pour un encadrement efficient de ses activités.

AMPLIATION :

- DDEPIA Mfoundi
- DAEPIA Mvog –Ada
- Archive/Chrono

LE DELEGUE REGIONAL



Georges M. St.
Docteur Vétérinaire

Annexe 5 : Articles publiés issus de la thèse

- 1** - Modiyinji AF, Atsama MA, Monamele GC, Nola M, Njouom R., 2018. High seroprevalence of hepatitis E among pigs suggests an animal reservoir in Cameroon. *Journal of Infection in Developing Countries*. 12(8): 676-679. doi:10.3855/jidc.10310
- 2** - Modiyinji AF, Amougou-Atsama M, Monamele CG, Nola M, Njouom R., 2019. Seroprevalence of hepatitis E virus antibodies in different human populations of Cameroon. *Journal of Medical Virology*. 1-6. DOI: 10.1002/jmv.25545
- 3** - Modiyinji AF, Amougou Atsama M, Monamele Chavely G, Nola M, Njouom R., 2019. Detection of hepatitis E virus antibodies among Cercopithecidae and Hominidae monkeys in Cameroon. *Journal of Medical Primatology*. 00:1–3. DOI: 10.1111/jmp.12430
- 4** - Bigna JJ , Modiyinji AB, Nansseu JR, Amougou MA, Nola M, Kenmoe S, Temfack E, Njouom R., 2020. Burden of hepatitis E virus infection in pregnancy and maternofetal outcomes: a systematic review and meta-analysis. *BMC Pregnancy and Childbirth*. 20:426. DOI: 10.1186/s12884-020-03116-2
- 5** - Modiyinji AF, Sanding GMAM, Atsama MA, Monamele CG, Nola M, Njouom R (2020) Serological and molecular investigation of hepatitis E virus in pigs reservoirs from Cameroon reveals elevated seroprevalence and presence of genotype 3. *PLoS ONE* 15(2): e0229073. DOI: 10.1371/journal.pone.0229073
- 6** - Modiyinji AF, Rivero-Juarez A, Lopez-Lopez, P, Atsama, MA, Monamele, CG, Nola M, Rivero A, Njouom R. (2020). *First molecular characterization of the hepatitis E virus in humans in Cameroon: Confirmation of the HEV outbreak in Touboro, North-Cameroon*. *Journal of Medical Virology*. DOI:10.1186/s12917-021-02750-5
- 7** - Modiyinji AB, Bigna JJ, Kenmoe S, Simo SFN, Amougou MA, Ndangang MS, Moise Nola M, Njouom R (2021) Epidemiology of hepatitis E virus infection in animals in Africa: a systematic review and meta-analysis. *BMC Veterinary Research* 17:50. DOI :10.1186/s12917-021-02749-5

Case Report

High seroprevalence of hepatitis E among pigs suggests an animal reservoir in Cameroon

Abdou Fatawou Modiyinji^{1,2}, Marie Amougou Atsama^{1,2}, Gwladys Chavely Monamele^{1,3}, Moïse Nola², Richard Njouom¹

¹ Centre Pasteur of Cameroon, Yaounde, Cameroon

² University of Yaounde I, Yaounde, Cameroon

³ University of Buea, Buea, Cameroon

Abstract

Introduction: Hepatitis E virus (HEV) is one of the most prevalent cause of acute hepatitis in humans worldwide. The risk of HEV transmission is not limited only to spread from human to human but the infection can also spread from animals to humans, especially from the domestic pigs. Despite mounting evidence regarding the zoonotic potential of porcine HEV infection, there are limited data on its prevalence in pigs in the sub-Saharan Africa region. Therefore, the present study aimed to determine the seroprevalence of HEV antibodies among pigs in two Cameroonian regions.

Methodology: A total of 162 sera were collected from slaughtered-age pigs from January to March 2012. To determine whether pigs might represent a HEV reservoir in the Northern and Western region in Cameroon, anti-HEV IgG and IgM were tested by ELISA using commercial available kits.

Results: Overall, 70 of the 162 samples (43.2%, 95% CI: 35.5% - 51.2%) were positive for at least one of the serological markers of HEV infection (IgM and / or IgG). We observed a significant seroprevalence of HEV antibodies between the northern and western regions (60% (42/70) and 40% (28/70), $p = 0.01796$) respectively.

Conclusion: Overall, this study reports a high seroprevalence of Hepatitis E virus antibodies in slaughter pigs in Cameroon. Our findings suggest that pigs might be a cause of zoonotic HEV transmission in Cameroon. Therefore, further studies are warranted to establish the dynamics of zoonotic HEV and characterize the different genotypes circulating in humans and pigs.

Key words: Hepatitis E virus; seroprevalence; Cameroon.

J Infect Dev Ctries 2018; 12(8):676-679. doi:10.3855/jidc.10310

(Received 05 March 2018 – Accepted 27 April 2018)

Copyright © 2018 Modiyinji *et al.* This is an open-access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is one of the most prevalent cause of acute hepatitis in humans worldwide. One-third of the world's population is at risk of becoming infected with HEV [1]. HEV is responsible for over 50% of cases of acute viral hepatitis in endemic countries. A case-fatality rate (CFR) of 1-4% was observed in the general population and might reach 30% in the pregnant women especially during the third trimester of pregnancy. In patients with chronic liver diseases, CFR may be even higher [2].

Four HEV genotypes cause human infections (genotypes 1, 2, 3 and 4). Genotypes 1 and 2 are predominantly found in human populations in developing countries. However, the risk of HEV transmission is not limited only to spread from human to human but the infection can also spread from animals to humans, especially from the domestic pigs and wild

boars, suggesting the zoonotic potential of the virus [3]. Genotypes 3 and 4 are globally distributed in humans and animals [4]. Genotypes 5 and 6 are found in wild boars [5]. Genotypes 7 and 8 were recently identified in dromedary and Bactrian camels, respectively [5,6].

Several transmission routes of hepatitis E have been identified, and include: transmission by contaminated drinking water [7]; food-borne transmission by ingestion of uncooked meat from infected animals [8], transmission through camel milk consumption [9] and transfusion of infected blood products [10]. Also, HEV can be transmitted via the transplantation of solid organs [11]. In developed countries, HEV is predominantly transmitted by the ingestion of pork and wild boar meat. Evidence for transmission of HEV-3 and HEV-4 by direct contact of humans with animals has been repeatedly described. Several studies have shown that persons with occupational contact to

domestic pigs such as slaughterers, pig farmers or veterinarians exhibit significant higher anti-HEV antibody prevalence than the general population [1]. In Africa, contaminated water causes serious epidemic outbreaks [1]. Other sources of infection such as animal transmission cannot be excluded since genotype 3 responsible for the zoonotic transmission of HEV has already been reported in some African countries [12]. The information on HEV infection in animals in this continent remains underreported [12]. In Cameroon, minimal attention has been paid to HEV epidemiology in humans and animals. Therefore, in this study, we evaluate the seroprevalence of hepatitis E in slaughter-age pigs in two regions of Cameroon.

Methodology

From January to March 2012, a total of 162 sera samples were randomly collected from slaughter-age pigs in a slaughterhouse in two Cameroonian regions (84 from the North region and 78 from the West region) (Figure 1). Blood samples were collected during the pigs slaughtering at the bleeding post as previously described [13]. All blood samples were transported in a cool box at 4°C, and then frozen and stored at -80°C until analysis.

At Centre Pasteur of Cameroon (CPC), in the virology department, sera were separated, aliquoted and stored at -80 °C until testing. All these sera were later tested for the presence of anti-HEV immunoglobulins (Ig) with enzyme-linked immunosorbent assays: HEV IgG ELISA and HEV IgM ELISA 3.0 kits (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd, Singapore). The test was carried out according to the manufacturer's instructions. Briefly, the sera diluted in diluent buffer were placed in wells coated. After incubation of 30 min at 37 °C, followed by washing, the conjugate (horseradish peroxidases) was added and incubated for 30 min at 37 °C. Plates were washed, and 100 µL of substrate solution (tetramethylbenzidine) were added. The reaction was stopped after 15 min with 50 µL of stop solution (hydrochloric acid) and absorbance was measured at 450 nm using spectrophotometer. For each analysis, positive and negative controls, provided with the kit, were used. The cut-off value was set at 0.500 for IgG and 0.400 for IgM added to the mean absorbance of the non-reactive controls.

Statistical analyses

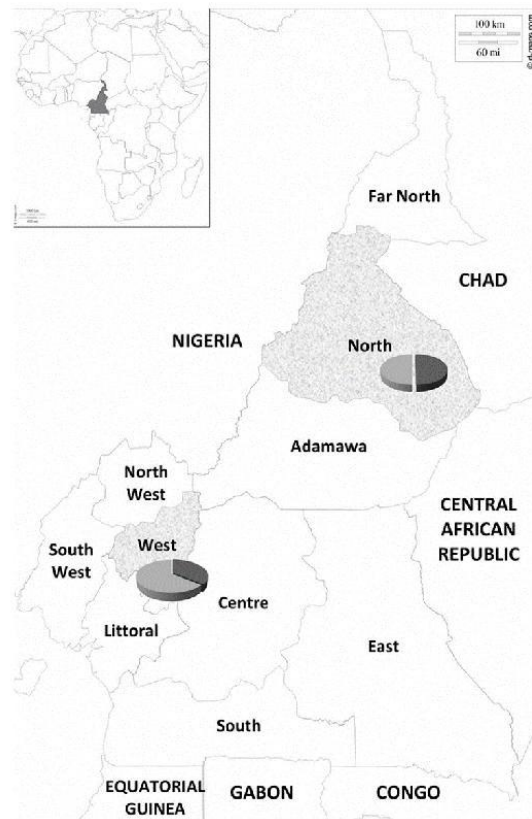
Statistical analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (IBM SPSS Statistics v22.0, USA). A p-value of less than 0.05 was deemed statistically significant. Comparison between

serology of samples and regions was assessed by the chi-squared test.

Results

Seventy of the 162 samples (43.2%, 95% CI: 35.5% - 51.2%) were positive for at least one of the serological markers of HEV infection (IgM and / or IgG). The HEV ELISA results are summarized in Table 1. Higher seroprevalence of 50% (42/84) was noted in the North region of Cameroon as compared to the West region (28/78; 35.9%). There was established a significant difference in the seroprevalence between the two regions ($p = 0.018$). Seroprevalence of the recent HEV infection (presence of IgM alone), ongoing infection (simultaneous presence of IgM and IgG) and past infection (presence of IgG alone) in this population

Figure 1. Map of Cameroon showing the two tested regions and the seroprevalence of HEV in pigs.



In black are the proportions of positive and in grey are the proportions of negative.

Table 1. Results of detection of specific anti-hepatitis E virus antibodies.

Antibody results	North N (%)	West N (%)	Total N (%)
IgG positive and IgM positive	0	4 (5.1)	4 (2.5)
IgG positive, IgM negative	3 (3.6)	3 (3.8)	6 (3.7)
IgG negative, IgM positive	39 (46.4)	21 (26.9)	60 (37.0)
IgG negative and IgM negative	42 (50)	50 (64.1)	92 (56.8)
Total	84	78	162

were 37% (60/162), 2.5% (4/162) and 3.7% (6/162), respectively. Both regions had similar IgM and IgG positivity profile with higher frequency of recent infection. Ninety-two out of 162 samples (56.8%) had a negative result for both anti-HEV antibodies.

Discussion

In this study, we report results of serological analysis for HEV in pigs in two regions of Cameroon at 43.2%. Several reports of higher hepatitis E seroprevalence in pigs have been observed in other studies. In Madagascar [14] and Scotland [15] HEV seroprevalence of 71% and 61.4% were respectively noted in slaughter-age pigs. This can be explained by the fact that, in those studies was used an ELISA that can detect 3 serological markers (IgM, IgG and IgA) comparing to only two serological markers used in this study. The proportion of past HEV infection as reflected by the presence of IgG antibodies was lower than that reported by other studies [16]. Also, a review by Salines *et al.* (2017) reported that anti-HEV IgM were more detected in younger pigs while anti-HEV IgG were more detected in older ones [17]. Other studies have observed similar IgM and IgG profiles [18]. In our study, the high proportion of 37.0% of anti-HEV IgM positive samples can thus be attributed to a recent infection since all pigs had attained slaughter age. Studies showing a higher prevalence of anti-HEV IgM antibodies compared to IgG are rare in the literature. However, a study published by Seminati *et al.* (2008) shows that pigs older than 12 weeks of age have a higher IgM seroprevalence (50%), compared to IgG seroprevalence (33.9%) [19].

Though the Northern and the western regions are not the main markets for pig trading in Cameroon, they however constitute the major towns from which live pigs are obtained [20]. A significant difference was noted in the seroprevalence of HEV within the two regions of Cameroon similarly to reports by García-Hernández *et al.* [16] where higher seroprevalence was noted in the Northern part of the country. In depth studies are required in order to determine the seroprevalence of this infection in other regions of the country where pig farming is of less economic importance or where farming practices differ since high

population density, and shorter production cycles have been shown to significantly increase the risk for HEV infection [20].

In Cameroon, although hepatitis of viral origin is widely recognized, HEV remains largely unknown because of the lack of investigation on the disease as well as limited data on HEV infection in animals and humans. Today, only three HEV seroprevalence studies have been conducted in humans in Cameroon [2,21,22]. In animals, one study was conducted on the genome characterization of HEV in Cameroonian pigs [23] while no study had yet been performed on the seroprevalence of HEV in this population. Our study reported a high seroprevalence of recent HEV infection in pigs and thus pigs could be considered the reservoir of the disease with the possibility to transfer the infection to humans. Moreover, there has been a previous detection of HEV genotype 3 in pigs from Cameroon [23] who have been incriminated in zoonotic transmission and could thus support this hypothesis.

Conclusion

In Cameroon, HEV seroprevalence in pigs is high. Importantly, our study showed the highest seroprevalence of the recent HEV infection (presence of IgM alone). Thus, future studies are required to confirm the high seroprevalence of anti-HEV IgM in pigs and the probability of pig-to-human zoonotic transmission.

Acknowledgements

We would like to thank Kenmoe Sebastien for statistical analyses and all the staff of Centre Pasteur who participated in specimen collection. This work was supported by the WHO IDENTIFY project and the Centre Pasteur of Cameroon (CPC).

References

1. Kim JH, Nelson KE, Panzner U, Kasture Y, Labrique AB, Wierzbica TF (2014) A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC Infect Dis* 14: 308.
2. Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, Phillips RO, Burchard G, van Lunzen J, Jochum J, Chadwick D, Awasom C, Claussen L, Drosten C, Drexler JF, Eis-Hübinger AM (2013) Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and

- Cameroon. *J Clin Virol Off Publ Pan Am Soc Clin Virol* 58: 18–23.
3. Widén F (2016) Hepatitis E as zoonosis. *Adv Exp Med Biol* 948: 61–71.
 4. Li TC, Yoshizaki S, Zhou X, Sentsui H, Shirato K, Matsuyama S, Melaku SK, Bazartseren B, Takeda N, Wakita T (2017) Serological evidence of hepatitis E virus infection in dromedary camels in Ethiopia. *J Virol Methods* 246: 34–37.
 5. Sridhar S, Teng J, Chiu T-H, Lau S, Woo P (2017) Hepatitis E virus genotypes and evolution: Emergence of camel hepatitis E variants. *Int J Mol Sci* 18: 869.
 6. Spahr C, Knauf-Witzens T, Vahlenkamp T, Ulrich RG, John R (2018) Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. *Zoonoses Public Health* 65: 11–29.
 7. Guthmann J-P, Klovdal H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou J-Y, Tatay M, Diaz F, Moren A, Grais RF, Ciglenecki I, Nicand E, Guerin PJ (2006) A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 42: 1685–1691.
 8. Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, Yamabe H, Mishiro S, Kinoshita Y (2004) Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74: 67–70.
 9. Lee G-H, Tan B-H, Teo EC-Y, Lim S-G, Dan Y-Y, Wee A, Aw PPK, Zhu Y, Hibberd ML, Tan C-K, Purdy MA, Teo C-G (2016) Chronic infection with camelid hepatitis E virus in a liver transplant recipient who regularly consumes camel meat and milk. *Gastroenterology* 150: 355-357.e3.
 10. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, Teo CG (2006) Transfusion-transmitted hepatitis E in a “nonhyperendemic” country. *Transfus Med* 16: 79–83.
 11. Pourbaix A, Ouali N, Soussan P, Roque Afonso AM, Péraldi M-N, Rondeau E, Peltier J (2017) Evidence of hepatitis E virus transmission by renal graft. *Transpl Infect Dis* 19: e12624.
 12. Adelabu OA, Chuks Iweriebor B, Nwodo UU, Obi LC, Okoh AI (2017) Incidence and molecular characterization of hepatitis E virus from swine in eastern cape, South Africa. *Adv Virol* 2017: 1073253.
 13. 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.
 14. Foray C, Dellagi K, Pascalis H, Temmam S, Porphyre V, Rasamoelina-Andriamanivo H, Besnard L, Pavio N, Andriamandimby SF, Cardinale E, Héraud J-M (2013) High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 88: 329–338.
 15. Crossan C, Grierson S, Thomson J, Ward A, Nunez-Garcia J, Banks M, Scobie L (2015) Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect* 143: 2237–2240.
 16. Garcia-Hernández ME, Cruz-Rivera M, Sánchez-Betancourt JI, Rico-Chávez O, Vergara-Castañeda A, Trujillo ME, Sarmiento-Silva RE (2017) Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res* 13: 280.
 17. Salines M, Andraud M, Rose N (2017) From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res* 48: 31.
 18. Clement M, Olumide O (2016) Serological evidence and risk factors associated with hepatitis E virus infection in pigs and human at an intensive piggyery complex, Lagos Nigeria. *J Health Commun* 1: 5.
 19. Seminati C, Mateu E, Peralta B, de Deus N, Martin M (2008) Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* 175: 130–132.
 20. Adlhoeh C, Kaiser M, Kingsley MT, Schwarz NG, Ulrich M, de Paula VS, Ehlers J, Löwa A, Daniel AM, Poppert S, Schmidt-Chanasit J, Ellerbrok H (2013) Porcine hokovirus in domestic pigs, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 19: 2060–2062.
 21. Amougou Atsama M, Atangana PJA, Noah Noah D, Moundipa PF, Pineau P, Njouom R (2017) Hepatitis E virus infection as a promoting factor for hepatocellular carcinoma in Cameroon: preliminary observations. *Int J Infect Dis* 64: 4–8.
 22. Demanou M, Mahamat A, Nimpa MM, Njouom R (2013) First documented outbreak of Hepatitis E in Northern Cameroon. *Ann Trop Med Public Health* 6: 682–683.
 23. S de Paula V, Wiele M, Mbunkah AH, Daniel AM, Kingsley MT, Schmidt-Chanasit J (2013) Hepatitis E virus genotype 3 strains in domestic pigs, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 19: 666–668.

Corresponding author

Dr Richard NJOUOM, PhD
 Head of the Virology Unit,
 Centre Pasteur of Cameroon, 451, Street 2005, B P: 1274,
 Yaounde, Cameroon.
 Phone: +237-222-231-803
 Fax: +237-222-231-564
 Email: njouom@pasteur-yaounde.org

Conflict of interests: No conflict of interests is declared.



Detection of hepatitis E virus antibodies among Cercopithecidae and Hominidae monkeys in Cameroon

Abdou Fatawou Modiyinji^{1,2} | Marie Amougou Atsama¹ | Gwladys Monamele Chavely¹ | Moïse Nola² | Richard Njouom¹

¹Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon

²Department of Animals Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon

Correspondence

Richard Njouom, Centre Pasteur of Cameroon, Department of Virology, P.O Box 1274, Yaoundé, Cameroon.
Emails: njouom@pasteur-yaounde.org; njouom@yahoo.com

Abstract

We screened hepatitis E from 15 species of non-human primates. Anti-HEV IgG was detected in 11.1% (1/9) *Mandrillus sphinx*, 14.3% (2/14) *Gorilla gorilla*, 5.9% (4/67) *pan troglodytes* and 8.7% (2/23) *Mandrillus leucophaeus*, whereas anti-HEV IgM was detected in 1.5% (1/18) *papio Anubis*, 28.6% (2/7) *Cercocebus agilis* and 1.5% (1/67) *pan troglodyte*.

KEYWORDS

Cameroon, hepatitis E virus, non-human primates

1 | INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) represents an important public health concern in many developing countries particularly in Asia, Middle East and Africa.¹ HEV is responsible for about 20 million infections, and 3.3 million symptomatic cases of hepatitis E are detected worldwide each year, with an estimated 44 000 deaths in 2015.^{2,3} Some countries in Africa, Asia and America frequently experience outbreaks of waterborne hepatitis E.^{4,5} In areas where hepatitis E is rare, sporadic cases are thought to be due to the zoonotic spread of HEV by animals, probably through the consumption of undercooked meat.⁶ HEV belongs to the family Hepeviridae, which taxonomically is divided to genera Orthohepevirus (all mammalian and avian HEV isolates) and Piscihepevirus (cutthroat trout virus) while species within the genus Orthohepevirus are assigned Orthohepevirus A-D. The species Orthohepevirus A comprises genotypes HEV-1 to HEV-4 and HEV-7 which are human pathogenic. Out of these, HEV-3, HEV-4 and HEV-7 are zoonotic pathogens, with wild boar, domestic pig, rabbit, deer and dromedary representing their reservoirs.⁷ In contrast, little is known about HEV infections in non-human primates (NHP); meanwhile, several activities involve contact between humans and NHP and could have as consequence the transmission of several microorganisms including HEV. Activities that have been reported with increased exposure to NHP in Cameroon comprises: keeping NHP as pets, hunting, butchering and eating NHP.⁸ Thus, hypothesizing a risk of transmission of HEV in forest zones through consumption

of undercooked meat derived from infected animals. Rare studies have been conducted in NHP in China,⁹ Japan,¹⁰ Germany¹¹ and Italy¹² and have shown the presence of anti-HEV antibodies in this population. As is the case in many African countries, no information is available on the prevalence of HEV infection in NHP species in Cameroon. Therefore, the objective of our study was to investigate if HEV infection occurs within various species of NHP in Cameroon.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sample

NHP plasmas used in this study were from previous studies designed to document viral infections in various species of NHP in Cameroon.^{13,14} Briefly, these samples were collected from 1997 to 2006 from wild-born orphaned monkeys living mainly in the southern rain forest areas of Cameroon. These animals have been transferred to zoos or rescue centres, generally after their mothers had been killed by hunters. On arrival, they were put into quarantine and samples collected for routine veterinary screenings, including HBV detection. This screening was performed to note serological status of animals in the wild before any contact with the other animals in these centres. Healthy animals were then integrated into specific communities. The animals included in this study were cared for and used humanely. Plasmas collected on EDTA tubes were sent to the Centre Pasteur of Cameroon (CPC)

for analyses.¹³ The subspecies origin of chimpanzees was determined by mitochondrial DNA (mtDNA) analysis as described previously.¹⁵ Overall, there were 172 samples corresponding to 15 species of NHP selected for this study.

2.2 | Detection of Anti-HEV IgG and IgM antibodies

The presence of anti-HEV immunoglobulins (Ig) G and M was assessed using a commercially available enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): HEV IgG ELISA and HEV IgM ELISA 3.0 kits (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd). The test was carried out according to the manufacturer's instructions as previously described¹⁶ elsewhere. For each analysis, positive and negative controls, provided with the kit, were used. The cut-off value was set at 0.5 for IgG and 0.4 for IgM added to the mean absorbance of the non-reactive controls.

3 | RESULTS

Overall, two families of NHP were represented: Hominidae (47.1%; 81/172) and Cercopitheidae (52.9%; 91/172). Nine (5.2%) serum samples were positive for anti-HEV IgG antibodies, while 4/172 (2.3%) were positive for anti-HEV IgM (4/172). The Hominidae had a higher prevalence of IgG antibodies (6/81) while the Cercopitheidae had a higher proportion of IgM antibodies (3/91). Specifically, anti-HEV IgG was detected in 1 of 9 (11.1%) *Mandrillus sphinx*, 2 of 14 (14.3%) *Gorilla gorilla*, 4 of 67 (5.9%) *Pan troglodytes* and 2 of 23 (8.7%) *Mandrillus leucophaeus*, respectively. Anti-HEV IgM was detected in 1 of 18 (5.5%) *Papio anubis*, 2 of 7 *Cercocebus*

agilis (28.6%) and 1 of 67 (1.5%) *pan troglodytes*, respectively. We did not find NHP with both IgG and IgM antibodies. Table 1 shows the prevalence of anti-HEV IgG and IgM antibodies in the different species of NHP.

4 | DISCUSSION

We document here the first report of anti-HEV antibodies among NHP in Cameroon, which has much contact with humans in the forest zones and thus could be a reservoir for HEV infection. Four NHP species had serologic markers of past HEV infection: chimpanzees, gorilla, drill and mandrill. A previous study also showed the presence of anti-HEV IgG antibodies among gorilla and drill in Germany.¹¹ Some studies have shown the presence of anti-HEV IgG antibodies in other species of non-human primates, including the Japanese monkeys, rhesus monkeys, cynomolgus monkeys, Taiwanese monkey and white-naped mangabey.^{9,10,12} Meanwhile three NHP in this study had IgM markers indicative of recent HEV infection, that is, chimpanzee, olive baboon and agile mangabey. Very few studies have been able to detect HEV IgM antibodies in NHP. In China, a study showed the presence of anti-HEV IgM (0.44%; 3/92) in *rhesus monkey* in 2011.⁹ The main limitation of this study was the fact HEV RNA levels were not checked in samples that were positive to the serological assays particularly for the IgM. Despite this limit, this study brings light to the fact that NHP might be reservoirs of HEV infection especially in forest zones. In line with the WHO global hepatitis goals of reducing 90% of new viral hepatitis infections by 2030,¹⁷ reducing HEV infection in other hosts including NHP could as well be a target for populations that live in close contact with humans.

TABLE 1 Prevalence of anti-HEV IgG and IgM antibodies in various species of non-human primates (NHP)

Family	Common names	Species	Anti-HEV IgG n/N (%)	Anti-HEV IgM n/N (%)
Hominidae	Chimpanzee	<i>Pan troglodytes</i>	4/67 (5.9)	1/67 (1.5)
	Gorilla	<i>Gorilla gorilla</i>	2/14 (14.8)	0/14
Cercopitheidae	Drill	<i>Mandrillus leucophaeus</i>	2/23 (8.7)	0/23
	Mandrill	<i>Mandrillus sphinx</i>	1/9 (11.1)	0/9
	Olive baboon	<i>Papio anubis</i>	0/18	1/18 (5.5)
	Patas monkey	<i>Erythrocebus patas</i>	0/4	0/4
	De Brazza's monkey	<i>Cercopithecus neglectus</i>	0/2	0/2
	Red-eared monkey	<i>Cercopithecus erythrotis</i>	0/4	0/4
	Putty-nosed monkey	<i>Cercopithecus nictitans</i>	0/8	0/8
	Mona monkey	<i>Cercopithecus mona</i>	0/4	0/4
	Vervet monkey	<i>Cercopithecus aethiops</i>	0/2	0/2
	Moustached monkey	<i>Cercopithecus cephus</i>	0/2	0/2
	Collared mangabey	<i>Cercocebus torquatus</i>	0/7	0/7
	Agile mangabey	<i>Cercocebus agilis</i>	0/7	2/7 (28.6)
	Black colobus	<i>Colobus satanus</i>	0/1	0/1
Total			9/172 (5.2)	4/172 (2.3)

Abbreviations: %, prevalence; n, number of positive; N, number tested.

5 | CONCLUSION

These results show a wide distribution of HEV in different species of NHP in Cameroon. Future studies should evaluate other potential sources of this infection and their impact on human health.

ACKNOWLEDGMENTS

We acknowledge all zoos and primate keeping institutions which provided non-human primate sera and information for this study. The study was financially supported by the Centre Pasteur of Cameroon.

ORCID

Richard Njouom  <https://orcid.org/0000-0001-6706-3012>

REFERENCES

- Aggarwal R, Krawczynski K. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J Gastroenterol Hepatol*. 2000;15(1):9-20.
- Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012;55(4):988-997.
- WHO, Hepatitis E. 2018.
- Echevarría JM, González JE, Lewis-Ximenez LL, et al. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol*. 2013;85(6):1037-1045.
- Viswanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study-epidemiology 1957. *Natl Med J India*. 2013. 26(6):362-377.
- Dalton HR, Izopet J. Transmission and Epidemiology of Hepatitis E Virus Genotype 3 and 4 Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018.
- Smith DB, Simmonds P, Jameel S, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol*. 2014;95(Pt 10):2223-2232.
- Wolfe ND, Prosser AT, Carr JK, et al. Exposure to nonhuman primates in rural Cameroon. *Emerg Infect Dis*. 2004;10(12):2094-2099.
- Huang F, et al. Seroepidemiology and molecular characterization of hepatitis E Virus in *Macaca mulatta* from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat Mon*. 2011;11(9):745-749.
- Hirano M, et al. 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*. 2003;56(1):8-11.
- Spahr C, Knauf-witzens T, Dähnert L, et al. Detection of HEV-specific antibodies in four non-human primate species, including great apes, from different zoos in Germany. *Epidemiol Infect*. 2018;146(1):119-124.
- Melegari I, Di Profio F, Marsilio F, et al. Serological and molecular investigation for hepatitis E virus (HEV) in captive non-human primates. *Italy. Virus Res*. 2018;251:17-21.
- Foupouapouognigni Y, Mba SA, Njouom R. Prevalence of hepatitis B virus infection among Cercopithecidae monkeys in Cameroon. *J Med Primatol*. 2011;40(3):194-196.
- Njouom R, Mba S, Nerrienet E, Foupouapouognigni Y, Rousset D. Detection and characterization of hepatitis B virus strains from wild-caught gorillas and chimpanzees in Cameroon. *Central Africa Infect Genet Evol*. 2010;10(6):790-796.
- Nerrienet E, Santiago ML, Foupouapouognigni Y, et al. Simian immunodeficiency virus infection in wild-caught chimpanzees from Cameroon. *J Virol*. 2005;79(2):1312-1319.
- Modiyinji AF, Atsama MA, Monamele GC, Nola M, Njouom R. High seroprevalence of hepatitis E among pigs suggests an animal reservoir in Cameroon. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12(08):676-679.
- WHO. Global health sector strategy on viral hepatitis 2016-2021. 2016.

How to cite this article: Modiyinji AF, Amougou Atsama M, Monamele Chavely G, Nola M, Njouom R. Detection of hepatitis E virus antibodies among Cercopithecidae and Hominidae monkeys in Cameroon. *J Med Primatol*. 2019;00:1-3. <https://doi.org/10.1111/jmp.12430>

Seroprevalence of hepatitis E virus antibodies in different human populations of Cameroon

Abdou F. Modiyinji^{1,2} | Marie Amougou-Atsama^{1,2} | Chavely G. Monamele¹ |
Moïse Nola² | Richard Njouom¹ 

¹Virology Department, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon

²Department of Animals Biology and Physiology, Faculty of Science, University of Yaoundé 1, Yaoundé, Cameroon

Correspondence

Richard Njouom, Virology Department, Centre Pasteur of Cameroon, 451 St 2005 Yaoundé 2, 1274 Yaoundé, Cameroon.
Email: njouom@pasteur-yaounde.org

Funding information

WHO IDENTIFY project; Centre Pasteur of Cameroon

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is a major cause of acute hepatitis worldwide. HEV infection is self-limiting, but fulminant hepatitis may occur with higher mortality rates. The aim of this study was to determine the seroprevalence of the HEV in three different populations in Cameroon and to assess alimentary risk factors of infection. A total of 903 individuals including 450 elderly people, 183 pregnant women, and 270 HIV-infected patients were enrolled during 2009-2015. All sera obtained were tested for the presence of anti-HEV antibodies with commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits. The association between initial anti-HEV status and potential risk factors was assessed. Out of the 903 samples, 22.0% (199/903) were positives for anti-HEV immunoglobulin M (IgM), 5.8% (52/903) for anti-HEV IgG, and 3.5% (32/903) for both. The seropositivity for IgM was 7.0%, 13.1%, and 34.7%; meanwhile, the seropositivity for immunoglobulin G was 8.5%, 3.3%, and 5.1%, in HIV-infected patients, pregnant women, and the elderly population, respectively. Both antibodies were detected simultaneously in 2.2%, 1.6%, and 5.1% in HIV-infected patients, pregnant women, and the elderly population, respectively. No risk factors were significantly associated with HEV infection in these populations. This study showed a high prevalence of anti-HEV antibodies in three different populations in Cameroon.

KEYWORDS

antibodies, Cameroon, hepatitis E virus, seroprevalence

1 | INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is a single-stranded virus belonging to the family Hepeviridae and genus Orthohepevirus.¹ HEV is an emerging infectious agent that causes acute viral hepatitis worldwide.² It is estimated that more than 20 million cases of HEV infections are reported each year worldwide with approximately 44 000 deaths representing 3.3% of the mortality due to viral hepatitis.³ Some countries in Africa and Asia frequently experience outbreaks of waterborne hepatitis E due to fecal contamination of drinking water.^{4,5}

HEV infection is usually self-limiting and resolves within 2 to 6 weeks³ but in some cases, fulminant hepatitis may occur especially in at-risk groups, such as the elderly, pregnant women, patients with

pre-existing liver disease or those who are immunocompromised with higher mortality rates.⁶ There are conflicting reports concerning the susceptibility of these risk groups to HEV infection from different areas of the world especially regarding the elderly population and immunocompromised patients.⁷⁻¹⁰ Previous studies from Cameroon have indicated the circulation of HEV, with two studies reporting data from persons with liver disease and HIV-infected patients. The study conducted by Feldt et al¹¹ in 2013 reported HEV prevalence of 14.2% in adult HIV-infected patients. Meanwhile, the study by Amougou et al¹² in 2017 reported a prevalence of 41.8% and 12.6% in hepatocellular carcinoma patients and in nonhepatocellular carcinoma subjects, respectively. Although there is no general population study performed in Cameroon, the report on nonhepatocellular carcinoma subjects

indicates a high circulation of HEV as well in the general population. However, risk factors for infection were not assessed. The aim of this study was to determine the seroprevalence of the HEV in three different populations in Cameroon: HIV-infected patients, pregnant women, and an elderly population. Since HEV infection in resource-limited settings is mostly transmitted by the fecal-oral route, alimentary risk factors of infection were also assessed.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Study population and setting

In a cross-sectional study conducted in 2018, plasma samples collected in the South and the Center region of Cameroon were analyzed. These samples were collected between 2009 and 2015 and represent three populations including HIV-infected persons, pregnant women, and an elderly population.

In March 2009, samples of the elderly (≥ 60 years) were collected in Ebolowa, South Cameroon to define the risk factors for hepatitis C virus infection in a previous study.¹³ A total of 450 samples were randomly selected as part of our study.

From January to September 2014, a prospective study was conducted and included 270 consecutive HIV-infected patients from the Yaounde Central Hospital, Yaounde University Hospital Center and Cité Verte District Hospital, all located in the Center region of the country.

From March to December 2015, a prospective study was conducted and included 183 pregnant women who came for prenatal consultation in a private hospital (Nkoabang Catholic Dispensary) in Yaoundé.

2.2 | Sampling and serological analysis

Venous blood was collected from all participants in EDTA tubes and transported in a refrigerated icebox to Centre Pasteur of Cameroon (CPC). Once in CPC, whole blood was processed to obtain plasma and stored at -20°C until analysis. All samples were tested for the presence of anti-HEV antibodies with an enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA): HEV immunoglobulin G (IgG) ELISA and HEV immunoglobulin M (IgM) ELISA 3.0 kits (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd, Singapore; formerly Genelabs Diagnostics Pte). The test was carried out according to the manufacturer's instructions and assay validity was evaluated according to the manufacturer's specifications as previously described.¹⁴

2.3 | Data analysis

The association between initial anti-HEV status and potential risk factors was assessed using the χ^2 test. Microsoft Excel 2007 and SPSS version 21 software were used to process, analyze, and plot data. For comparisons, all $P \leq .05$ were considered statistically significant.

2.4 | Ethical considerations

All participants signed written informed consent and agreed to provide study samples. This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee for Human Health of the Catholic University of Central Africa. Administrative authorization was also obtained from all hospitals.

3 | RESULTS

3.1 | Seropositivity of anti-HEV antibodies

A total of 903 plasmas were collected and tested including three different populations (270 HIV-infected patients, 183 pregnant women, and 450 elderly persons). Overall, 283 samples (31.3%; 95% confidence interval: 28.4%-34.4%) were positive for at least one of the serological markers of HEV infection. Amongst these, 22.0% (199/903) were positives for anti-HEV IgM, 5.8% (52/903) for anti-HEV IgG, and 3.5% (32/903) for both. Within the population of HIV-infected patients, 17.8% (48/270) were positive for at least one serological marker. Of these, the percentage of IgM positivity was 7.0%; meanwhile, 8.5% were seropositive to anti-HEV IgG and 2.2% had both markers (Table 1). The seropositivity of IgM and IgG does not show statistically significant differences by sex, age, and CD4 count ($P > .05$) (Table 2).

Among pregnant women, 18.0% (33/183) were positive to at least one of the serological markers of HEV infection. Percentage positivity of the different markers was 13.1% for IgM, 3.3% for IgG, and 1.6% for both (Table 1). The seropositivity of IgM and IgG does not show statistically significant differences by age ($P > .05$) (Table 2).

Among elderly people, 45.0% (202/450) were seropositive to at least one of the HEV serological markers. Seropositivity to IgM was 34.7%, 5.1% to IgG, and 5.1% were positive to both (Table 1). The seropositivity of IgM and IgG does not show statistically significant differences by sex and age ($P > .05$) (Table 2).

Regarding alimentary risk factors, none were significantly associated with HEV infection in all populations ($P > .05$). Tables 2 shows the seropositivity of anti-HEV IgG and IgM antibodies and risk factors in HIV-infected patients, pregnant women and the elderly population enrolled in this study.

4 | DISCUSSION

This study reports the seropositivity of HEV infection in three risk groups which are susceptible to fulminant hepatitis. In pregnant women and HIV-infected patients, IgM seropositivity (13.1% for pregnant women and 7.0% HIV-infected patients) were $< 25\%$, while in the elderly population, higher proportions were noted (34.7%); meanwhile all three groups had anti-HEV IgG seropositivity below 25% (3.3% for pregnant women, 8.5% for HIV-infected patients and 5.1% Elderly population). Cameroon could thus be considered

TABLE 1 Results of detection of specific anti-HEV antibodies

	Elderly population n (%)	Pregnant women n (%)	HIV-infected patients n (%)	Total N (%)
No. of participants	450	183	270	903
Anti-IgM and/or IgG positive	202 (44.9)	33 (18.0)	48 (17.8)	283 (31.3)
Anti-IgM positive and IgG negative	156 (34.7)	24 (13.1)	19 (7.0)	199 (22.0)
Anti-IgG positive and IgM negative	23 (5.1)	6 (3.3)	23 (8.5)	52 (5.8)
Anti-IgM and IgG positives	23 (5.1)	3 (1.6)	6 (2.2)	32 (3.5)
Anti-IgM and IgG negatives	248 (55.1)	150 (82.0)	222 (82.2)	620 (68.7)

Abbreviations: HEV, hepatitis E virus; IgG: immunoglobulin G, IgM: immunoglobulin M.

endemic for HEV infection since endemic regions represent zones where there is <25% of confirmed HEV cases in sporadic non-A and non-B hepatitis.¹⁵ Our study is not the first study to show the high seropositivity to IgM (22.0%) compared with IgG (5.4%) in Cameroon. A study published in people suspected of yellow fever had already shown high seropositivity to IgM (10.8%) compared with IgG (2.7%).¹⁶ The high seropositivity to IgM among the elderly shows that there was possibly an outbreak of HEV infection whose origin was unknown. However, the study published in Ghana in 2010 among people of several age groups shows seropositivity of IgM (27.7%) higher than the seropositivity of IgG (18.8%) in people over 60 years age.¹⁷ Higher seroprevalences between 23.8% and 26.1% of IgG antibodies have been reported by other studies involving the elderly (≥ 60 years).^{8,18} Due to the fact that HEV generally causes a subclinical or mild infection, the cases of acute infection found in this study probably had no notable clinical manifestations. A possible cause of high IgM seropositivity may be cross-reactivity. Previous studies show that acute infection by cytomegalovirus or Epstein-Barr virus may induce false reactivity to anti-HEV IgM in laboratory tests commonly used for hepatitis E diagnosis.^{19,20} Further studies including HEV-RNA detection are required to confirm the acute infection of HEV in these populations. Varying anti-HEV IgM and IgG seropositivity rates have been observed by other studies from around Africa. Recent studies published in Nigeria and in the Central African Republic show lower seropositivity of IgM antibodies (1.3% for Nigeria and 7.5% for CAR) compared with that found in our study (7.0%). On the other hand, the seropositivity of IgG found in these studies (30% for Nigeria and 68% for CAR) are higher than that found in our study (8.5%).^{9,21} In Cameroon, a study conducted in HIV-infected patients in Bamenda (North-West Region) shows higher IgG seropositivity (11.1%) than found in our study (8.5%) and lower IgM seropositivity (0%) than ours (7.0%).

Among pregnant women, the overall HEV seropositivity (18.0%) was higher than the result of the study done in Gabon (14.1%),²² but lower than that reported among pregnant women in Ghana (28.6%).²³ Our finding showed that the seropositivity of IgM obtained in our study (13.1%) was lower than the 64.4% reported in Ghana²³ but higher than that obtained in Ethiopia (0.5%).²⁴ Meanwhile, the prevalence of anti-HEV IgG antibodies in the present study was lower (3.3%) than that reported in other African countries which varied between 12% and 59%.²²⁻²⁶ The disparities in prevalence observed between these studies could be attributed to the differences in

population studied and by the use of different serology tests with varying sensitivities since no gold standard exists for the detection of HEV infection.

Our study showed that both antibodies were detected simultaneously in 3.5% (32/903) samples. This seropositivity is lower than that found in 2013 in northern Cameroon, which was 78.4% (29/37).¹⁶

It is important to note that MP Diagnostics HEV ELISA kit used in this study is one among many tests that can be used to screen for HEV. Some developed countries used this assay as well in screening for HEV.²⁷⁻²⁹ Since no gold standard test exist for the screening of HEV, comparisons between studies are difficult due to differences in the HEV antibody detection assays used and the demographics of the population studied; and thus must be interpreted with caution.²⁸

None of the socio-demographic and alimentary risk factors were associated with HEV seroprevalence in all three populations. This result is similar to that of Jardi et al³⁰ who did not find an association between socio-demographic data of HIV-infected persons and HEV infection. This study did not find an association between pork or well water consumption and HEV seropositivity contrarily to other studies.³¹ Pork consumption was twice lower in women with positive anti-HEV serology as compared with women with negative serology. Some authors reported a higher prevalence of HEV infection among women with a lower level of education²⁴ and in the last trimester of pregnancy,^{23,32} however, the present study did not have sufficient data to verify this hypothesis. Similarly, hand hygiene did not correlate with HEV infection highlighting that there might be other routes of HEV infection in Cameroon not linked to the fecal-oral route. Within the population of HIV-infected patients, CD4 counts did not correlate with HEV seropositivity. The same results were obtained in a study conducted in northwestern Cameroon.¹¹ In contrast, Debes et al³³ in Argentina had shown a correlation between low CD4 counts and the high prevalence of anti-HEV antibodies.

The lack of association to socio-demographic and alimentary risk factors could highlight the fact that HEV infection in Cameroon is not waterborne or caused by the fecal-oral route contrarily to that reported in resource-limited settings.³⁴ This could be due to sensitization campaigns on hygiene that have been carried out in Cameroon following outbreaks of several infectious diseases including cholera. Infection in Cameroon is likely due to the consumption of undercooked meat as hypothesized in other developed countries. The former confirmation of

TABLE 2 Prevalence of HEV markers by demographic and alimentary risk factors within different population

Characteristic	Anti-HEV IgM			Anti-HEV IgG			IgM and IgG		
	n/N	%	P value	n/N	%	P value	n/N	%	P value
HIV-infected patients									
Sex									
M	2/88	2.3	.6	5/88	5.7	.3	2/88	2.3	.9
F	17/182	9.3		18/182	10.0		4/182	2.2	
Age range									
20-29	4/68	5.9	.1	5/68	7.3	.1	1/68	1.5	.3
30-39	6/92	6.5		7/92	7.6		2/92	2.2	
40-49	3/69	4.3		6/69	8.7		2/69	2.9	
≥50	6/41	14.6		5/41	12.2		1/41	2.4	
CD4 counts									
<200	4/33	12.3	.4	4/33	12.3	.2	2/33	6.1	1.0
≥200	3/56	5.4		9/56	16.1		4/56	7.1	
Pork meat consumption									
Yes	15/161	9.5	.3	15/161	9.3	.5	5/161	3.1	.1
No	3/20	15.0		1/20	5.0		1/20	5	
Well water consumption									
Yes	11/83	13.3	.2	10/83	12.1	.1	3/83	3.6	.2
No	8/98	8.1		6/98	6.1		3/98	3.2	
Hand cleaning after toilet									
Yes	10/106	9.4	.07	6/106	5.7	.1	4/106	3.8	.7
No	9/75	12		10/75	13.3		2/75	2.7	
Total	19/270	7.0		23/270	8.5		6/270	2.2	
Pregnant women									
Age range									
≤20	4/25	16	.3	1/25	4	.5	1/25	4.0	.9
21-30	13/121	10.7		3/121	3.3		1/121	0.8	
>30	7/37	18.9		2/37	5.4		1/37	2.7	
Pork meat consumption									
Yes	14/130	10.8	.1	4/130	3.1	.9	2/130	1.5	1.0
No	10/53	18.9		2/53	3.8		1/53	1.9	
Well water consumption									
Yes	11/78	14.1	1.0	2/78	2.5	1.0	1/78	1.3	.4
No	13/105	12.4		4/105	3.8		2/105	1.9	
Consumption of raw vegetables									
Yes	8/56	14.3	.9	2/56	3.6	1.0	1/56	1.8	1.0
No	16/127	12.6		4/127	3.2		2/127	1.6	
Contact or pig farm									
Yes	10/57	17.5	.3	2/57	3.5	1.0	2/57	3.5	.9
No	14/126	11.1		4/126	3.2		1/126	0.8	
Hand washing before food handling									
Yes	14/93	15.1	.7	4/93	4.3	.5	1/93	1.1	.7
No	10/90	11.1		2/90	3.3		2/90	2.2	
Total	24/183	13.1		6/183	3.3		3/183	1.6	
Elderly population									
Sex									
M	64/177	36.2	.3	22/177	12.4	.8	12/177	6.8	.1
F	92/273	33.7		24/273	8.8		11/273	4.0	
Age range									
60-69	81/221	36.6	.7	11/221	5.0	.2	9/221	4.1	.2
70-79	56/168	33.3		10/168	6.0		12/168	7.1	
≥80	19/61	31.2		2/61	3.3		2/61	3.3	
Total	156/450	34.7		23/450	5.1		23/450	4.9	

Abbreviations: HEV, hepatitis E virus; IgG: Immunoglobulin G, IgM: Immunoglobulin M, M: Male, F: Female, n: Number positive, N: Number tested.

HEV genotype 3 virus amongst pigs in Cameroon³⁵ which is the common cause of the zoonotic pathogen brings more light to this fact though it was found in only a few cases (0.9%; 3/345). Further studies are required to confirm the route of transmission of HEV infection among different populations in Cameroon.

5 | CONCLUSION

This study showed the presence of anti-HEV antibodies in three different human populations in Cameroon. The high seroprevalence of HEV obtained emphasizes more on the endemicity of this infection in Cameroon. These results demonstrate that alimentary risk factors are not associated with the prevalence of this infection. Further studies are required to understand the epidemiology of this infection in Cameroon.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to acknowledge the Cameroonian Ministry of Public Health for providing approvals for field research and all the staff of the virology department of Centre Pasteur of Cameroon. This study was funded by the Centre Pasteur of Cameroon and the WHO IDENTIFY project.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

ORCID

Richard Njouom  <http://orcid.org/0000-0003-3112-6370>

REFERENCES

- Dalton HR, Izopet J. Transmission and epidemiology of hepatitis E virus genotype 3 and 4 infections. *Cold Spring Harbor Perspect Med*. 2018;8:a032144.
- Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012;55(4):988-997.
- World Health Organization. Hepatitis E. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>. Accessed, 2018.
- Echevarria JM, Gonzalez JE, Lewis-Ximenez LL, et al. Hepatitis E virus infection in Latin America: a review. *J Med Virol*. 2013;85(6):1037-1045.
- Viswanathan R. Infectious hepatitis in Delhi (1955-56): a critical study-epidemiology. 1957. *Natl Med J India*. 2013;26(6):362-377.
- Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Hepatitis E: an old infection with new implications. *Blood Transfus*. 2015;13(1):6-17.
- Dalton HR, Fellows HJ, Gane EJ, et al. Hepatitis E in new zealand. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(8):1236-1240.
- Dalton HR, Stableforth W, Thurairajah P, et al. Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications, and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. 2008;20(8):784-790.
- Demi Sibiro OA, Manirakiza A, Kommas NP. Seroprevalence of hepatitis E virus infection among people living with HIV in the Central African Republic. *Open Forum Infect Dis*. 2018;5(12):ofy307.
- Jacobs C, Chiluba C, Phiri C, et al. Seroprevalence of hepatitis E virus infection in an urban population in Zambia: strong association with HIV and environmental enteropathy. *J Infect Dis*. 2014;209(5):652-657.
- Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, et al. Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon. *J Clin Virol*. 2013;58(1):18-23.
- Amougou Atsama M, Atangana PJA, Noah Noah D, Moundipa PF, Pineau P, Njouom R. Hepatitis E virus infection as a promoting factor for hepatocellular carcinoma in Cameroon: preliminary observations. *Int J Infect Dis*. 2017;64:4-8.
- Pepin J, Lavoie M, Pybus OG, et al. Risk factors for hepatitis C virus transmission in colonial Cameroon. *Clin Infect Dis*. 2010;51(7):768-776.
- Modiyinji AF, Nola M, Monamele GC, Atsama MA, Njouom R. High seroprevalence of hepatitis E among pigs suggests an animal reservoir in Cameroon. *J Infect Dev Ctries*. 2018;12(08):676-679.
- Al-Sadeq DW, Majdalawieh AF, Nasrallah GK. Seroprevalence and incidence of hepatitis E virus among blood donors: a review. *Rev Med Virol*. 2017:e1937.
- Demanou M, Mahamat A, Nimpa MM, Njouom R. First documented outbreak of hepatitis E in Northern Cameroon. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*. 2013;6(6):682-683.
- Adjei AA, Tettey Y, Aviyase JT, Adu-Gyamfi C, Mingle JA, Nartey ET. Unexpected elevated alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase levels, and hepatitis E virus infection among persons who work with pigs in Accra, Ghana. *Virol J*. 2010;7:336.
- Faber MS, Wenzel JJ, Jilg W, Thamm M, Hohle M, Stark K. Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany. *Emerging Infect Dis*. 2012;18(10):1654-1657.
- Fogeda M, de Ory F, Avellon A, Echevarria JM. Differential diagnosis of hepatitis E virus, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus infection in patients with suspected hepatitis E. *J Clin Virol*. 2009;45(3):259-261.
- Hyams C, Mabayoje DA, Copping R, et al. Serological cross-reactivity to CMV and EBV causes problems in the diagnosis of acute hepatitis E virus infection. *J Med Virol*. 2014;86(3):478-483.
- Junaid SA, Agina SE, Abubakar KA. Epidemiology and associated risk factors of hepatitis E virus infection in plateau state, Nigeria. *Virology*. 2014;5:15-26.
- Caron M, Kazanji M. Hepatitis E virus is highly prevalent among pregnant women in Gabon, central Africa, with different patterns between rural and urban areas. *Virol J*. 2008;5:158.
- Adjei AA, Tettey Y, Aviyase JT, et al. Hepatitis E virus infection is highly prevalent among pregnant women in Accra, Ghana. *Virol J*. 2009;6:108.
- Abebe M, Ali I, Ayele S, Overbo J, Aseffa A, Mihret A. Seroprevalence and risk factors of hepatitis E Virus infection among pregnant women in Addis Ababa. *Ethiopia*. 2017;12(6):e0180078.
- Stoszek SK, Engle RE, Abdel-Hamid M, et al. Hepatitis E antibody seroconversion without disease in highly endemic rural Egyptian communities. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100(2):89-94.
- Hannachi N, Hidar S, Harrabi I, et al. [Seroprevalence and risk factors of hepatitis E among pregnant women in central Tunisia]. *Pathol Biol*. 2011;59(5):e115-e118.
- Hartl J, Otto B, Madden RG, et al. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Viruses*. 2016;8(8):211.
- Kaufmann A, Kenfak-Foguena A, Andre C, et al. Hepatitis E virus seroprevalence among blood donors in southwest Switzerland. *PLOS One*. 2011;6(6):e21150.
- Vollmer T, Diekmann J, John E, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol*. 2012;50(8):2708-2713.
- Jardi R, Crespo M, Homs M, et al. HIV, HEV, and cirrhosis: evidence of a possible link from eastern Spain. *HIV Med*. 2012;13(6):379-383.

RESEARCH ARTICLE

Open Access



Burden of hepatitis E virus infection in pregnancy and maternofetal outcomes: a systematic review and meta-analysis

Jean Joel Bigna^{1*}, Abdou Fatawou Modiyinji^{2,3}, Jobert Richie Nansseu^{4,5}, Marie A. Amougou^{2,6}, Moïse Nola³, Sébastien Kenmoe², Elvis Temfack⁷ and Richard Njouom²

Abstract

Background: There is still a dearth of knowledge on the burden of HEV infection in the global population of pregnant women. Therefore, we conducted a systematic review and meta-analysis to estimate the global burden of HEV infection in pregnancy.

Methods: We searched PubMed, Embase, Web of Knowledge, and Global Index Medicus to identify articles published until January 26, 2020. We considered cross-sectional, case-control, and cohort studies reporting the immunoglobulins M HEV seroprevalence in asymptomatic and symptomatic (jaundice or elevated transaminases) pregnant women or investigating the association between HEV infection and maternofetal outcomes. We used a random-effects model to pool studies. This review was registered with PROSPERO, CRD42018093820.

Results: For HEV prevalence estimates, we included 52 studies (11,663 pregnant women). The seroprevalence was 3.5% (95% confidence interval: 1.4–6.4) in asymptomatic women (most of whom from high endemic areas). The prevalence in symptomatic women was 49.6% (42.6–56.7) with data only from HEV high endemic countries. In the multivariable meta-regression model, the prevalence was higher in symptomatic women compared to asymptomatic (adjusted prevalence odds ratio [aPOR]: 1.76; 95%CI: 1.61–1.91) and decreased with increasing year of publication (by 10-year) (aPOR: 0.90; 95%CI: 0.84–0.96). The proportion of HEV vertical transmission was 36.9% (13.3–64.2). Risk of bias was low, moderate and high respectively in 12 (23%), 37 (70%), and 4 studies (7%) addressing HEV prevalence estimation. HEV infection was associated with maternal deaths (pooled OR 7.17; 3.32–15.47), low birth weight (OR: 3.23; 1.71–6.10), small for gestational age (OR: 3.63; 1.25–10.49), preterm < 32 weeks (OR: 4.18; 1.23–14.20), and preterm < 37 weeks (OR: 3.45; 2.32–5.13), stillbirth (OR: 2.61; 1.64–4.14), intrauterine deaths (OR: 3.07; 2.13–4.43), and not with miscarriage (OR: 1.74; 0.77–3.90). All studies which assessed the association between HEV infection and maternofetal outcomes had a moderate risk of bias.

(Continued on next page)

* Correspondence: bignarimji@yahoo.fr

¹Department of Epidemiology and Public Health, Centre Pasteur of Cameroon, P.O. Box 1274, Yaoundé, Cameroon

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2020 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

Conclusions: Findings from this study are suggestive of a high burden of HEV infection in pregnancy in high endemic countries, its association with poor maternofetal outcomes, and a high rate of vertical transmission. This study supports the need for specific strategies to prevent exposure of pregnant women to HEV infection, especially in high endemic areas.

Keywords: Hepatitis E, Pregnancy, Women health, Vertical transmission, Maternal deaths, Intrauterine deaths, Miscarriage, Low birth weight, Preterm, Small for gestational age

Background

In 2016, the World Health Organization (WHO) launched a global strategy to halt the transmission of viral hepatitis supporting that people living with viral hepatitis should have access to safe, affordable, and effective prevention, care and treatment services [1]. Specifically, the aims by 2030 are to reduce by 90% the number of new cases of hepatitis, to treat 80% of eligible people infected with viral hepatitis so as to reduce by 65% the number of hepatitis related deaths [1]. Globally, it was estimated that about 1.34 million deaths which occurred in 2015 were due to viral hepatitis, of whom 95% were attributable to hepatitis B and C chronic infections, and those remaining, to hepatitis A and E infections [1, 2]. For the specific case of hepatitis E infection, global estimates indicate that about 20 million new cases of hepatitis E virus (HEV) infections occur each year, 3.3 million of whom are symptomatic [3]. In 2015, WHO reported approximately 44,000 fatal cases of HEV, accounting for about 3.3% of all viral hepatitis related mortality [3].

HEV is a water- and food-borne infection that can potentially cause acute outbreaks in populations with poor sanitation [1, 3]. However, zoonotic and transfusion-related transmission have also been documented [4, 5]. To date, no specific treatment exists for HEV infection; as a consequence, its management relies mostly on supportive care [1, 3]. On the other hand, prevention is oriented towards reducing exposure by improved sanitation, safe food and drinking, and vaccination [1]. Compared to hepatitis B and C, HEV infection is more unlikely to result in chronic liver disease and progression to fulminant hepatitis though rare, is mostly driven by host-specific than virus-specific factors [6]. Nevertheless, fulminant hepatitis occurs more frequently during pregnancy [3].

Mechanisms for fulminant hepatitis during pregnancy include lower CD₄/CD₈ cells ratio and increased levels of steroid hormones [7], reduced progesterone receptor expression, higher interleukin and viral load [8, 9]. Consequently, pregnant women with HEV, particularly those in the second and third trimester, are at higher risk of poor maternofetal outcomes as suggested by narrative reviews of observational studies [3, 9, 10]. However and to the very best of our knowledge, there remains a dearth of knowledge on the burden of HEV infection

among pregnant women living in high endemic countries. Therefore, this systematic review and meta-analysis was conducted to estimate the prevalence of HEV in pregnancy as well as its association with maternofetal outcomes.

Methods

This systematic review was registered in the PROSPERO International Prospective Register of systematic reviews, registration number CRD42018093820. We used the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses guidelines to report this review [11].

Search strategy and selection criteria

We carried-out a comprehensive search on major electronic databases including MEDLINE (through PubMed), EMBASE, Web of Knowledge, and Global Index Medicus to identify relevant studies on HEV infection among pregnant women. The search strategy was adapted to suit each database as illustrated by the search on PubMed (Supplementary Table 1). We considered studies published until January 26, 2020, without any language or country restriction. To supplement the electronic search, references of all relevant studies were also screened for potential consideration.

Two review authors (AF and SK) independently screened titles and abstracts of aggregated citations retrieved from the electronic search, and full texts of potentially eligible articles were further assessed for inclusion. Disagreements were resolved through discussion and unreached consensus was resolved by a third author (JJB).

Cross-sectional, case-control, and cohort studies were considered for inclusion. We excluded letters, reviews, commentaries, editorials, and studies without primary data. We also excluded studies that included participants who had been selected based on presence of other viral hepatitis or HIV and the description of method was incomplete. In these considered studies, HEV infection had to be diagnosed by serum detection of immunoglobulins (Ig) the major outcomes of interest, comparing HEV positive and negative pregnant women, included maternal mortality, foetal immaturity (low birth weight, preterm birth, small for gestational age), and foetal non-survival (intrauterine death, miscarriage, stillbirth). To

estimate the prevalence of HEV vertical transmission, we calculated the proportion of HEV infected new-borns (HEV positive with polymerase chain reaction technique on neonatal cord-blood or peripheral blood from the new-borns) among HEV infected mothers.

Data extraction and management

Using a pretested data extraction form, two review authors (JJB and AFM) independently extracted relevant information, including first author, publication year and period of participants' recruitment, country, site, area, setting, timing of data collection, study design, sampling method, sample size, sample tested for HEV, number of participants with IgM of HEV in blood or stool, number of participants with maternofetal complications and the WHO region. Additionally, for each country of study recruitment, we retrieved data on human development index (HDI) [12]. We defined two groups of pregnant women based on clinical presentation at HEV screening: symptomatic and asymptomatic pregnant women. Symptomatic women were those with signs suggestive of acute hepatitis including jaundice and/or elevated transaminases. When relevant data from included studies were not available, corresponding authors were contacted at least twice for clarification. For the methodological quality and risk of bias assessment of included studies, the tool to be used was determined by the outcome of interest which guided study inclusion. Accordingly, for studies presenting the prevalence of HEV, we used an adapted version of the tool developed by Hoy and colleagues (Supplementary Table 2) [13]; for those presenting the association between HEV infection and maternofetal outcomes, we used an adapted version of the ROBINS-I tool (Supplementary Table 3) [14]. Two review authors (AFM and JJB) independently ran the assessment; discrepancies were arbitrated by a third review author (JRN). Inter-rater agreements between investigators for study inclusion and methodological quality assessment were assessed using the Cohen's κ coefficient [15].

Data synthesis and analysis

We undertook data meta-analysis using the package 'meta' (version 4.9-2) of R (version 3.6.2, The R Foundation for Statistical Computing). For HEV seroprevalence estimates, we calculated unadjusted prevalence based on crude numerators and denominators provided by individual studies. Then, to minimise the effect of the size of study-specific estimates of prevalence on the overall estimate, we used the Freeman–Tukey double arc-sine transformation before pooling data with a random-effects meta-analysis [16]. We also performed sensitivity analyses to assess the robustness of our estimates when only studies with a low risk of bias were included. Symmetry of counter-enhanced funnel plots

and the Egger test were used to assess reporting and publication bias [17]. Consideration of significant publication bias was at a threshold of a p -value < 0.10 . To assess the association between HEV infection and maternofetal outcomes, we used random-effects approach by the Der Simonian and Laird method, and reported pooled weighted results as odds ratios (OR) both with 95% confidence and 95% prediction intervals (CI and PI) [18]. A continuous correction of 0.5 was added to each cell frequency for studies with a zero cell count. Heterogeneity across studies was assessed by χ^2 test, and reported as I^2 statistics [19]. In the case of substantial heterogeneity ($I^2 > 50\%$) [20], we carried-out subgroup analysis to investigate sources of residual heterogeneity.

Univariable meta-regression analysis was performed to identify and quantify (R^2) sources of heterogeneity including clinical presentation, year of publication, HDI, WHO regions, country HEV endemic profile, and sampling method. We planned to integrate clinical profile in the final multivariable meta-regression model that was chosen based on the lowest corrected Akaike's information criterion (AICc). A p value < 0.05 was considered statistically significant. Strength of association were reported with (adjusted) prevalence odds ratios (aPOR) and corresponding 95% CIs.

Results

Study selection and characteristics

In total, we identified 597 records, of which 54 were finally included [8, 21–73] (Supplementary Fig. 1). Agreement between review authors for study selection based on title and abstract ($\kappa = 0.89$) and data extraction ($\kappa = 0.78$) were moderate to high. Among the 54 included studies performed in 22 countries, 51 had been conducted to estimate HEV prevalence (Supplementary Table 4) and 5 to investigate the association between HEV and maternofetal outcomes (Supplementary Table 5). Risk of bias was low, moderate and high respectively in 12 (23%), 37 (70%), and 4 studies (7%) addressing HEV prevalence estimation; all studies which assessed the association between HEV infection and maternofetal outcomes had a moderate risk of bias. Overall, 53 (98%) studies were cross-sectional and one (2%) was case control. In the countries where studies were done, 29 (54%) were in South-East Asia, 10 in Eastern Mediterranean (18%), 6 in Africa (11%), 4 (7%) in Europe, 3 (6%) in Western Pacific, and 2 (4%) in The Americas. Clinically, pregnant women were symptomatic in 29 studies (54%) (Supplementary Table 6). The prevalence of viral hepatitis A, viral hepatitis B, viral hepatitis C, and viral hepatitis D varied from 0 to 14.6% ($n = 23$ studies), from 0 to 31.3% ($n = 27$ studies), from 0 to 13.5% ($n = 23$ studies), and from 0 to 1.5% ($n = 3$ studies), respectively.

Global prevalence of HEV infection in pregnancy and vertical transmission

To estimate the prevalence of HEV, a total of 13,153 pregnant women were included in the meta-analysis. All data on symptomatic women were only from high HEV endemic countries. In asymptomatic women, 14 studies were from high endemic, 3 from endemic, and 4 from not endemic countries. The HEV infection prevalence was 49.6% (95%CI: 42.6–56.7) in symptomatic (Fig. 1) and 3.5% (95%CI: 1.4–6.4) in asymptomatic pregnant women (Fig. 2) with substantial heterogeneity; $p < 0.0001$ (Table 1). Funnel plots suggested no asymmetry (Supplementary Figs. 2 and 3) confirmed by the Egger test (Table 1).

There was no difference in HEV prevalence considering HDI grouping for asymptomatic women (Table 1).

There was no data on symptomatic women from high HDI countries (Table 1).

In the univariable meta-regression analysis, the HEV prevalence was associated with clinical presentation (R^2 : 76.1%), year of publication (R^2 : 9.8%), human development index (R^2 : 24.6%), WHO regions (65.3%), and HEV Endemic profile of countries (R^2 : 0.0%) (Table 2). In the final multivariable model, two variables were included: clinical profile and year of publication explaining 80.6% of the variance of HEV prevalence. The prevalence was higher in symptomatic women compared to asymptomatic (aPOR: 1.76; 95%CI: 1.61–1.91; $p < 0.0001$) and decreased with increasing year of publication (by 10-year) (aPOR: 0.90; 95%CI: 0.84–0.96; $p = 0.003$) (Table 2).

Three studies with a total of 155 women reported data on HEV vertical transmission. The pooled estimate of

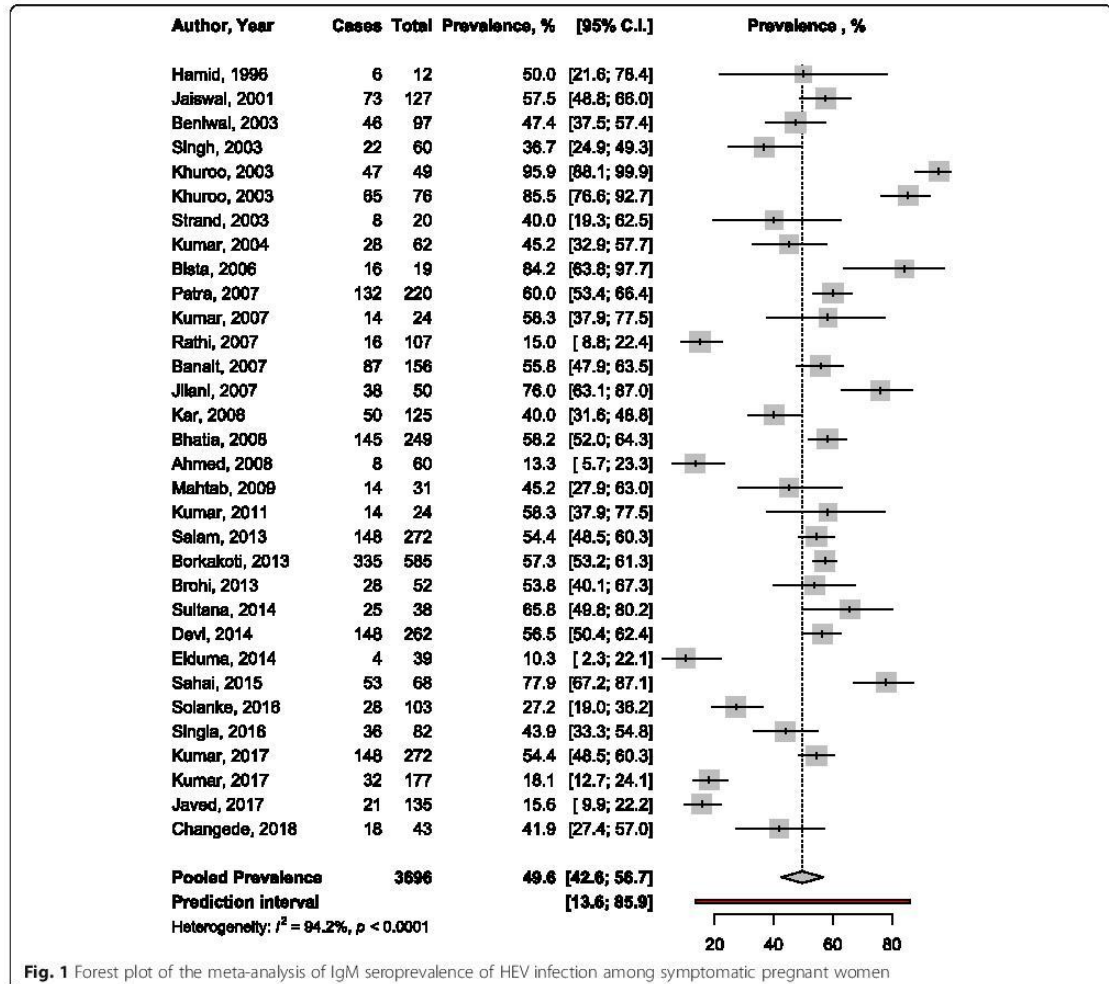


Fig. 1 Forest plot of the meta-analysis of IgM seroprevalence of HEV infection among symptomatic pregnant women

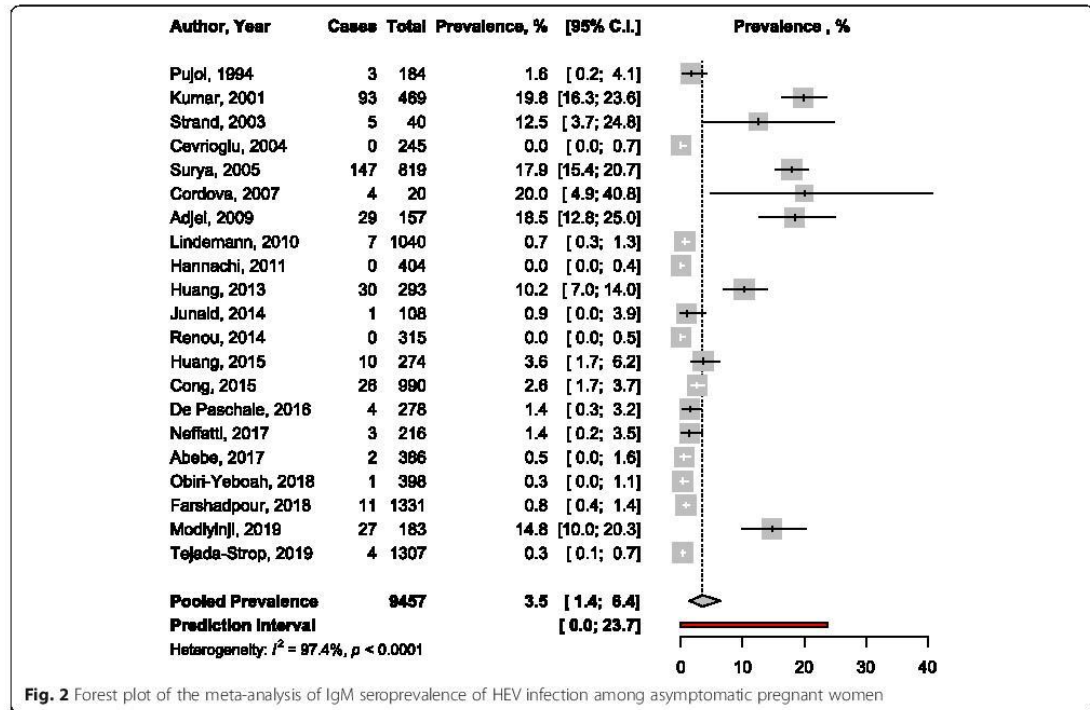


Fig. 2 Forest plot of the meta-analysis of IgM seroprevalence of HEV infection among asymptomatic pregnant women

vertical transmission was 36.9% (95%CI 13.3–64.2) (Fig. 3). All three studies diagnosed HEV infection using neonatal cord-blood samples.

Maternofoetal outcomes in HEV infection

In total, 479 HEV positive and 490 HEV negative women from five studies were included to investigate the association between HEV infection and maternofoetal outcomes.

HEV infection during pregnancy was associated with low birth weight (OR: 3.23; 95%CI: 1.71–6.10), small for gestational age (OR: 3.63; 95%CI: 1.25–10.49), preterm < 32 weeks (OR: 4.18; 95%CI: 1.23–14.20), and preterm < 37 weeks (OR: 3.45; 95%CI: 2.32–5.13) (Fig. 4). HEV infection during pregnancy was also associated with stillbirth (OR: 2.61; 95%CI: 1.64–4.14), intrauterine deaths (OR: 3.07; 95%CI: 2.13–4.43), but not with miscarriage (OR: 1.74;

Table 1 Meta-analysis prevalence of hepatitis E virus infection in the global population of pregnant women

	Prevalence (95% confidence intervals)	95% prediction intervals	N Studies	N Participants	Heterogeneity			p Egger test	p difference
					H (95% confidence intervals)	I ² (95% confidence intervals)	p		
Symptomatic	49.6 (42.6–56.7)	13.6–85.9	32	3696	4.2 (3.7–4.6)	94.2 (92.7–95.4)	< 0.0001	0.739	< 0.0001
Asymptomatic	3.4 (1.2–6.4)	0.0–24.3	19	7967	6.1 (5.4–6.8)	97.3 (96.6–97.9)	< 0.0001	0.633	
By HDI									
Asymptomatic									
Low and medium HDI	5.0 (0.8–11.9)	0.0–41.6	9	3678	7.3 (6.2–8.5)	98.1 (97.4–98.6)	< 0.0001	0.551	0.410
High and very high HDI	2.6 (0.6–5.5)	0.0–19.6	12	5781	5.4 (4.6–6.4)	96.6 (95.3–97.5)	< 0.0001	0.473	
Symptomatic									
Low and medium HDI	49.6 (42.6–56.7)	13.6–85.9	32	3696	4.2 (3.7–4.6)	94.2 (92.7–95.4)	< 0.0001	0.739	NA
High and very high HDI	–	–	0	–	–	–	–	–	–

HDI human development index

Table 2 Meta-regression analysis of HEV infection prevalence in global population of pregnant women

Variables (reference)	Univariable model			Explained variance, R ²	Multivariable model	
	Prevalence odds ratio (95% confidence intervals)	P value	P value, test for moderator		Adjusted prevalence odds ratio (95% confidence intervals)	P value
Clinical presentation (asymptomatic)			< 0.0001	76.1%		
Symptomatic	1.79 (1.64–1.97)	< 0.0001			1.76 (1.61–1.91)	< 0.0001
Year of publication			0.012	9.8%		
By increase of 10 years	0.84 (0.73–0.96)	0.012			0.90 (0.84–0.96)	0.003
Human development index (high and very high)			< 0.0001	24.6%		
Low and medium	1.62 (1.35–1.95)	< 0.0001				
Regions (Africa)			< 0.0001	65.3%		
Americas	0.93 (0.71–1.22)	0.615				
Eastern Mediterranean	1.16 (0.96–1.39)	0.132				
Europe	0.80 (0.62–1.04)	0.092				
South-East Asia	1.71 (1.46–2.00)	< 0.0001				
Western Pacific	0.96 (0.74–1.24)	0.744				
Country HEV endemic profile (low)			0.031	0.0%		
Endemic	0.91 (0.55–1.50)	0.717				
High	1.37 (0.98–1.92)	0.069				
Sampling (non-probability-based)			0.734	0.0%		
Probability-based	1.11 (0.68–1.79)	0.682				
Unclear	1.07 (0.89–1.29)	0.460				

95%CI: 0.77–3.90) (Fig. 5). HEV infection during pregnancy increased the likelihood of maternal deaths (pooled OR 7.17, 95%CI 3.32–15.47) (Fig. 5).

Discussion

To the best of our knowledge, this is the first systematic review and meta-analysis which estimated the burden of HEV infection in pregnancy. Our main findings show a high burden of HEV infection in pregnant women, especially among symptomatic women. In addition, HEV in pregnancy was associated with a two- to three-fold increase in intrauterine foetal demise, a three-fold increase in poor intrauterine foetal maturity, and a significant

increase in the likelihood of maternal death. What’s more, HEV prevalence decreased overtime among pregnant women.

Previous modelling studies through a Global Burden of Disease approach [74] estimated the HEV seroprevalence in the general population aged 15 to 45 (childbearing age for women) years to be between 5 and 22%. Our finding among pregnant women is concordant with those estimates. Available evidence shows that apart from non-infectious causes, hepatitis E is a significant cause of jaundice in pregnancy because pregnant women are more vulnerable to HEV infection than to other viral hepatitis (A, B, and C) [75]. The high IgM seroprevalence (almost 50%) of HEV infection in

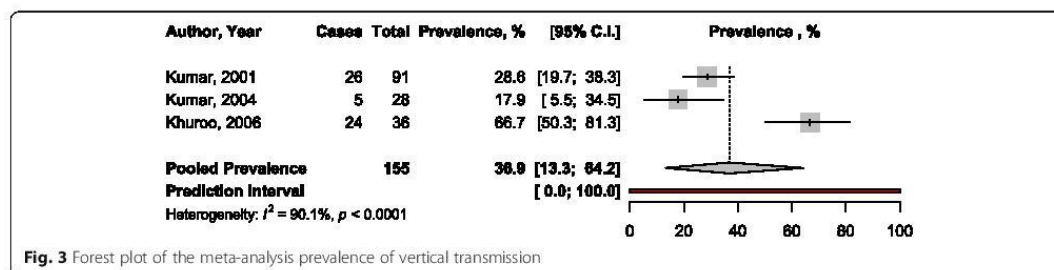
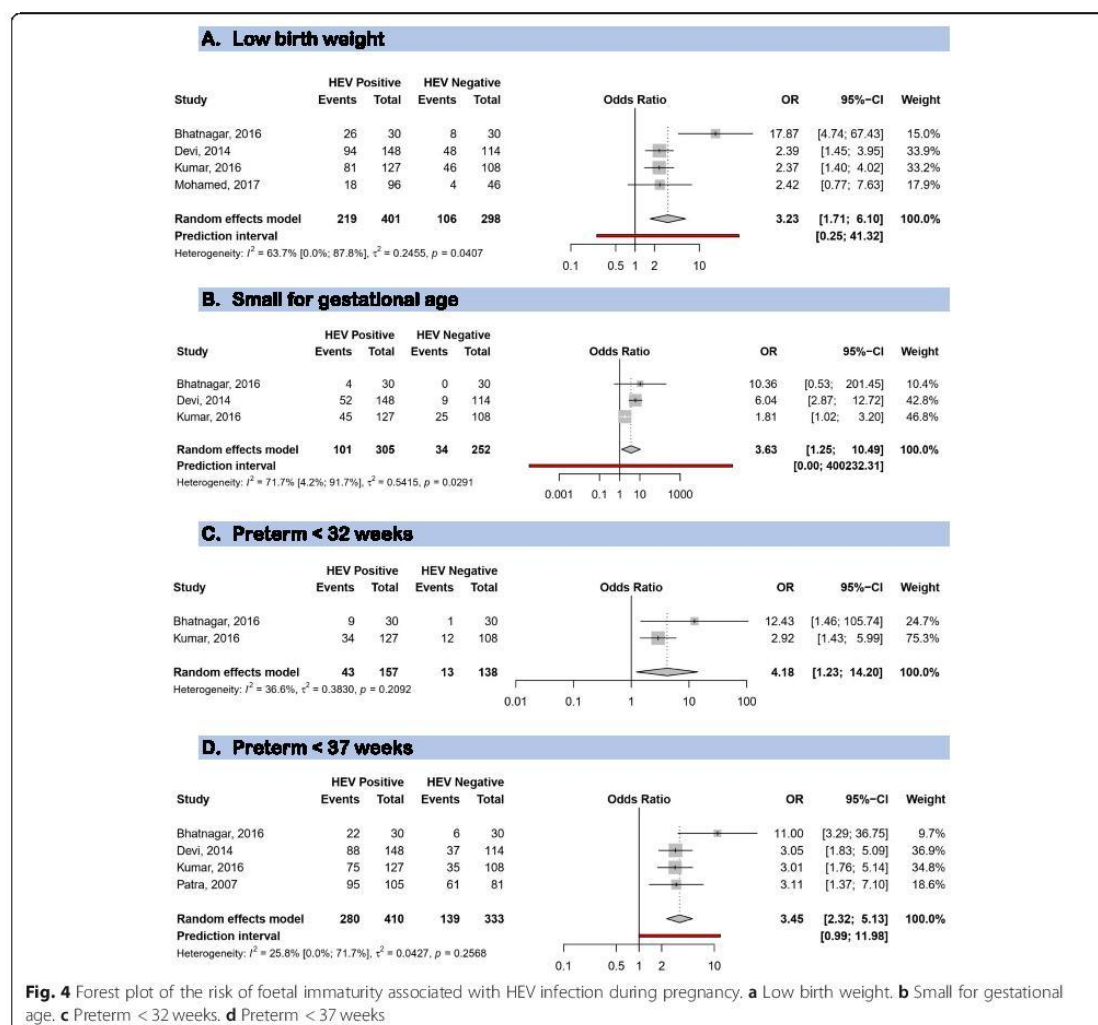


Fig. 3 Forest plot of the meta-analysis prevalence of vertical transmission



symptomatic women may be explained by the fact that all studies included in this analysis were from HEV endemic areas. We found that higher HEV infection prevalence was associated with low HDI, however without a significant difference. In fact, HEV infection is a disease of resource-limited settings with poor sanitation and hygiene services leading to water and food contaminations [3]. Indeed, HEV infection is known as a disease of financial, educational, and infrastructural poverty [3]. Although the current analyses pleaded for a decreasing trends of HEV prevalence overtime, specific attention to curb the burden of HEV infection is needed for high HEV endemic areas. However, this finding should be interpreted with caution since incidence data are better to estimate the dynamic of an infection, rather than prevalence data.

Narrative reviews suggested that HEV infection during pregnancy is a risk factor for poor maternal and foetal outcomes, in particular at a later stage of pregnancy [3, 9, 10]. Although the physiopathology of HEV infection in pregnancy and its outcomes is not yet clear enough, it is possible that there exists an interplay between hormonal (reduced oestrogen and progesterone receptor expression) and immunologic changes (maintenance of the antigenic foetus in the maternal environment by suppression of T cell mediated immunity) during pregnancy, alongside a HEV high viral load [8, 76]. Physiological changes in hormonal and immunologic interplay which should normally favour pregnancy evolution, become deleterious to both the foetus and the mother, affecting all stages of foetal growth and maturity. For foetal non-

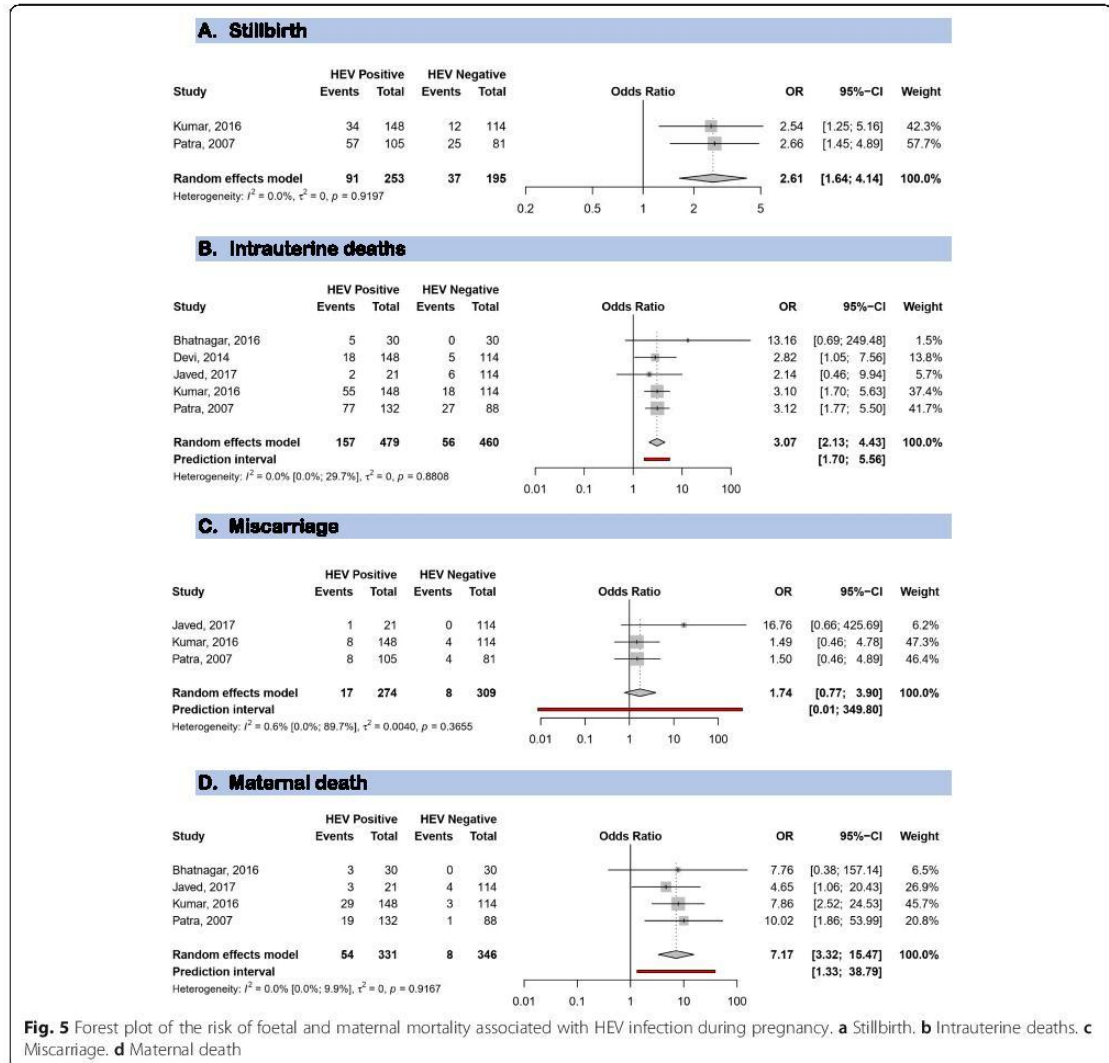


Fig. 5 Forest plot of the risk of foetal and maternal mortality associated with HEV infection during pregnancy. **a** Stillbirth. **b** Intrauterine deaths. **c** Miscarriage. **d** Maternal death

survival, only miscarriage was not associated with HEV infection. At the debut of the pregnancy, the interplay between changes during pregnancy and presence of HEV may not be sufficiently important to increase significantly the risk of miscarriage. During the first 20 weeks of pregnancy, the plasma concentration of cytokines begins to decrease [9]. This gradual decrease in the level of cytokines leads to a low concentration of the plasma levels of cytokines in late pregnancy, hence giving rise to a decrease in immunity. This is why HEV infection may be associated with a higher risk of poor foetal outcomes in late pregnancy [9].

We found that the odds of death during pregnancy increased by 7 times in the presence of HEV infection.

During pregnancy, there is a high production of steroid hormones [8, 9]. These steroid hormones may promote viral replication. The interplay between immunological and hormonal factors and between the virus and the host leads to severe liver damage in pregnancy, increasing the risk for fulminant hepatic failure and subsequently, that for death.

To date, there is no definitive curative treatment for HEV infection; therefore, strategies for curbing its burden should be focussed on prevention. Actually, only one licensed hepatitis E vaccine is considered promising, which is licensed only in China [77]. There is no actual evidence to recommend the use of any hepatitis vaccine systematically through national programs including pregnant women

[77]. The vaccine is recommended for people with a high risk of HEV infection and could therefore be used among pregnant women living in endemic areas or where HEV outbreaks are more likely to occur [3]. While waiting for further developments of hepatitis E vaccines, since HEV infection is a food-borne infection, health policy makers and stakeholders should focus on strategies to improve hygiene, sanitation, water supplies and food safety that can be integrated in a global development program. Indeed, HEV is a disease of poverty [3]. More research is needed to better understand how HEV impacts negatively the course of pregnancy. Research is also warranted to develop innovative community-based strategies to curb the burden of food-borne diseases including HEV infection and to develop antiviral treatments against acute HEV infection.

Nevertheless, findings from this study should be interpreted with caution. Actually, the review was limited by the scarcity of studies reporting some of the outcomes of interest. There were not enough studies to conduct meta-regression and sub-group analysis in order to identify modifiers of the association between HEV infection and poor pregnancy outcomes. In the estimation of the global prevalence, not all countries were represented from all WHO regions, which may limit the generalizability of current estimates. This also limited the investigation of sources of heterogeneity of HEV prevalence by WHO regions. It was difficult to assess all assays used and the prevalence of other viral hepatitis as sources of heterogeneity since they were inconsistently reported and not reported in most of original studies.

Notwithstanding, this first systematic review with meta-analyses summarised data on the prevalence of HEV infection in pregnant women and on the association between maternal and foetal outcomes in pregnancy. Another strength of this study relies in the absence of any publication bias. In addition, the between-studies heterogeneity was not significant when investigating association between HEV infection and pregnancy outcomes.

Conclusions

The present findings suggest a high burden of HEV infection in pregnancy in high endemic countries, its association with poor maternal and foetal outcomes, and a high rate of vertical transmission. As such, this study supports the need for specific strategies to prevent exposure of pregnant women to HEV infection, especially in resource-limited settings, areas where HEV outbreaks are more likely to occur, and in HEV high endemic areas. The widespread use of hepatitis E vaccine among pregnant women in these settings and areas should be explored. Moreover, further studies are needed to identify plausible causal pathways for a better description of the association between HEV infection and poor maternal and foetal outcomes.

Supplementary information

Supplementary information accompanies this paper at <https://doi.org/10.1186/s12884-020-03116-2>.

Additional file 1: Table S1. Search strategy in PubMed. **Table S2.** Risk of bias tool. **Table S3.** Risk of bias on study investigating the association between HEV infection and maternofetal outcomes. **Table S4.** Individual characteristics of studies included in the meta-analysis prevalence of HEV infection in the global population of pregnant women. **Table S5.** Individual characteristics of studies included in the meta-analysis of pregnancy outcomes in HEV infection in the global population of pregnant women. **Table S6.** Characteristics of studies included in the meta-analysis. **Figure S1.** The review process. **Figure S2.** Funnel plot for HEV prevalence in asymptomatic pregnant women. **Figure S3.** Funnel plot for HEV prevalence in symptomatic pregnant women.

Abbreviations

HEV: Hepatitis E; WHO: World Health Organization

Acknowledgments

None.

Authors' contributions

Conception and design of the protocol: JJB, MAA, AFM, SK, JRN, ET, RN. Conception of the literature search: JJB. Selection of studies: AFM, SK, JJB. Full texts searching: AFM, JJB. Data extraction: AFM, JJB, JRN. Data synthesis and analysis: AFM, JJB, JRN, ET. Data interpretation: JJB, JRN, ET. Manuscript drafting: JJB, ET. Manuscript revision: JJB, AFM, JRN, MAA, SK, MN, ET, RN. Manuscript approval: MAA, JJB, AFM, SK, JRN, MN, ET, RN. Guarantor of the review: RN. All authors have read and approved the manuscript.

Funding

This research did not receive any specific funding from a public, commercial or not-for-profit funding agency.

Availability of data and materials

All data generated or analyzed during this study are included in this published article and its supplementary information files.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

None.

Author details

¹Department of Epidemiology and Public Health, Centre Pasteur of Cameroon, P.O. Box 1274, Yaoundé, Cameroon. ²Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon. ³Department of Animals Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon. ⁴Department for the Control of Disease, Epidemics and Pandemics, Ministry of Public Health, Yaoundé, Cameroon. ⁵Department of Public Health, Faculty of Medicine and Biomedical Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon. ⁶Department of Biochemistry, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon. ⁷Department of Internal Medicine, Douala General Hospital, Douala, Cameroon.

Received: 13 August 2019 Accepted: 16 July 2020

Published online: 28 July 2020

References

- World Health Organization. Global Health sector strategy on viral hepatitis 2016–2021: Towards ending viral hepatitis. WHO; 2016. <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/246177/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf;jsessionid=8BBB114FF64FC1E901805FA54462BE1?sequence=1>.

2. WHO: Global Hepatitis Report: Prevent, test and treat. <http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/255016/9789241565455-eng.pdf?sequence=1>. Accessed on Jul 6, 2018.
3. WHO: Hepatitis E: Key facts. <http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>. Accessed on June 9, 2018.
4. Dalton HR, Izopet J. Transmission and epidemiology of hepatitis E virus genotype 3 and 4 infections. *Cold Spring Harbor Perspect Med*. 2018;18(11):a032144. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29530946/>.
5. Izopet J, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Mansuy JM, Kamar N, Abravanel F. HEV and transfusion-recipient risk. *VHE Risque receveur*. 2017;24(3):176–81.
6. Smith DB, Simmonds P. Hepatitis E virus and fulminant hepatitis—a virus or host-specific pathology? *Liver Int*. 2015;35(4):1334–40.
7. Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyaya D, Gupta RK, Sardana S, Kar P. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007;22(5):676–82.
8. Borkakoti J, Hazam RK, Mohammad A, Kumar A, Kar P. Does high viral load of hepatitis E virus influence the severity and prognosis of acute liver failure during pregnancy? *J Med Virol*. 2013;85(4):620–6.
9. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int*. 2008;28(9):1190–9.
10. Chaudhry SA, Verma N, Koren G. Hepatitis E infection during pregnancy. *Can Fam Phys Med Fam Can*. 2015;61(7):607–8.
11. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ (Clin Res ed)*. 2009;339:b2700.
12. WHO: Waterborne outbreaks of Hepatitis E: Recognition, Investigation, and Control. http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/129448/9789241507608_eng.pdf?sequence=1. Accessed on Jul 01, 2018.
13. Hoy D, Brooks P, Woolf A, Blyth F, March L, Bain C, Baker P, Smith E, Buchbinder R. Assessing risk of bias in prevalence studies: modification of an existing tool and evidence of interrater agreement. *J Clin Epidemiol*. 2012;65(9):934–9.
14. Sterne JA, Hernan MA, Reeves BC, Savovic J, Berkman ND, Viswanathan M, Henry D, Altman DG, Ansari MT, Boutron I, et al. ROBINS-I: a tool for assessing risk of bias in non-randomised studies of interventions. *BMJ (Clin Res)*. 2016;355:i4919.
15. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med*. 2005;37(5):360–3.
16. Barendregt JJ, Doi SA, Lee YY, Norman RE, Vos T. Meta-analysis of prevalence. *J Epidemiol Community Health*. 2013;67(11):974–8.
17. Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple graphical test. *BMJ (Clin Res)*. 1997;315(7109):629–34.
18. DerSimonian R, Laird N. Meta-analysis in clinical trials revisited. *Contemp Clin Trials*. 2015;45(Pt A):139–45.
19. Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med*. 2002;21(11):1539–58.
20. Cochran WG. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics*. 1954;10(1):101–29.
21. Bhatnagar G, Sharma S, Kumar A, Prasad S, Agarwal S, Kar P. Reduced glutathione in hepatitis E infection and pregnancy outcome. *J Obstet Gynaecol Res*. 2016;42(7):789–95.
22. Devi SG, Kumar A, Kar P, Husain SA, Sharma S. Association of pregnancy outcome with cytokine gene polymorphisms in HEV infection during pregnancy. *J Med Virol*. 2014;86(8):1366–76.
23. Javed NA, Ullah SH, Hussain N, Sheikh MA, Khan A, Ghafoor F, Firdous R, Uddin W, Saqib AN, Muhyudin G. Hepatitis e virus seroprevalence in pregnant women in Pakistan: maternal and fetal outcomes. *East Mediterr Health J*. 2017;23(8):559–63.
24. Kumar A, Devi SG, Kar P, Agarwal S, Husain SA, Gupta RK, Sharma S. Association of cytokines in hepatitis E with pregnancy outcome. *Cytokine*. 2014;65(1):95–104.
25. Patra S, Kumar A, Trivedi SS, Puri M, Sarin SK. Maternal and fetal outcomes in pregnant women with acute hepatitis E virus infection. *Ann Intern Med*. 2007;147(1):28–33.
26. Abebe M, Ali I, Ayele S, Overbo J, Aseffa A, Mihret A. Seroprevalence and risk factors of Hepatitis E Virus infection among pregnant women in Addis Ababa, Ethiopia. *PLoS One*. 2017;12(6).
27. Adjei AA, Tettey Y, Aviyase JT, Adu-Gyamfi C, Obied S, Mingle JA, Ayehe-Kumi PF, Adiku TK. Hepatitis e virus infection is highly prevalent among pregnant women in Accra, Ghana. *Virology*. 2009;6.
28. Ahmed RE, Karsany MS, Adam I. Brief report: acute viral hepatitis and poor maternal and perinatal outcomes in pregnant Sudanese women. *J Med Virol*. 2008;80(10):1747–8.
29. Singla A, Mehta S, Rajaram S, Shree S. Materno-fetal outcomes with viral hepatitis in pregnancy. *J Obstet Gynecol India*. 2016;66(3):166–9.
30. Banait VS, Sandur V, Parikh F, Muruges M, Ranka P, Ramesh VS, Sasidharan M, Sattar A, Kamat S, Dalal A, et al. Outcome of acute liver failure due to acute hepatitis E in pregnant women. *Indian J Gastroenterol*. 2007;26(1):6–10.
31. Beniwal M, Kumar A, Kar P, Jilani N, Sharma JB. Prevalence and severity of acute viral hepatitis and fulminant hepatitis during pregnancy: a prospective study from North India. *Indian J Med Microbiol*. 2003;21(3):184–5.
32. Bhatia V, Singhal A, Panda SK, Acharya SK. A 20-year single-center experience with acute liver failure during pregnancy: Is the prognosis really worse? *Hepatology (Baltimore, Md)*. 2008;48(5):1577–85.
33. Bista BK, Rana A. Acute hepatitis E in pregnancy—study of 16 cases. *JNMA*. 2006;45(161):182–5.
34. Brohi ZP, Sadaf A, Perveen U. Etiology, clinical features and outcome of fulminant hepatic failure in pregnancy. *J Pak Med Assoc*. 2013;63(9):1168–71.
35. Cordova CMMd, Blatt SL, Botelho TKR, Dalmarco EM. Sorologia Para o virus da Hepatite E em gestantes: clinicamente importante ou desnecessário? *Rev Bras Anal Clin* 2007, 39(4):269–273.
36. Cevrioglu AS, Altindis M, Tanir HM, Aksoy F. Investigation of the incidence of hepatitis E virus among pregnant women in Turkey. *J Obstet Gynaecol Res*. 2004;30(1):48–52.
37. Changede P, Chavan N, Raj N, Gupta P. An observational study to evaluate the maternal and foetal outcomes in pregnancies complicated with jaundice. *J Obstet Gynecol India*. 2018;1–6.
38. Cong W, Sui JC, Zhang XY, Qian AD, Chen J, Zhu XQ. Seroprevalence of hepatitis E virus among pregnant women and control subjects in China. *J Med Virol*. 2015;87(3):446–50.
39. De Paschale M, Ceriani C, Romano L, Cerulli T, Cagnin D, Cavallari S, Ndayake J, Zaongo D, Diombo K, Priuli G, et al. Epidemiology of hepatitis E virus infection during pregnancy in Benin. *Trop Med Int Health*. 2016;21(1):108–13.
40. Elduma AH, Osman WM. Dengue and hepatitis E virus infection in pregnant women in eastern Sudan, a challenge for diagnosis in an endemic area. *Pan African Med J*. 2014;19.
41. Farshadpour F, Taherkhani R, Ravanbod MR, Eghbali SS, Taherkhani S, Mahdavi E. Prevalence, risk factors and molecular evaluation of hepatitis E virus infection among pregnant women resident in the northern shores of Persian Gulf, Iran. *PLoS One*. 2018;13(11).
42. Hamid SS, Jafri SMW, Khan H, Shah H, Abbas Z, Fields H. Fulminant hepatic failure in pregnant women: acute fatty liver or acute viral hepatitis? *J Hepatol*. 1996;25(1):20–7.
43. Hannachi N, Hidar S, Harrabi I, Mhalla S, Marzouk M, Ghzel H, Ghannem H, Khairi H, Boukadida J. Seroprevalence and risk factors of hepatitis E among pregnant women in Central Tunisia. *Pathol Biol*. 2011;59(5):e115–8.
44. Huang F, Ma T, Li L, Zeng W, Jing S. Low seroprevalence of hepatitis E virus infection in pregnant women in Yunnan, China. *Braz J Infect Dis*. 2013;17(6):716–7.
45. Huang F, Wang J, Yang C, Long F, Li Y, Li L, Jing S, Wang H. Chinese pregnant women in their third trimester are more susceptible to HEV infection. *Braz J Infect Dis*. 2015;19(6):672–4.
46. Jaiswal SPB, Jain AK, Naik G, Soni N, Chitnis DS. Viral hepatitis during pregnancy. *Int J Gynecol Obstet*. 2001;72(2):103–8.
47. Jilani N, Das BC, Husain SA, Baweja UK, Chattopadhyaya D, Gupta RK, Sardana S, Kar P. Hepatitis E virus infection and fulminant hepatic failure during pregnancy. *J Gastroenterol Hepatol (Australia)*. 2007;22(5):676–82.
48. Junaid SA, Agina SE, Abubakar KA. Epidemiology and associated risk factors of hepatitis E virus infection in plateau state, Nigeria. *Virology*. 2014;5:15–26.
49. Kar P, Jilani N, Husain SA, Pasha ST, Anand R, Rai A, Das BC. Does hepatitis E viral load and genotypes influence the final outcome of acute liver failure during pregnancy? *Am J Gastroenterol*. 2008;103(10):2495–501.
50. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J Viral Hepat*. 2003;10(1):61–9.
51. Khuroo MS, Kamili S. Aetiology and prognostic factors in acute liver failure in India. *J Viral Hepat*. 2003;10(3):224–31.
52. Kumar A, Sharma S, Kar P, Agarwal S, Ramji S, Husain SA, Prasad S, Sharma S. Impact of maternal nutrition in hepatitis E infection in pregnancy. *Arch Gynecol Obstet*. 2017;296(5):885–95.

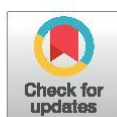
RESEARCH ARTICLE

Serological and molecular investigation of hepatitis E virus in pigs reservoirs from Cameroon reveals elevated seroprevalence and presence of genotype 3

Abdou Fatawou Modiyinji^{1,2}, Georges Marc Arthur Mveng Sanding³, Marie Amougou Atsama¹, Chavely Gwladys Monamele¹, Moïse Nola², Richard Njouom^{1*}

1 Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon, **2** Department of Animals Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon, **3** Ministry of Livestock, Fisheries and Animal Industries, Yaoundé, Cameroon

* njouom@pasteur-yaounde.org



Abstract

Background

Hepatitis E virus (HEV) is a zoonotic pathogen of which pigs have been established as reservoirs. In the present study, we investigated the presence of HEV among pigs in the Center and Littoral regions of Cameroon and performed the molecular characterization of positive strains.

Methodology

A total of 453 serum and stool samples were randomly collected from pigs in slaughterhouses in Obala, Douala and Yaounde. All samples were examined for the presence of anti-HEV IgG and IgM antibodies using ELISA assays. IgM positive stool samples were tested for HEV RNA using an RT-PCR assay, followed by a nested PCR assay for sequencing and phylogenetic analysis.

Results

Overall, 216 samples (47.7%, 95% CI: 43.1%-52.3%) were positive for at least one of the serological markers of HEV infection. Amongst these, 21.0% were positives for anti-HEV IgM, 17.7% for anti-HEV IgG, and 9.1% for both. A total of eight stool samples (5.9%) were positive for HEV RNA by nested RT-PCR. Phylogenetic analysis showed that the retrieved sequences clustered within HEV genotype 3.

Conclusion

This study shows a high prevalence of anti-HEV antibodies and the circulation of genotype 3 in the swine population in Cameroon. Subsequent studies will be needed to elucidate the zoonotic transmission of HEV from pigs to humans in Cameroon.

OPEN ACCESS

Citation: Modiyinji AF, Sanding GMAM, Atsama MA, Monamele CG, Nola M, Njouom R (2020) Serological and molecular investigation of hepatitis E virus in pigs reservoirs from Cameroon reveals elevated seroprevalence and presence of genotype 3. PLoS ONE 15(2): e0229073. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229073>

Editor: Pierre Roques, CEA, FRANCE

Received: December 13, 2019

Accepted: January 29, 2020

Published: February 10, 2020

Copyright: © 2020 Modiyinji et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

Funding: The authors received no specific funding for this work.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is an emerging and zoonotic pathogen of humans and animals, which is responsible for significant morbidity and mortality especially in developing countries [1]. HEV affects approximately 20 million persons annually worldwide, causing over 70,000 deaths [2].

HEV is a spherical, non-enveloped, single-stranded ribonucleic acid (RNA) virus belonging to the Hepeviridae family that contains several viral species divided into two genera: *Orthohepevirus* with four species (*Orthohepevirus A–D*) and *Piscihepevirus* with one species (*Piscihepevirus A*) [3]. Eight genotypes exist within *Orthohepevirus A* and these HEV strains infect humans and multiple mammals' species. Genotype 1 and 2 are restricted to humans; genotype 3 is found among humans, swine, rabbits, deer and mongooses; genotype 4 circulates between humans and swine; genotype 5 and 6 are found in wild boars; and genotype 7 and 8 were recently identified in dromedary and Bactrian camels, respectively [4].

Several transmission routes of hepatitis E have been identified, and include: contamination by drinking infected water [5]; food-borne transmission by ingestion of meat from infected animals [6], transmission through milk consumption [7] and transfusion of infected blood products [8]. In developed countries, HEV is predominantly transmitted by the ingestion of pork and wild boar meat. Evidence for transmission of HEV-3 and HEV-4 by direct contact of humans with animals has been repeatedly described. Several studies have shown that persons with occupational contact to domestic pigs such as slaughterers, pig farmers or veterinarians exhibit significant higher anti-HEV antibody prevalence than the general population [9,10].

In Africa, contaminated water causes serious epidemic outbreaks. Other sources of infection such as animal transmission cannot be excluded since genotype 3 responsible for the zoonotic transmission of HEV has already been reported in some African countries [9,10]. The information on HEV infection in animals in this continent remains underreported [10]. In Cameroon, minimal attention has been paid to HEV epidemiology in human and animal populations. The aim of this study is to determine the seroprevalence of HEV infection in pigs in Center and Littoral regions of Cameroon and to determine the molecular characterization of identified viruses.

Materials and methods

Specimen collection

Fecal and serum samples were collected from 453 animals from domestic pigs in slaughterhouse in Obala, Douala and Yaounde, between February 2017 to September 2018. Cameroon has ten administrative regions including the littoral region where Douala is located and the central region where Yaoundé and Obala are located. Blood samples were collected at the bleeding post and the fecal samples were obtained and kept in sterile containers. All biological samples were transported in a cool box at 4°C, then frozen and stored at -80°C. Data such as age, sex, city and year of collection were recorded in a sheet dedicated to each pig. This study was approved by the Cameroonian Ministry of Livestock, Fisheries and Animal Industries (N°000050/L/MINEPIA/SG/DREPIA/CE).

ELISA for anti-HEV in swine

All sera were tested for the presence of anti-HEV immunoglobulins (Ig) with enzyme-linked immunosorbent assays: HEV IgG ELISA and HEV IgM ELISA 3.0 kits (MP Biomedicals Asia Pacific Pte Ltd, Singapore, formerly Genelabs Diagnostics Pte). The test was carried out according to the manufacturer's instructions by changing the human conjugates by porcine conjugates. Briefly, the sera diluted in diluent buffer were placed in coated wells. After

incubation of 30 min at 37°C, followed by washing, the horseradish peroxidase (HRP)-conjugated goat anti-porcine IgM for IgM detection and goat anti-porcine IgG for IgG detection (Bethyl Laboratories Inc., USA) were added and incubated for 30 min at 37°C. Plates were washed, and 100 µl of substrate solution (tetramethylbenzidine) were added. The reaction was stopped after 15 min with 50 µl of stop solution (hydrochloric acid) and absorbance was measured at 450 nm using a spectrophotometer. Swine sera positive and negative for HEV were identified using positives and negatives controls provided with the kits. The blank and the positives controls have been assayed in duplicate, whereas the negatives controls in triplicate on each plate with each run of specimens. The manipulations were validated when the blank wells have an absorbance ≤ 0.100 . Negatives controls have an absorbance ≤ 0.100 and the positives controls have absorbance ≥ 0.500 (For IgG detection) and ≥ 0.400 (For IgM detection) after subtracting the blank.

RNA extraction

Fecal samples were diluted at 10% (w/v) in phosphate-buffered saline, pH 7.2, clarified by centrifugation at 12,000g for 10 min and 140 µl aliquots of the clarified material was used for viral RNA extraction. RNA was extracted from 140 µl of suspension using a QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) according to the manufacturer's instructions, eluted in 60 µl of RNase-free water, and stored at -80°C or used immediately.

Amplification and sequencing of HEV

Fecal samples from pigs positive for anti-HEV antibodies were selected for amplification of a portion of ORF 2 targeting 731 bp by RT-PCR followed by nested PCR using a pair of primers as previously reported by Huang et al. [11]. The RT-PCR was performed using SuperScript[™] III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq (Life Technologies Corporation, USA) in a final volume of 50 µL containing 0.2 µM of each primer (3156N and 3157N), 2.3 mM MgSO₄, 200 µM dNTPs and 10 µL of RNA extract. A Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 was used with the following cycling conditions: 50°C for 30 min, 94°C for 2 min, 40 cycles of 94°C for 15 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 1 min, and a final elongation step at 72°C for 5 min. In the nested PCR, 5 µL of RT-PCR products were used in a final volume of 50 µL containing 1.25 U of Taq polymerase (Life Technologies Corporation, USA), 0.2 µM of each primer (3158N and 3159N), and 1.5 mM MgCl₂. The cycling conditions consisted of 94°C for 5 min, 40 cycles at 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, and 72°C for 1 min 30 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min. The 348 nucleotides (nt) second round PCR products were visualized after electrophoresis on a 1.5% agarose gel. The nested PCR products were further sequenced on the 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems), by Sanger method using GenomeLab DTCS-Quick Start Kit (Beckman Coulter, Paris, France) according to the manufacturer's instructions. Phylogenetic analysis was performed by comparing Cameroonian strains with the selected strains of various geographical origins obtained from GenBank. Phylogenetic trees were constructed using the Kimura two-parameter model and neighbour-joining method component of the Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) 6 program on the basis of the nucleotide sequences of the amplified gene. Robustness of the tree topologies was estimated by bootstrap analysis with 1000 pseudo-replicate data sets, and only bootstrap values > 70 were considered significant.

Statistical analysis

Prevalence is given as percentages and categorical variables were compared applying Fisher's exact or chi-square tests. The level of significance was $P < 0.05$. All the analyses were performed using SPSS 16.0 statistical software.

Table 1. Results of detection of specific anti-hepatitis E virus antibodies.

	Yaounde n (%)	Douala n (%)	Obala n (%)	Total N (%)
No. participants	303	102	48	453
Anti-IgM and/or IgG positive	176 (58.1)	26 (25.5)	14 (29.2)	216 (47.7)
Anti-IgM positive and IgG negative	76 (25.1)	5 (4.9)	14 (29.2)	95 (21.0)
Anti-IgG positive and IgM negative	62 (20.5)	18 (17.6)	0	80 (17.7)
Anti-IgM and IgG positives	38 (12.5)	3 (2.9)	0	41 (9.1)
Anti-IgM and IgG negatives	127 (41.9)	76 (74.5)	34 (70.8)	237 (52.3)

IgG: Immunoglobulin G, IgM: Immunoglobulin M, No.: number

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229073.t001>

Results

Prevalence of anti-HEV antibodies among pigs

A total of 453 plasmas were collected and tested for the presence of anti-HEV antibodies. Overall, 216 samples (34.9%, 95% CI: 31.8%-38.1%) were positive for at least one of the serological markers of HEV infection. Amongst these, 21.0% (95/453) were positives for anti-HEV IgM, 17.7% (80/453) for anti-HEV IgG, and 9.1% (41/453) for both (Table 1).

Within the pigs collected in Yaounde, 58.1% (176/303) were positive for at least one serological marker. Of these, the percentage of IgM positivity was 25.1% (76/303); meanwhile 20.5% (62/303) were positives to anti-HEV IgG and 12.5% (38/303) had both markers (Table 2). In Douala, 25.5% (26/102) of samples were positive for at least one serological marker. Of these, the percentage of IgM positivity was 4.9% (5/102); meanwhile 17.6% (18/102) were seropositive to anti-HEV IgG and 2.9% (3/102) had both markers. In Obala, 14 out of 48 samples (29.2%) were IgM positive and no samples were positives for IgG. Higher anti-HEV positivity was noted in 2018 (25.1% for IgM, 35.2% for IgG and 12.5% for both antibodies) than in 2017 (12.7% for IgM, 12% for IgG and 2% for both markers), with a statistically significant difference ($P < 0.05$). The prevalence of IgG in pigs in Douala (17.6%) and Yaounde (20.5%) is statistically higher than that found in pigs taken from Obala (0%) ($p = 0.003$). However, the prevalence of IgM in pigs collected in Obala (29.2%) is statistically higher than that

Table 2. Seroprevalence of HEV infection by different factors.

	Tested pigs N	IgG positives, n (%)	P-value	IgM positives, n (%)	P-value	IgG and IgM positives, n (%)	P-value
Age							
<6 months	79	17 (21.5)	0.3	22 (27.8)	0.1	9 (11.4)	0.4
>6 months	374	63 (16.8)		73 (19.5)		32 (8.6)	
Year							
2017	150	18 (12.0)	0.03	19 (12.7)	0.002	3 (2.0)	<0.001
2018	303	62 (35.2)		76 (25.1)		38 (12.5)	
Sex							
Male	183	33 (18.0)	0.9	42 (23.0)	0.4	13 (7.1)	0.2
Female	270	47 (17.4)		53 (19.6)		28 (10.4)	
City							
Douala	102	18 (17.6)	0.003	5 (4.9)	<0.001	3 (2.9)	0.001
Yaounde	303	62 (20.5)		76 (25.1)		38 (12.5)	
Obala	48	0		14 (29.2)		0	

IgG: Immunoglobulin G, IgM: Immunoglobulin M, n: Number positive, N: Number tested

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229073.t002>

found in Douala (4.9%) and Yaounde (25.1%) ($P < 0.001$). No difference was found between HEV seropositivity, sex and age of pigs collected ($P > 0.05$) (Table 2).

Prevalence of HEV RNA

A total of 136 stool samples collected from pigs which were serologically tested positive in anti-HEV IgM were selected and processed in nested RT-PCR. Of these, 8 (5.9%) samples were found positive for HEV viral RNA. All the positive samples came from stool samples taken from pigs in Yaounde.

Genotyping and phylogenetic analysis of HEV

The nucleotide sequences of HEV strains isolated in this study have been deposited in GenBank with the accession numbers (MN723545, MN723546, MN723547, MN723548, MN723549, MN723550, MN723551 and MN723552). Phylogenetic analysis of the eight isolates of swine HEV was carried out by comparing the highly preserved 348 bp of OFR 2 to HEV reference strains from different geographical regions contained in GenBank. Phylogenetic analysis showed that all eight Cameroon strains belonged to genotype 3 and clustered with human, goat, sheep and swine HEV strains from different geographical regions of the world especially with the swine strains from Canada and USA and Argentina Wastewater HEV strains (Fig 1).

Discussion

There is accumulated evidence that HEV is enzootic in a broad range of animals in Cameroon. Serological analyses have revealed the presence of anti-HEV antibodies among pigs and non-human primates in previous studies in Cameroon [12,13]. We noted high anti-HEV seropositivity in this study of 47.7% similarly to the 43.2% that was previously reported in the North and West regions of Cameroon [12], confirming that pigs are indeed a main reservoir for HEV. We noted anti-HEV IgM and IgG seropositivity of 21.0% and 17.7% respectively which is higher than reports from Nigeria and Mexico and lower than reports from Madagascar and Scotland [2,10,14,15]. These differences could be explained, at least partly, by the different pig husbandry systems, the routine management and hygiene practices applied on these pig farms and environmental conditions that characterize various areas [16]. This difference may also be associated with the different HEV diagnostic methods used in these different studies. Our study shows high seroprevalence of IgM (21.0%) compared to IgG (17.7%) similarly to the previous study by Modiyinji *et al.* [12]. This could be explained by the fact that majority of the pigs in this study were older than 6 months, since, Seminati *et al.* in 2008 shows that pigs older than 12 weeks of age have a higher IgM seroprevalence, compared to IgG seroprevalence [17]. This high prevalence of IgM compared to IgG could be explained by the fact that Obala pigs were positive only for IgM antibodies while in Yaounde and Douala, both types of antibodies were detected. The presence of IgM antibodies alone in pigs sampled at Obala suggests an epidemic of HEV in this pig population. Poor conditioning of the samples would have prevented the detection of RNA in the samples of these pigs. Published studies have shown that humans and other animals including pigs transmit maternal IgG across the placenta and this may provide protection for some time, and may contribute to antibody class combinations being different depending on age [18]. There was no significant difference between male and female ($P > 0.05$), similarly to reports from Madagascar in 2013 [10]. Our study shows a significant difference between the spatial distributions of swine HEV seroprevalences (P value < 0.05).

HEV RNA was detected in a small proportion (5.9%) of stool samples from pigs that tested seropositive for anti-HEV IgM, all of which were from pigs in Yaounde. In agreement with

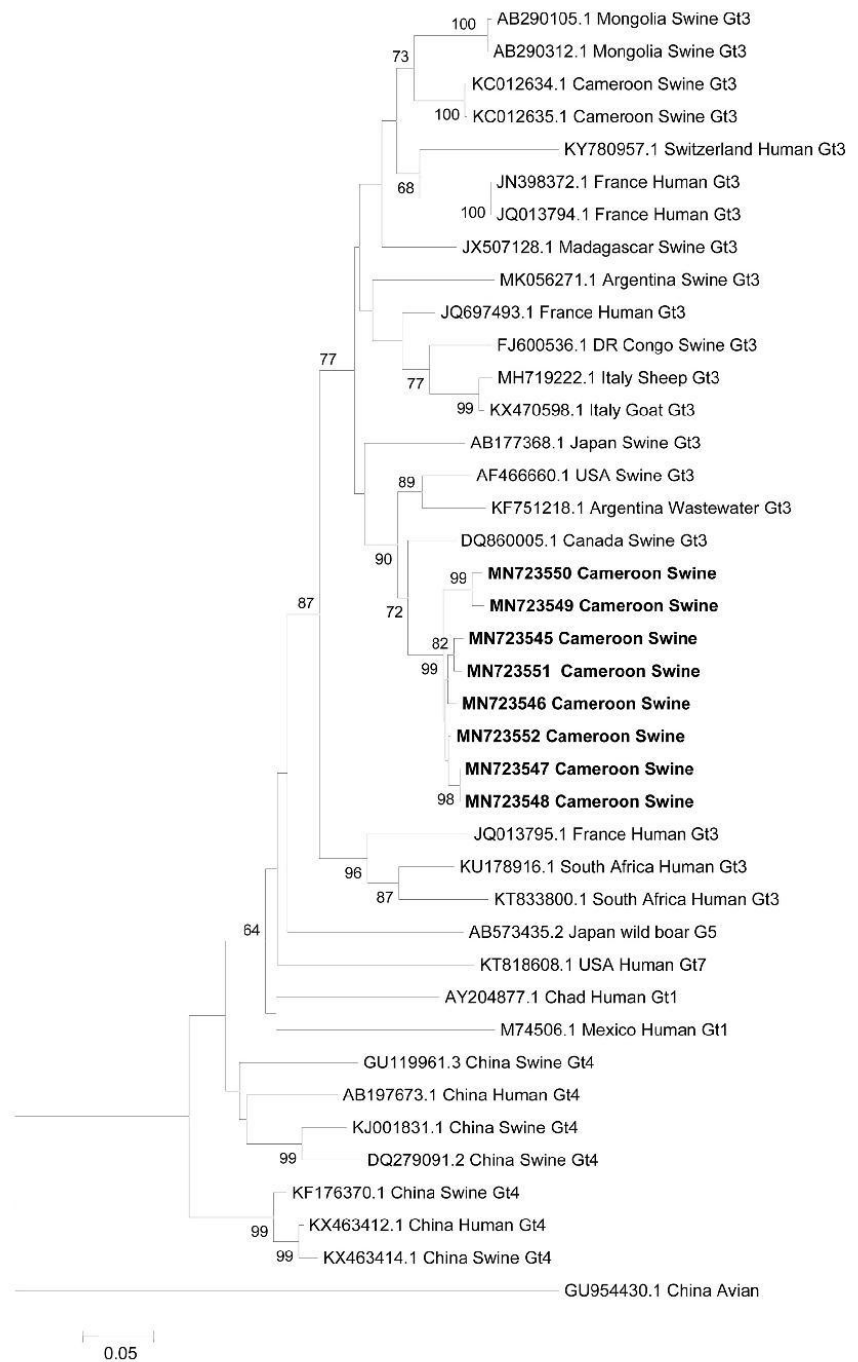


Fig 1. Phylogenetic tree based on a 348-bp fragment of the ORF2 region of 32 reference sequences retrieved from Genbank. The neighbor-joining tree was drawn using MEGA 6 software, using the Kimura two-parameter model as a correction factor and 1000 replicates. Bootstrap values >70 are shown. Strains identified in this study are shown in bold. Reference strains from GenBank are included, and for all entries, the accession number, country of origin, host and genotype are reported.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229073.g001>

distance analysis, phylogenetic reconstruction using partial nucleotide sequences of ORF 2 (348 nt) showed a close relationship of our strains with HEV genotype 3 strains. A previous study conducted in Cameroon in 2013 had already shown the presence of genotype 3 in the liver samples of pigs in Yaounde [19]. Although the absence of animal traceability in Cameroon excludes the possibility of the identification of an individual pig's farm at source, we can say without reserve that HEV circulates in the pig's population in Yaounde. Phylogenetic analysis showed that swine strains from Cameroon are very close to swine strains from Canada and USA. However, more swine and human HEV sequences are required to shed light the origin of HEV strains in the swine population and the possibility of a swine-to-human transmission of HEV. Previous studies have identified workers in slaughterhouses and pig handlers as populations at high risk of infection, because of their frequent contacts with organs, manure, and blood from animals [20,21]. Further studies in these high risk populations will be needed to fully elucidate the zoonotic route of HEV in Cameroon.

Conclusion

This study showed the presence of anti-HEV antibodies in pigs in the littoral and Centre regions of Cameroon and the circulation of genotype 3 in a swine population of Yaounde. Subsequent studies will be needed to elucidate the possibility of a zoonotic transmission of HEV from pigs to humans in Cameroon.

Supporting information

S1 Database.
(PDF)

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the Cameroonian Ministry of Livestock, Fisheries and Animal Industries for providing approvals for field research, all the staff of the virology department of Centre Pasteur of Cameroon and the WHO IDENTIFY project.

Author Contributions

Conceptualization: Abdou Fatawou Modiyinji, Moise Nola, Richard Njouom.

Investigation: Abdou Fatawou Modiyinji, Georges Marc Arthur Mveng Sanding.

Methodology: Abdou Fatawou Modiyinji, Georges Marc Arthur Mveng Sanding, Richard Njouom.

Supervision: Moise Nola, Richard Njouom.

Writing – original draft: Abdou Fatawou Modiyinji.

Writing – review & editing: Marie Amougou Atsama, Chavely Gwladys Monamele, Moise Nola, Richard Njouom.

References

1. Wang Y, Ma X (2010) [Detection and sequences analysis of sheep hepatitis E virus RNA in Xinjiang autonomous region]. *Wei Sheng Wu Xue Bao* 50: 937–941. PMID: [20815242](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20815242/)
2. Garcia-Hernandez ME, Cruz-Rivera M, Sanchez-Betancourt JI, Rico-Chavez O, Vergara-Castaneda A, Trujillo ME, et al. (2017) Seroprevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in domestic pigs in Mexico. *BMC Vet Res* 13: 289. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1208-z> PMID: [28934965](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28934965/)
3. Spahr C, Knauf-Witzens T, Vahlenkamp T, Ulrich RG, Johne R (2017) Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. <https://doi.org/10.1111/zph.12405> PMID: [28944602](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28944602/)
4. Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, Woo PCY (2017) Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *Int J Mol Sci* 18.
5. Guthmann JP, Klovdal H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou JY, et al. (2006) A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis* 42: 1685–1691. <https://doi.org/10.1086/504321> PMID: [16705572](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16705572/)
6. Tei S, Kitajima N, Ohara S, Inoue Y, Miki M, Yamatani T, et al. (2004) Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: an age- and sex-matched case-control study. *J Med Virol* 74: 67–70. <https://doi.org/10.1002/jmv.20147> PMID: [15258970](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15258970/)
7. Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, et al. (2016) Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology* 150: 355–357.e353. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.048> PMID: [26551551](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26551551/)
8. Boxall E, Herborn A, Kochethu G, Pratt G, Adams D, Ijaz S, et al. (2006) Transfusion-transmitted hepatitis E in a 'nonhyperendemic' country. *Transfus Med* 16: 79–83. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3148.2006.00652.x> PMID: [16623913](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16623913/)
9. Kim JH, Nelson KE, Panzner U, Kasture Y, Labrique AB, Wierzb TF (2014) A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC Infect Dis* 14: 308. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-14-308> PMID: [24902967](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24902967/)
10. Temmam S, Besnard L, Andriamandimby SF, Foray C, Rasamoelina-Andriamanivo H, Heraud JM, et al. (2013) High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 88: 329–338. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.12-0615> PMID: [23208879](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23208879/)
11. Huang FF, Haqshenas G, Guenette DK, Halbur PG, Schommer SK, Pierson FW, et al. (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. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1326-1332.2002> PMID: [11923352](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11923352/)
12. Modiyinji AF, Nola M, Monamele GC, Atsama MA, Njouom R (2018) High seroprevalence of hepatitis E among pigs suggests an animal reservoir in Cameroon. *The Journal of Infection in Developing Countries* 12: 676–679. <https://doi.org/10.3855/jidc.10310> PMID: [31958332](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31958332/)
13. Modiyinji AF, Amougou Atsama M, Monamele Chavely G, Nola M, Njouom R (2019) Detection of hepatitis E virus antibodies among Cercopithecidae and Hominidae monkeys in Cameroon. *J Med Primatol*.
14. Crossan C, Grierson S, Thomson J, Ward A, Nunez-Garcia J, Banks M, et al. (2015) Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect* 143: 2237–2240. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003100> PMID: [25410494](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25410494/)
15. Owolodun OA, Gerber PF, Gimenez-Lirola LG, Kwaga JK, Opriessnig T (2014) First report of hepatitis E virus circulation in domestic pigs in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg* 91: 699–704. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.14-0144> PMID: [25002299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25002299/)
16. Junaid SA, Agina SE, Jaiye K (2014) Seroprevalence of hepatitis E virus among domestic animals in Plateau State-Nigeria. *British Microbiology Research Journal* 4: 924–934.
17. Seminati C, Mateu E, Peralta B, de Deus N, Martin M (2008) Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Vet J* 175: 130–132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.018> PMID: [17280843](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17280843/)
18. Borghesi J, Mario LC, Rodrigues MN, Favaron PO, Miglino MA (2014) Immunoglobulin Transport during Gestation in Domestic Animals and Humans—A Review. *Open Journal of Animal Sciences* 04: 323–336.
19. de Paula VS, Wiele M, Mbunkah AH, Daniel AM, Kingsley MT, Schmidt-Chanasit J (2013) Hepatitis E virus genotype 3 strains in domestic pigs, Cameroon. *Emerg Infect Dis* 19: 666–668. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121634> PMID: [23751099](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23751099/)
20. Adjei AA, Tettey Y, Aviyase JT, Adu-Gyamfi C, Obed S, Mingle JA, et al. (2009) Hepatitis E virus infection is highly prevalent among pregnant women in Accra, Ghana. *Virol J* 6: 108. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-108> PMID: [19619291](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19619291/)



RICHARD NJOUOM ORCID iD: 0000-0003-3112-6370

First molecular characterization of the hepatitis E virus in humans in Cameroon: Confirmation of the HEV outbreak in Touboro, North-Cameroon

Abdou Fatawou Modiyinji^{1,2}, Antonio Rivero-Juarez³, Pedro Lopez-Lopez³, Marie Amougou Atsama¹, Chavely Gwladys Monamele¹, Moise Nola², Antonio Rivero³, Richard Njouom^{1*}

¹Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon;

²Department of Animals Biology and Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon;

³Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Instituto Maimonides de Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC), Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain.

***Corresponding author:**

Richard Njouom, Centre Pasteur of Cameroon, 451 Street 2005 Yaoundé 2, PO Box 1274 Yaoundé, Cameroon, Phone: +237 222231015, Fax: +237 222231564, Email: njouom@pasteur-yaounde.org

Running title: First detection of HEV in human in Cameroon

Abstract

Hepatitis E virus (HEV) is a major causative agent of acute viral hepatitis in many regions of the world including Africa. In Cameroon, there is no published molecular study on HEV in humans. However, based on serological assays, the first outbreak of HEV was detected in North-Cameroon. The objective of this study was to determine the molecular characterization of HEV that circulated during this period. A retrospective study design was used to select serum samples among those collected. This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/jmv.26277.

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Accepted Article

during the outbreak period. IgM positive samples available in sufficient volumes to amplify HEV RNA were selected. RNA was extracted, and then amplified by a real-time RT-PCR assay, followed by a nested RT-PCR assay for sequencing and phylogenetic analysis. Overall, 24 samples were selected and HEV RNA was amplified by real-time RT-PCR in 20 samples. Amongst these, 12 samples were positive for HEV RNA by nested RT-PCR and yielded good sequencing products. Phylogenetic analysis showed that 10 samples clustered with HEV genotype 1 (subtype 1e) and 2 samples clustered with HEV genotype 3 (subtype 3f). This study fills the gap of knowledge on the molecular epidemiology of HEV in Cameroon and confirms the first report of hepatitis E outbreak in North-Cameroon.

Keywords: Cameroon; hepatitis E virus; genotype; outbreak.

Introduction

Hepatitis E virus (HEV) is a major causative agent of acute viral hepatitis in many regions of the world, including Africa. HEV has been estimated to cause 20 million infections every year with 3.3 million symptomatic cases and 44,000 deaths worldwide.¹ HEV infection is usually self-limiting and resolves within 2 to 6 weeks, but in some cases, fulminant hepatitis may occur especially in pregnant women, patients with pre-existing liver disease, or those who are immunocompromised with higher mortality rates.²

HEV is a member of the family Hepeviridae within the genus *Orthohepevirus*. The genus has four species (*Orthohepevirus A-D*) with widely differing host range.³ Eight genotypes (HEV-1 to HEV-8) exist within *Orthohepevirus A* and infect humans and multiple mammals' species. HEV-1 and HEV-2 are restricted to humans; HEV-3 is found among humans, swine, rabbits, deer and mongooses; HEV-4 circulates between humans and swine; HEV-5 and HEV-6 are found in wild boars; and HEV-7 and HEV-8 were recently identified in dromedary and Bactrian camels, respectively.³⁻⁵ Many subtypes have been described within the four major genotypes (HEV-1 to 4) which are pathogenic to humans: 5 for HEV-1 (HEV-1a to HEV-1e), 2 for HEV-2 (HEV-2a and HEV-2b), 10 for HEV-3 (HEV-3a to HEV-3j) and 7 for HEV-4 (HEV-4a to HEV-4g).⁶ HEV-1 and HEV-2 are waterborne, transmitted through fecal-oral routes, and are responsible for large HEV outbreaks in human in resource limited

countries like Africa and Asia. HEV-3 and HEV-4 are responsible for zoonotic transmission and cause sporadic infections in industrialized countries.⁷

In Cameroon, studies have been carried out on HEV in both the animal and human populations.⁸⁻¹³ In this way, studies carried out in animals shows the presence of anti-HEV antibodies and/or HEV RNA in pigs and non-human primates, and studies in humans have shown the presence of anti-HEV antibodies, however, the HEV RNA has never been characterized. On the basis of serological results, Demanou *et al.* mentioned in 2013 the appearance of the first HEV outbreak in the Touboro Health District located in the North region of Cameroon.⁹ Two deaths were recorded during this outbreak among whom one pregnant woman. Due to the inadequacy of using serological assays alone for diagnosis of HEV infection, this study aims to complete the serological analyses performed during this outbreak with molecular assays, as well as to determinate the molecular characterization of HEV.

Material and methods

Study site and samples

Cameroon administratively has ten regions including the North region where Touboro district is located. From September through October 2013, an outbreak of illness associated with jaundice and fever occurred in two neighbouring villages (Bogdibo and Golonbali) of the Touboro Health District, on the border between Cameroon and Chad. Due to a suspicion of yellow fever virus infection, blood sample collected were sent to the National Reference Laboratory for yellow fever at Centre Pasteur of Cameroon (CPC) for confirmation. However, all samples collected were found to be negative for yellow fever and other arboviral infection (Dengue and West Nile). Serum samples were then tested for the presence of anti-HEV antibodies and a high prevalence of HEV IgM was found indicating a recent infection.⁹ For our study, we selected samples that were positives for IgM anti-HEV and which had sufficient volumes (200 μ L) to perform molecular assays.

Molecular analysis

RNA extraction

Viral RNA was extracted from 200 µl of serum using the commercial QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) and processed with the automated QIAcube procedure (QIAcube), using the manufacturer's procedure for extracting serum samples. The elution volume was set up at 50 µL.

HEV real-time RT-PCR

Real-time RT-PCR was performed using the real-time RT-PCR System (CFX Connect Real Time PCR System). The QIAGEN One step RT-PCR kit (QIAGEN) was used for the reaction. The primers (20 µM) employed were sense primer HEV5260 (5'-RGTRGTTTCTGGGGTGAC-3') and antisense primer HEV5330 (5'-AKGGRTTGGTTGGRTGAA-3'). The probe employed (15 µM) was HEV5283 (5'-FAM-TGAYTCYCARCCCTTCGC-TAMRA-3'). The thermal profile was 50°C for 30 min and 95°C for 15 min, followed by 45 cycles at 94°C for 1 min, 51°C for 1 min and 72°C for 1 min. An external standard curve was applied to calculate HEV viral load using a WHO International Standard HEV strain, supplied by the Paul-Ehrlich-Institute (code 6329/10).

HEV genotyping and phylogenetic analysis

Samples from patients positive for real-time RT-PCR were selected for amplification of a portion of ORF2 by nested RT-PCR using BioRad T100 Thermocycler and QIAGEN One Step RT-PCR kit. The first-round PCR was carried out with forward primer HEV-5920S: 5'-CAAGGHTGGCGYTCKGTTGAGAC-3' and anti-sense primer HEV-6425A: 5'-CCCTTRTCTGCTGAGCRTTCTC-3'. The thermal profile was 50°C for 30 min and 95°C for 15 min, followed by 45 cycles at 94°C for 1 min, 51°C for 1 min and 72°C for 1 min and 72°C for 10 min. The second-round PCR was carried out with forward primer HEV-5930S: 5'-GYTCKGTTGAGACCWCBGGBGT-3' and anti-sense primer HEV-6334A: 5'-TTMACWGTCRGCTCGCCATTGGC-3' under the following thermal conditions: 94°C for 5 min, 45 cycles of 94°C for 1 min, 51°C for 1 min, 72°C for 1 min and 72°C for 5 min. The second amplification product of 467 bp was sequenced using the

BigDye Terminator Cycle Sequencing on an ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). HEV genotyping was performed as described elsewhere.¹⁴ Consensus sequences were obtained using CLC Main Workbench 5.5.2. All sequences originating from this study have been deposited in GenBank under accession numbers: MT250069-MT250080. Sequence alignments were generated by MEGA Software (Version 7). Phylogenetic trees were constructed using the neighbour-joining method of MEGA (Version 7), including HEV genotype/subtype standard strains.

Ethical considerations

This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee for Human Health (IRECHH) of the Catholic University of Central Africa.

Results

Of the 33 samples that had elevated HEV IgM previously, 24 samples had sufficient volumes (200 μ L) to perform molecular assays. HEV RNA was successfully extracted and quantified by real-time RT-PCR in 20 samples (83.3%). Amongst these, 12 samples were positive for HEV RNA by nested RT-PCR and yielded good sequencing products (Table 1). Table 1 shows the demographic characteristics of the study population as well as the results obtained from molecular analysis.

Phylogenetic analysis showed that there were two distinct genotypes responsible for the first HEV outbreak in Cameroon. Majority of the samples clustered with genotype 1 subtype 1e which were grouped together with human HEV strains from different geographic regions of the world, in particular with strains from African countries such as Nigeria and the Central African Republic (Figure1), meanwhile two samples clustered with sub-genotype 3f were clustered together with viruses isolated from humans in France, Japan, and Denmark as well as with strains from pigs in France and Spain (Figure1).

Discussion

In 2013, the first outbreak of HEV was reported in Cameroon based on serological identification of anti-HEV antibodies in the samples of suspect cases.⁹ However, due

to the absence of a gold standard assay to screen for HEV, it is recommended that serological assays be complemented to molecular assays in order to conclude on an HEV infection.¹⁵ In this study, we detected HEV RNA by real time RT-PCR in 83.3% of select samples collected during this outbreak period and confirm that the illness associated with jaundice and fever was effectively due to HEV. We believe that the quantification of RNA was not optimal due to the condition of the samples which had been received in the laboratory after four days of transport, not in the best temperature conditions. The results of this amplification show that the enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) HEV IgM ELISA 3.0 kit (MP Biomedicals, Singapore) is a useful diagnostic tool which can be used in circumstances where molecular detection is not feasible.

This is the first report on the molecular characterization of HEV in a human population of Cameroon. Sequence analyses enabled the identification of samples of genotype 1 and genotype 3. A previous study from Venezuela as well found the simultaneous presence of these both genotypes among patients with acute hepatitis.¹⁶ HEV genotype 1 has been reported to be transmitted by the fecal-oral route through contaminated water, while genotype 3 is attributed to zoonotic exposure by consuming raw or undercooked meat products.¹⁷ The fact that majority of the patients harbored genotype 1 is consistent with previous reports that state that this genotype is more frequent in developing countries where there is poor sanitation.¹⁸ Interestingly, two cases of genotype 3 were as well detected in this population, showing that this genotype is not only present in industrialized countries¹⁹ and that there were probably two sources of infection in this outbreak. Unfortunately, information on dietary habits or profession of the suspect cases was not collected in order to bring more light on the source of infection. Although pigs are the main reservoir for HEV, it is important to note that, pig farms exist but pork meat is seldom consumed in the North region of Cameroon due to religious beliefs. HEV genotype 3 has been detected in wastewater in several studies.²⁰ These results would suggest a possible contamination of the water by pig feces or travelers infected with HEV and which would be at the origin of the presence of genotype 3 in humans. It is well known that genotypes 3 and 4 are zoonotic and are responsible for sporadic and autochthonous infections in both humans and several other animal species worldwide. Animals such as goats, sheep, cows, donkeys, and horses, possible reservoirs of HEV, living in close quarters with

humans, could serve as reservoirs of HEV in this region of Cameroon. In addition, North-Cameroon has one of the largest zoological parks where several animal species are conserved, among which the reservoirs of the HEV. Further studies are necessary to elucidate other potential reservoirs that might have been involved in the spread of HEV genotype 3 during this outbreak.

All these results show that due to the absence of routine screening of HEV in the health system, HEV infection remains globally unknown in the human population and when this infection becomes symptomatic, the diagnosis is directed towards other diseases as was the case with these patients suspected to having yellow fever virus in 2013.⁹

The limit of our study is that the samples used for the amplification had not arrived at the laboratory under the optimal temperature conditions required, which would have influenced the results obtained with a possible degradation of RNA.

Conclusion

This study fills the gap of knowledge on the molecular epidemiology of HEV in Cameroon and confirms the first report of hepatitis E outbreak in North-Cameroon. Despite these findings, much still remains to be done to understand the epidemiology of this infection in this country. Sensitization campaigns should be performed in order to reduce transmission of HEV via the fecal-oral route; meanwhile research should be targeted at searching other reservoirs of HEV in Cameroon, the diet of the population or the quality of the water consumed. This will enable policy makers to be better armed in defining prevention and control strategies.

Funding information:

This work was supported by the Ministry of Economy and Competitiveness (RD12/0017/0012) integrated in the National R+D+i Plan and co-financed by the European Regional Development Fund, and the Health Research Fund from the Institute of Health Carlos III (ISCIII) (PI19/00864), and The SPANISH AIDS Research Network RD16/0025/0034 - ISCIII – FEDER. ARJ is the recipient of a Miguel Servet Research Contract by the Ministerio de Ciencia, Promoción y Universidades of Spain (CP18/00111).

This article is protected by copyright. All rights reserved.

Acknowledgements

The authors would like to thank the general management of IMIBIC for all the efforts made and Ismael Zafra for its technical support for this study.

Conflicts of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

References

1. WHO. Hepatitis E Fact Sheet. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/en/> (accessed on 15 February 2017).
2. Marano G, Vaglio S, Pupella S, et al. Hepatitis E: an old infection with new implications. *Blood transfusion = Trasfusione del sangue*. 2015;13(1):6-17.
3. Smith DB, Simmonds P, Jameel S, et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *The Journal of general virology*. 2014;95(Pt 10):2223-2232.
4. Lee GH, Tan BH, Teo EC, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology*. 2016;150(2):355-357.e353.
5. Woo PC, Lau SK, Teng JL, et al. New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerging infectious diseases*. 2016;22(12):2219-2221.
6. Smith DB, Simmonds P, Izopet J, et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *The Journal of general virology*. 2016;97(3):537-542.
7. Akanbi OA, Harms D, Wang B. Complete Genome Sequence of a Hepatitis E Virus Genotype 1e Strain from an Outbreak in Nigeria, 2017. 2019;8(1).

8. Amougou Atsama M, Atangana PJA, Noah Noah D, Moundipa PF, Pineau P, Njouom R. Hepatitis E virus infection as a promoting factor for hepatocellular carcinoma in Cameroon: Preliminary Observations. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017.
9. Demanou M, Mahamat A, Nimpa MM, Njouom R. First documented outbreak of Hepatitis E in Northern Cameroon. *Annals of Tropical Medicine and Public Health*. 2013;6(6):682-683.
10. Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, et al. Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2013;58(1):18-23.
11. Modiyinji AF, Atsama MA, Monamele CG, Nola M, Njouom R. Seroprevalence of Hepatitis E virus antibodies in different human populations of Cameroon. *Journal of medical virology*. 2019.
12. Modiyinji AF, Sanding G, Atsama MA, Monamele CG, Nola M, Njouom R. Serological and molecular investigation of hepatitis E virus in pigs reservoirs from Cameroon reveals elevated seroprevalence and presence of genotype 3. *PloS one*. 2020;15(2):e0229073.
13. Noufensi MK, M.; Njukeng, PA.; Anong, DN.; Masebe, TM.; Tamoufe, U.; Echelibe, H.; Ter Goon, D.; Nwobegahay, JM.. Seroprevalence and risk factors of Hepatitis E virus infection among pregnant women at the Yaounde Central Hospital, Cameroon. *Microbiol Res Int*. 2016;4(4):50-54.
14. Rivero-Juarez A, Frias M, Martinez-Peinado A, et al. Familial Hepatitis E Outbreak Linked to Wild Boar Meat Consumption. *Zoonoses and public health*. 2017;64(7):561-565.
15. El-Sayed Zaki M, El-Deen Zaghloul MH, El Sayed O. Acute sporadic hepatitis E in children: diagnostic relevance of specific immunoglobulin M

and immunoglobulin G compared with nested reverse transcriptase PCR. *FEMS immunology and medical microbiology*. 2006;48(1):16-20.

16. García CG, Sánchez D, Villalba MC, et al. Molecular characterization of hepatitis E virus in patients with acute hepatitis in Venezuela. *Journal of medical virology*. 2012;84(7):1025-1029.
17. Yazaki Y, Mizuo H, Takahashi M, et al. Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *The Journal of general virology*. 2003;84(Pt 9):2351-2357.
18. Li P, Liu J, Li Y, et al. The global epidemiology of hepatitis E virus infection: a systematic review and meta-analysis. *Liver international: official journal of the International Association for the Study of the Liver*. 2020.
19. Kim JH, Nelson KE, Panzner U, Kasture Y, Labrique AB, Wierzb TF. A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC infectious diseases*. 2014;14:308.
20. Beyer S, Szewzyk R, Gnirss R, Johne R, Selinka HC. Detection and Characterization of Hepatitis E Virus Genotype 3 in Wastewater and Urban Surface Waters in Germany. *Food and environmental virology*. 2020.

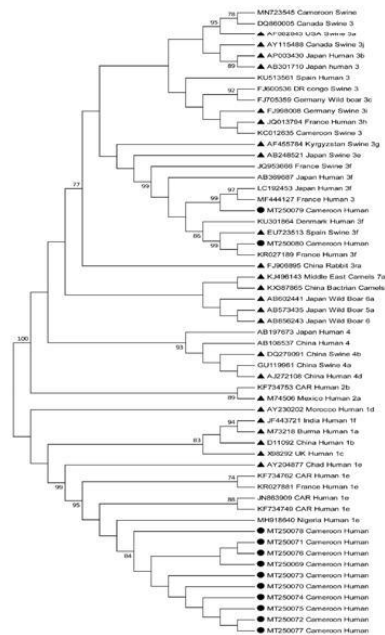
Table 1: Demographic characteristics of human population and results of molecular assay.

Patient	Age (years)	Gender	HEV Genotype	HEV Subtype	IU/ mL	GenBank Accession Number
1	18	Female	1	1e	241,930	MT250069
2	16	Male	1	1e	558,890	MT250070
3	26	Male	1	1e	87,060	MT250071
4	30	Female	1	1e	80,860	MT250072
5	19	Male	1	1e	195,030	MT250073
6	27	Female	1	1e	4,790	MT250074

7	49	Female	1	le	255,710	MT250075
8	38	Male	1	le	859,990	MT250076
9	34	Female	1	le	925,930	MT250077
10	22	Male	1	le	122,150	MT250078
11	44	Male	3	3f	2,480	MT250079
12	31	Male	3	3f	79,380	MT250080

Abbreviations. HEV: hepatitis E virus; IU: International Unity; mL: milliliter.

Figure 1: Phylogenetic tree of HEV human strains based on a fragment of ORF2. The phylogenetic tree was constructed by the Neighbour-Joining method and the genetic distances were calculated by the Kimura 2 parameters model. Only bootstrap values > 70 are presented next to each branch. GenBank reference strains (Smith's standard chains denoted by black triangle) are included and for each, the accession number, country of origin, host and genotype are indicated. The strains identified in our study are denoted by black circle



RESEARCH ARTICLE

Open Access

Epidemiology of hepatitis E virus infection in animals in Africa: a systematic review and meta-analysis



Abdou Fatawou Modiyinji^{1,2}, Jean Joel Bigna^{3,4}, Sebastien Kenmoe¹, Fredy Brice N. Simo^{1,3}, Marie A. Amougou^{1,3}, Marie S. Ndangang⁵, Moise Nola² and Richard Njoum^{1*}

Abstract

Background: Hepatitis E virus (HEV) is a major cause of acute hepatitis in humans worldwide and have high burden in the resource-limited countries. Better knowledge of the epidemiology of hepatitis in animals in Africa can help to understand the epidemiology among humans. The objective of this study was to summarize the prevalence of HEV infection and distribution of HEV genotypes among animals in Africa.

Methods: In this systematic review and meta-analysis, we comprehensively searched PubMed, EMBASE, African Journals Online, and Africa Index Medicus from January 1st, 2000 to March 22th, 2020 without any language restriction. We considered cross-sectional studies of HEV infection in animals in Africa. Study selection, data extraction, and methodological quality of included studies were done independently by two investigators. Prevalence data were pooled using the random-effects meta-analysis. This review was registered in PROSPERO, CRD42018087684.

Results: Twenty-five studies (13 species and 6983 animals) were included. The prevalence (antibodies or ribonucleic acid [RNA]) of HEV infection in animals varied widely depending on biological markers of HEV infection measured: 23.4% (95% confidence interval; 12.0–37.2) for anti-HEV immunoglobulins G, 13.1% (3.1–28.3) for anti-HEV immunoglobulins M, and 1.8% (0.2–4.3) for RNA; with substantial heterogeneity. In subgroup analysis, the immunoglobulins G seroprevalence was higher among pigs 37.8% (13.9–65.4). The following HEV genotypes were reported in animals: Rat-HEV genotype 1 (rats and horses), HEV-3 (pigs), HEV-7 (dromedaries), and Bat hepeviruses (bats).

Conclusions: We found a high prevalence of HEV infection in animals in Africa and HEV genotypes close to that of humans. Some animals in Africa could be the reservoir of HEV, highlighting the need of molecular epidemiological studies for investigating zoonotic transmission.

Keywords: Hepatitis E, Epidemiology, Africa, Animals, Veterinary

* Correspondence: njouom@pasteur-yaounde.org

¹Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Background

Worldwide, hepatitis E virus (HEV) is a major cause of acute hepatitis in humans. HEV belongs to the family of Hepeviridae and consists of a non-segmented, non-enveloped and single-stranded ribonucleic acid (RNA) [1, 2]. This family is divided into the two genera: *Orthohepevirus* and *Piscihepevirus* [1, 3]. Four species designated as *Orthohepevirus A* to *D* are found in the genus *Orthohepevirus* [3]. *Orthohepevirus A* contains eight genotypes (HEV-1 to HEV-8) [1, 4]. HEV-1 and HEV-2 are exclusively detected in humans. These two genotypes are responsible for large hepatitis E outbreaks described in developing regions like Africa and Asia. HEV-3 and HEV-4 are present in humans and other animals, and are the main cause of sporadic infection among humans in developed countries. These two genotypes are considered zoonotic, and pigs and other animal species are reservoir of viruses infecting humans [5]. HEV-5 and HEV-6 have been identified in Japanese wild boars [6]. HEV-7 has been described recently in an immunocompromised transplant patient and in dromedary camels [7, 8]. HEV-8 was detected recently in Bactrian camels in China [4]. *Orthohepevirus B* contains four subtypes (I–IV) of avian viruses identified mainly in domestic chicken. Two genotypes detected in rats (HEV-C1) and carnivores (HEV-C2) belong to *Orthohepevirus C*. Different bat species represent the animal reservoirs for *Orthohepevirus D* strains [1, 5, 9, 10]. *Piscihepevirus A* identified in cut-throat trout and related species is only one species described in the genus *Piscihepevirus* [1].

In 2010, one-third of the world's population has been infected with HEV [11]. A case-fatality rate of 1–4% in the general population might reach 30% in pregnant women infected with HEV-1. In addition, chronic disease courses could be observed in immunocompromised transplant patients infected with HEV-3 [12, 13]. HEV causes large outbreaks and sporadic cases of acute hepatitis [14]. There is heterogeneity in the distribution of HEV as cause of acute hepatitis; with HEV responsible for more than 50% of the acute hepatitis infections in some countries like India, 15–20% in Eastern-Oriental countries, and 25% in Africa [15].

The systematic review published by Kim and colleagues in 2014 provided an overview of the epidemiology of HEV infection in humans in Africa. Since 1979, 17 HEV outbreaks have been reported, around once every year in Africa; causing a reported 35,300 cases with 650 deaths. Three HEV genotypes (HEV-1, 2 and 3) have been detected in humans in Africa and it appears that HEV-1 is most prevalent than HEV-2 and HEV-3 [14]. Animals might therefore play a role in the transmission of HEV in Africa as in developed countries. However, evidence of zoonotic transmission in Africa is not well established. Therefore, better knowledge of the

epidemiology of HEV in animals in Africa can help to understand the epidemiology among humans and consequently help to design better strategy to curb the burden of HEV infection in Africa through interventions in animals and on interaction between humans and animals.

The objective of this study was to describe the epidemiology of HEV infection in animals in Africa based on a systematic review and meta-analysis. We specifically aimed to summarize data on the seroprevalence and viral prevalence of HEV infection in animals in Africa. We also aimed to identify different HEV genotypes found in animals in Africa, to investigate whether animal in Africa might represent a HEV reservoir.

Methods

Design

This systematic review with meta-analysis was registered in PROSPERO, CRD42018087684 and the protocol was published in a peer-review journal [16]. This review was reported according to PRISMA guidelines [17]. This systematic review and meta-analysis was conducted as recommended in the Joanna Briggs Institute reviewer's manual for prevalence and incidence review [18].

Criteria for considering studies for this review

Types of participants

We considered animals living in Africa regardless of age and sex. We excluded studies performed in laboratory animals, studies conducted in animals imported in the Africa continent, studies in which sample were not directly collected in animals (like feces in the breeding areas), and studies reporting HEV cases imported from outside Africa.

Types of outcomes

- HEV prevalence based on the biological markers including serological markers like immunoglobulins (Ig G and Ig M or molecular markers like HEV RNA measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction.
- HEV genotypes identified by molecular techniques.

Types of studies

We considered only cross-sectional studies.

Search strategy and identification of studies

We searched Medline through PubMed, Excerpta Medica Database, African Journals Online, and Africa Index Medicus from January 1st, 2000 to March 22th, 2020 without any language restriction. We manually searched the reference list of all relevant articles and reviews to identify additional articles. The full search strategy in PubMed is available in the published protocol [16]. This

search strategy was built according to PRESS guidelines [19]. In brief, text words and medical subject heading terms; and their variants were used. These terms included “Hepatitis E”, “Africa”, and individual names of African countries and regions; with a filter for animals.

Two review authors independently read titles and abstracts of the identified references and eliminated obviously irrelevant studies. These two review authors independently retrieved full-text articles for the references that remained, and examined potentially relevant studies, using the predetermined inclusion criteria. Existing disagreements were solved by a third review author.

Data extraction and management

Two review authors independently extracted data from the included studies. Data were double checked by a third author. Data extracted included name of first author, year of publication, period of recruitment, types of genotypes, site of recruitment, sampling method, species, number of animals examined, number of animals infected with hepatitis E virus, ascertainment of HEV infection, age distribution, and proportion of male animals. We extracted data by animal species even coming from a unique study considering therefore each species in each study as the unit of analysis.

Assessment of the methodological quality

An adapted version of the risk of bias tool for prevalence studies developed by Hoy and colleagues has been used to evaluate the methodological quality of included studies [20]. The defined items were scored with 0 for ‘No’ and 1 for ‘Yes’. The total score of each included study was calculated by the sum of its items. Methodological quality was considered as low, moderate, and high for scores of 0–4, 5–7 and 8–10, respectively. Two review authors assessed the methodological quality and disagreements were solved through a consensus or by an arbitration of a third review author.

Data synthesis and analysis

Data analysis was conducted using the “meta” packages of the *R* statistical software (version 3.6.2, The R Foundation for statistical computing, Vienna, Austria). The prevalence of HEV infection was recalculated on the basis of numerators and denominators provided by individual studies. To minimize the effect of studies with extremely small or extremely large prevalence estimates on the overall estimate, the variance in study-specific prevalence was stabilized with Freeman-Tukey arc-sine transformation before pooling the data with the random effects meta-analysis model [21]. Heterogeneity was assessed by the chi-square test on Cochran’s Q test [22], which was quantified by I^2 values, assuming I^2 values of 25, 50 and 75% respectively representative low, medium

and high heterogeneity [23]. When substantial heterogeneity was detected ($I^2 > 50\%$), we performed subgroup analysis by animal species to investigate possible sources of heterogeneity (for studies with 10 more animals by species). The Egger test was performed to assess the presence of publication bias and selective reporting [24]. A p value < 0.10 was considered indicative of a statistically significant publication bias. We synthesized data on genotypes in the narrative format.

Results

The review process

Initially, a total of 514 records were identified. One hundred and forty duplicates were removed. After screening titles and abstracts, 319 records were found irrelevant and then excluded. Agreement between review authors on abstract selection was high (Kappa = 0.85, $p < 0.001$). Full-texts of the remaining 55 records were scrutinized for eligibility, among which 30 were excluded. Finally, 25 studies were retained (Fig. 1) [8, 25–48].

Characteristics of included studies

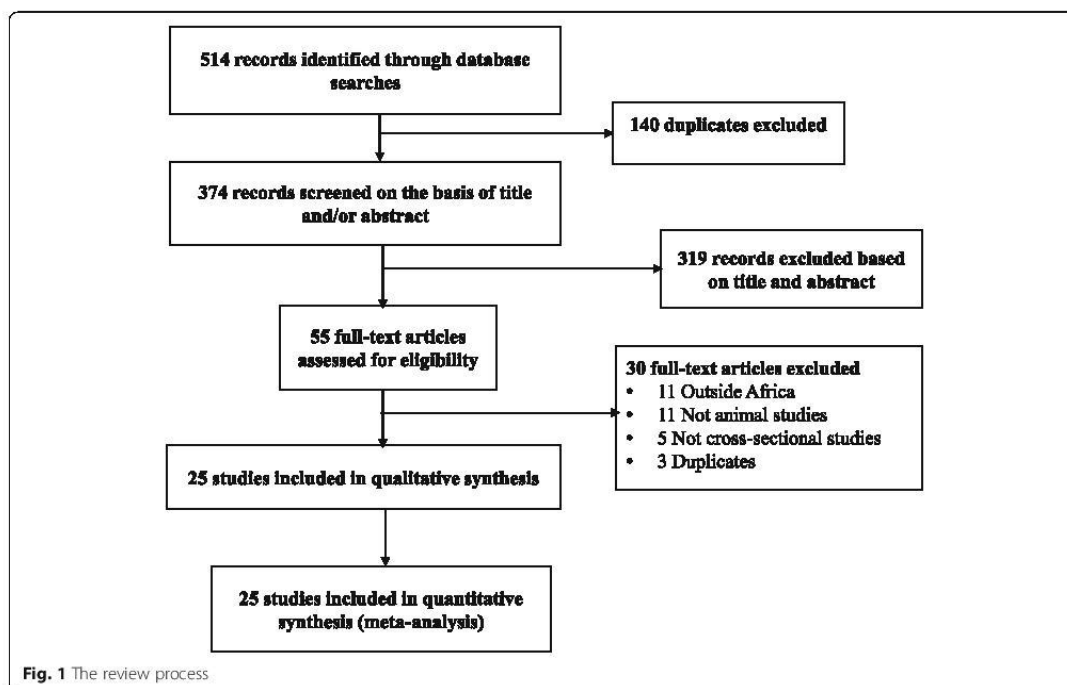
Studies were published between 2006 and 2020. Animals were included in studies between 1983 and 2018. Nine, five, and three studies were from rural, urban and both settings. Eight studies did not specify the setting. Sampling was consecutive and random in 13 and 12 studies respectively. Data were collected prospectively and retrospectively in 20 and five studies respectively. Data were from 19 countries. Five (20%) studies had low, 16 (64%) moderate, and four (16%) high risk of bias (Supplementary Table 1).

Prevalence of HEV infection in animals in Africa

In total, data were from 6983 animals including 13 species (Bats ($n = 1417$), Buffaloes ($n = 57$), Chicken ($n = 1$), Cows and Beefs ($n = 74$), Donkeys ($n = 47$), Dromedaries ($n = 1483$), Ducks ($n = 1$), Goats and Sheep ($n = 404$), Horses ($n = 200$), Monkeys ($n = 173$), Pigs ($n = 2721$), Rabbits ($n = 173$), and Rats ($n = 43$)).

The prevalence of HEV infection in animals varied widely depending on biological markers: 23.4% (95% confidence interval; 12.0–37.2) for anti-HEV IgG, 13.1% (3.1–28.3) for anti-HEV IgM, and 1.8% (0.2–4.3) for HEV RNA with substantial heterogeneity (Table 1). The 95% prediction interval was wide for anti-HEV IgG and anti-HEV IgM. There was no publication bias (Table 1) as indicated by funnel plots for anti-HEV IgG and RNA (Supplementary Figs. 1 and 2).

When considering subgroup analysis by specie, the viral HEV prevalence varied from 0% in rabbits to 16.7% in goats and sheep with significant difference between species considering RNA, $p < 0.0001$ (Fig. 2). The IgG seroprevalence varied from 0.0% in cows and beefs to



35.1% in pigs with significant difference between species, $p < 0.0001$ (Fig. 3). IgM seroprevalence varied from 0% in cows and beefs to 25.8% in goats and sheep, $p < 0.0001$ (Fig. 4).

HEV genotypes in animals in Africa

The following four HEV genotypes were reported by 10 studies: rat-HEV genotype 1, Bat hepevirus, HEV-3, and HEV-7 (Table 2). Seven studies demonstrated the presence of HEV-3 in pigs in Cameroon, Democratic Republic of Congo, Nigeria, São Tomé and Príncipe, Madagascar and Burkina Faso. Rat-HEV genotype 1 was found in rats and horses in Egypt. HEV-7 was found in dromedaries in Somalia and Kenya. Additionally, bat hepevirus was found in bats in Ghana and Gabon (Table 2).

Discussion

This systematic review with meta-analysis reveals that the prevalence of HEV infection in animals varied widely depending on biological markers: 23.4% with IgG, 13.1% with IgM, and 1.8% with RNA. We also found a substantial heterogeneity in the overall IgG and IgM seroprevalence and viral prevalence that was explained by difference in the HEV distribution among different animal species. Pigs presented the highest IgG seroprevalence of 35.1% followed by dromedaries, cows and beefs, and goats and sheep with IgG seroprevalence between 10 and 15%. Donkeys, pigs, rats, and goats and sheep presented a viral prevalence of more than 3%. Pigs, goats, and sheep presented an IgM seroprevalence higher than 10% compared to others. Four genotypes were identified in animals in Africa: rat-HEV genotype 1, HEV-3, HEV-7 and bat hepevirus.

Table 1 Summary statistics of meta-analysis prevalence of hepatitis E virus infection in animals in Africa

Biological markers	Prevalence, % (95% confidence interval)	Studies, n	Animals, n	Heterogeneity			P Egger test
				95% Prediction interval	I ² , %	P value	
Ribonucleic acid	1.8 (0.2–4.3)	14	4621	0.0–17.0	94.6	< 0.0001	0.174
Immunoglobulins M	13.1 (3.1–28.3)	5	1174	0.0–81.1	97.6	< 0.0001	0.755
Immunoglobulins G	23.4 (12.0–37.2)	14	3016	0.0–83.3	98.6	< 0.0001	0.450

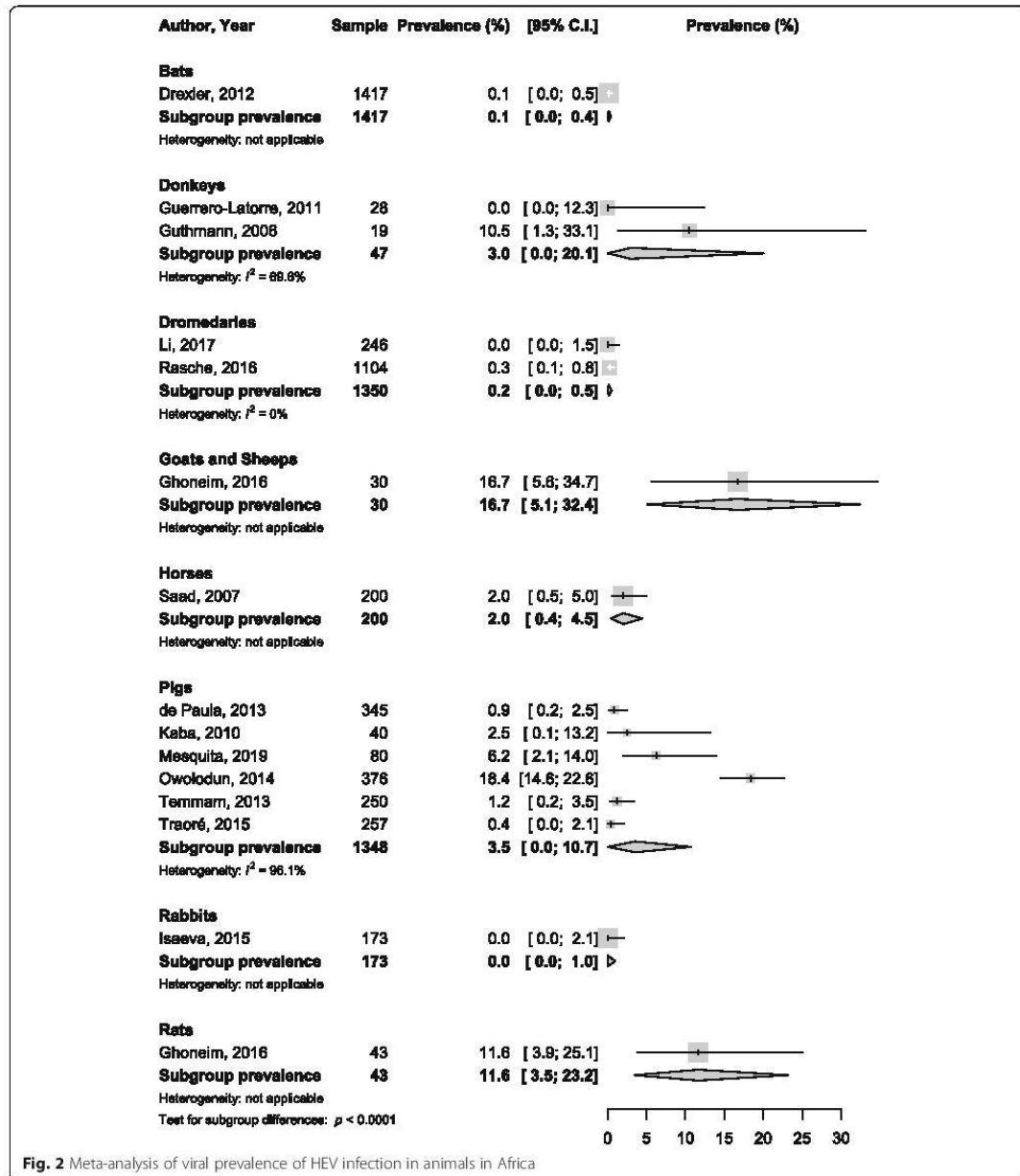


Fig. 2 Meta-analysis of viral prevalence of HEV infection in animals in Africa

The seroprevalence (IgM 16.9% and IgG 35.1%) and viral prevalence (3.5%), we found among pigs overlap prevalence estimates from other countries outside Africa [49]. Like in Africa, there is a wide variation in IgG seroprevalence in pigs living in other regions including North America (35–59%), Oceania (72–91%),

South America (23–64%), Europe (20–97%), and Asia (9–100%) [49]. In a recent systematic review and meta-analysis reported from Mainland China among pigs, the IgG seroprevalence was 66% (95% CI: 62–71) [50], higher to the IgG seroprevalence found in this study.

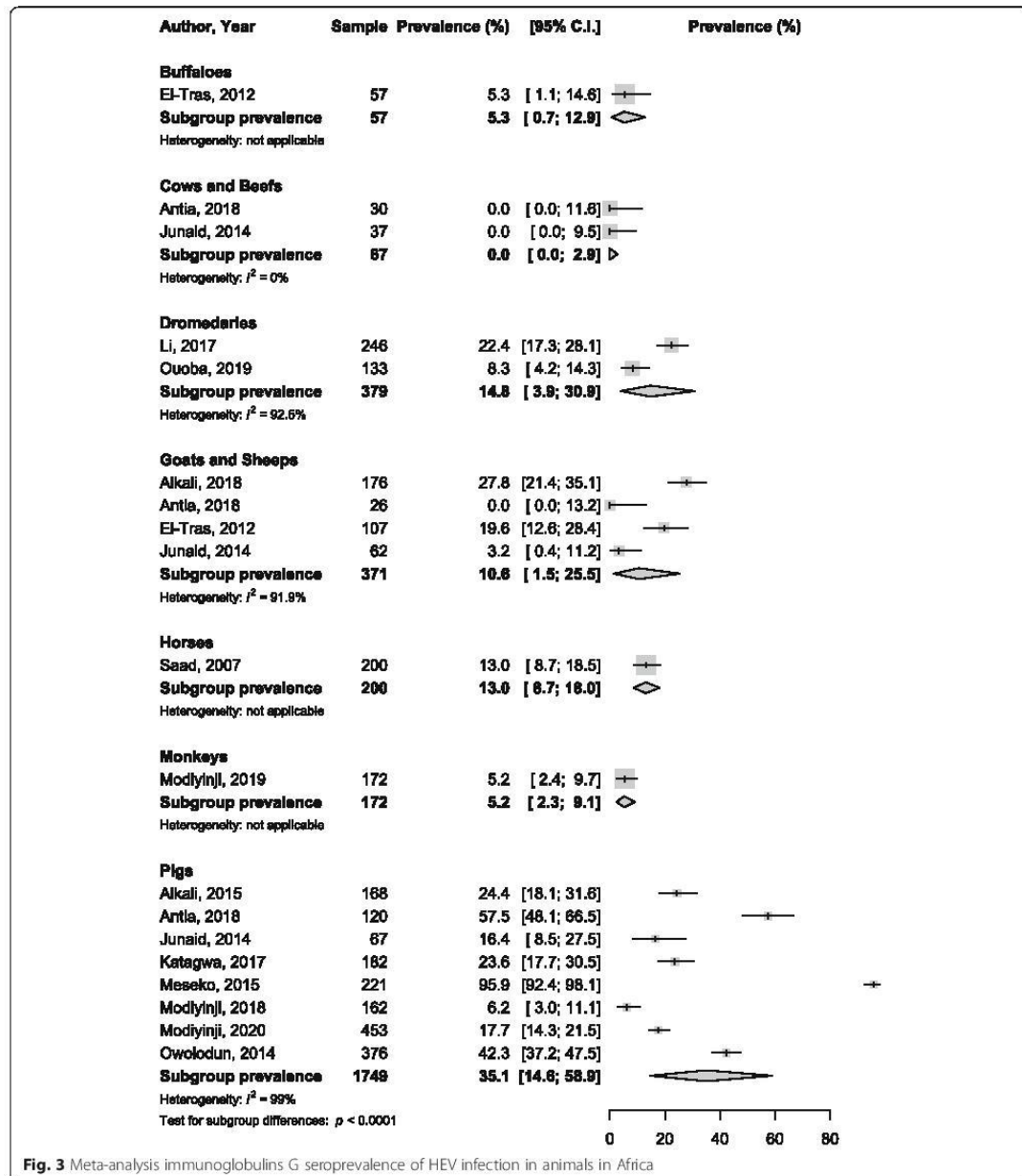


Fig. 3 Meta-analysis immunoglobulins G seroprevalence of HEV infection in animals in Africa

Among sheep and goats, studies in China reported a seroprevalence of IgG varying from 14.3 to 35.2% [51, 52], slightly higher than the finding of this study (10.6%). The same figure is found for viral prevalence where prevalence data from China (74.1%) were higher compared to prevalence in Africa (16.7%) and Europe (9.2%)

[52, 53]. A study reported in the Middle East revealed that 1.5% (0.5–4.3) of the dromedaries showed evidence of the presence of HEV RNA in their blood samples [54, 55]. The viral prevalence found in this study was 0.2% (0.0–0.5), slightly lower compared to data from Middle East. Detection of HEV RNA in dromedary in Africa was

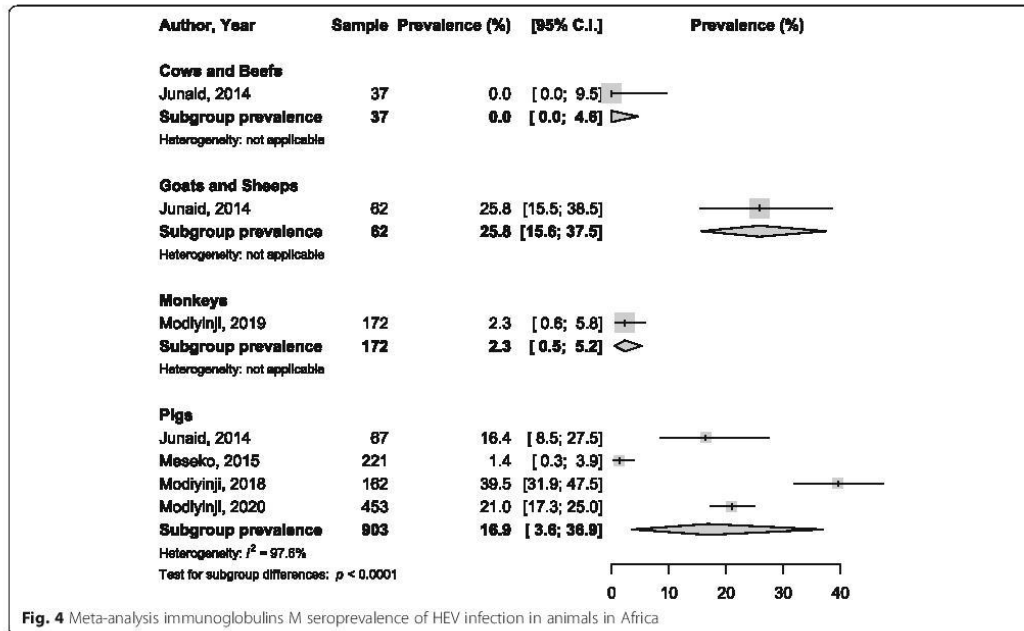


Fig. 4 Meta-analysis immunoglobulins M seroprevalence of HEV infection in animals in Africa

done from blood samples while in Middle East, laboratory analysis was performed on stool. Evidence support that HEV presence in fecal excretion lasts longer than viremia [56]. A study performed in 12 European countries between 2012 and 2015 showed a viral prevalence of rat-HEV genotype 1 in 12.4% of 508 rats [55], higher than that we found (11.6%) in this study. This European study used two molecular methods (real-time and conventional PCR) that target different HEV Orthohepevirus species whereas the Egyptian study used only one method (conventional PCR). The high sensitivity of the real-time PCR has been demonstrated in studies and

may explain the differences observed in both studies [57].

Among cows, studies conducted in China between 2015 and 2018 showed a viral prevalence that varied between 0 and 37.1% [58–60]. In a study conducted in Belgium, the prevalence was 0% for HEV RNA and for IgG anti-HEV [61]. We also found an IgG seroprevalence of 0% from two studies. Among buffaloes, study conducted in Lao People’s Democratic Republic in 2015 showed an IgG seroprevalence of 20% [62], higher than that we found in Africa (5.3%).

Table 2 Hepatitis E genotypes in animals in Africa

Genotypes	Studies	Animals	Countries
Rat-HEV genotype 1	Ghoneim, 2016 [30]	Rats	Egypt
	Saad, 2007 [42]	Horses	Egypt
HEV-3	de Paula, 2013 [27]	Pigs	Cameroon
	Modiyinji, 2020	Pigs	Cameroon
	Traoré, 2015 [44]	Pigs	Burkina Faso
	Kaba, 2010 [35]	Pigs	Democratic Republic of the Congo
	Temmam, 2013 [43]	Pigs	Madagascar
	Owolodun, 2014 [41]	Pigs	Nigeria
HEV-7	Mesquita, 2019 [38]	Pigs	São Tomé and Príncipe
	Rasche, 2016 [8]	Dromedaries	Somalia; Sudan; Egypt; Kenya
Bat hepevirus	Drexler, 2012 [28]	Bats	Ghana; Gabon

To date, HEV infection remains a global public health concern [15]. It is therefore important to implement strategies to curb the burden through public health education and intervention programs, improved clinical practice and innovation in research for this infection [63]. Since, this study demonstrated that some HEV genotypes found in animals were already found in humans, large-scale molecular epidemiological studies are needed in the continent to investigate any HEV zoonotic transmission. This zoonotic transmission was already demonstrated in other settings [2]. This study also shows that other animal species including chickens and wild boar, already identified as a reservoir of HEV are not yet studied in Africa. It is therefore necessary to perform investigations in these animals [64–69].

Although the rate of zoonotic transmission to humans and its public health importance remain unclear [70]; strategies are needed to prevent the potential zoonotic transmission, especially among individuals with direct contact with animals [71]. Since there is no specific treatment for HEV infection, public health policy makers should implement comprehensive public health measures, especially for high group risk individuals in African countries such as educating the farmers, slaughterers, butchers, forest workers, hunters, and veterinarians [72, 73]. A hepatitis E vaccine was licensed in China in 2012, and is currently the only hepatitis E vaccine available. Nonetheless, the World Health Organization did not issue a broad recommendation for its routine use outside of China [74]. Therefore, the development of an effective vaccine to vaccinate humans and also animals is urgently needed in order to minimize the risk of HEV zoonotic transmission [75]. Because cross-species transmission and host tropisms of zoonotic HEV genotypes are not yet understood, surveillance studies of swine and wildlife reservoirs should be conducted to identify all possible human exposure pathways [75].

This study has several limitations. First, we found substantial heterogeneity in the estimation of the overall prevalence of hepatitis E infection. We were able to identify some sources of heterogeneity including biomarkers considered and animal species. However, due to inconsistency in original studies, we were not able to investigate other sources of heterogeneity including population characteristics and variability in sensitivity and specificity of diagnostic methods in original studies. Second, African countries were not uniformly represented and can limit the generalizability of findings to the entire continent. Third, only 20% of the studies were assessed as having low risk of bias in their methodological quality suggesting that high quality epidemiological studies are needed. However, we were not able to perform sensitivity analysis including only studies with high

methodological quality due to paucity of data. Despite these limitations, this study is, to the best of our knowledge, the first systematic review and meta-analysis on prevalence of HEV infection in animals in Africa. We also included the investigation of different HEV genotypes. Strengths include a comprehensive search strategy and involvement of two independent investigators in all stages of the review process to minimize bias. We did not have publication bias for all outcomes.

Conclusions

We found a high prevalence of HEV infection in animals in Africa and HEV genotypes close to that of humans. As such, hepatitis E infection should deserve more attention from healthcare providers, researchers, policy-makers and stakeholders from many sectors. Some animals in Africa could be the reservoir of HEV, highlighting the need of molecular epidemiologic studies for investigating zoonotic transmission.

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12917-021-02749-5>.

Additional file 1: Supplementary Table 1. Individual characteristics of included studies. **Supplementary Figure 1.** Funnel plot for publication bias of IgG seroprevalence among animals in Africa. **Supplementary Figure 2.** Funnel plot for publication bias of RNA prevalence among animals in Africa.

Abbreviations

HEV: Hepatitis E virus; IgG: Immunoglobulins G; IgM: Immunoglobulins M; RNA: Ribonucleic acid

Acknowledgments

None.

Authors' contributions

AFM, SK, JJB, FBNS and RN conceived the study and with MN designed the protocol. JJB conceived the search strategy. AFM, SK, and JJB selected studies and extracted data. JJB synthesized and interpreted data. AFM and JJB drafted the manuscript. AFM, SK, FBNS, MAA, MSN, MN, JJB, and RN have critically reviewed the final manuscript for methodological and intellectual content. RN is the guarantor of the review. All authors approved the final version of the manuscript.

Authors' information

This study is a part of the PhD thesis of the first author (AFM).

Funding

This research did not receive any specific funding from a public, commercial or not-for-profit funding agency.

Availability of data and materials

The datasets used and analyzed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Ethics approval and consent to participate

Not applicable.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

None.

Author details

¹Department of Virology, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon. ²Department of Biology and Animal Physiology, Faculty of Sciences, University of Yaoundé I, Yaoundé, Cameroon. ³Department of Epidemiology and Public Health, Centre Pasteur of Cameroon, Yaoundé, Cameroon. ⁴School of Public Health, Faculty of Medicine, University of Paris Sud, Le Kremlin-Bicêtre, France. ⁵Department of Medical Information and Informatics, Rouen University Hospital, Rouen, France.

Received: 31 August 2019 Accepted: 6 January 2021

Published online: 25 January 2021

References

- Smith DB, Simmonds P, Jameel S, Emerson SU, Harrison TJ, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WH, Purdy MA. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2014;95(Pt 10):2223–32.
- Spahr C, Knauf-Witzens T, Vahlenkamp T, Ulrich RG, Johne R. Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review; 2017.
- Purdy MA, Harrison TJ, Jameel S, Meng XJ, Okamoto H, Van der Poel WHM, Smith DB, Ictv Report C. ICTV virus taxonomy profile: Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(11):2645–6.
- Woo PC, Lau SK, Teng JL, Cao KY, Wernery U, Schountz T, Chiu TH, Tsang AK, Wong PC, Wong EY, et al. New hepatitis E virus genotype in Bactrian camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(12):2219–21.
- Spahr C, Knauf-Witzens T, Vahlenkamp T, Ulrich RG, Johne R. Hepatitis E virus and related viruses in wild, domestic and zoo animals: A review. *Zoonoses Public Health.* 2017;65(1):11–29.
- Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, 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(Pt 4):902–8.
- Lee GH, Tan BH, Teo EC, Lim SG, Dan YY, Wee A, Aw PP, Zhu Y, Hibberd ML, Tan CK, et al. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016;150(2):355–7 e353.
- Rasche A, Saqib M, Lijander AM, Bornstein S, Zohaib A, Renneker S, Steinhagen K, Wernery R, Younan M, Gluecks I, et al. Hepatitis E virus infection in dromedaries, north and East Africa, United Arab Emirates, and Pakistan, 1983–2015. *Emerg Infect Dis.* 2016;22(7):1249–52.
- Sridhar S, Teng JLL, Chiu TH, Lau SKP, PCY W. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *Int J Mol Sci.* 2017;18(4): 869.
- Sridhar S, Yip CCY, Wu S, Cai J, Zhang AJ, Leung KH, Chung TWH, Chan JFW, Chan WM, Teng JLL, et al. Rat hepatitis E virus as cause of persistent hepatitis after liver transplant. *Emerg Infect Dis.* 2018;24(12):2241–50.
- Viral hepatitis [http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WH/A63/A63_15-en.pdf].
- Feldt T, Sarfo FS, Zoufaly A, Phillips RO, Burchard G, van Lunzen J, Jochum J, Chadwick D, Awasom C, Claussen L, et al. Hepatitis E virus infections in HIV-infected patients in Ghana and Cameroon. *J Clin Virol.* 2013;58(1):18–23.
- Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus: advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2018;15(2):96–110.
- Kim JH, Nelson KE, Panzner U, Kasture Y, Labrique AB, Wierzbza TF. A systematic review of the epidemiology of hepatitis E virus in Africa. *BMC Infect Dis.* 2014;14:308.
- Purcell RH, Emerson SU. Hepatitis E: an emerging awareness of an old disease. *J Hepatol.* 2008;48(3):494–503.
- Modiyinji AF, Bigna JJ, Simo FBN, Nola M, Ndongang MS, Kenmoe S, Njouom R. Epidemiology of hepatitis E virus infection in animals in Africa: a systematic review and meta-analysis protocol. *Syst Rev.* 2019;8(1):120.
- Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gotzsche PC, Ioannidis JP, Clarke M, Devereaux PJ, Kleijnen J, Moher D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: explanation and elaboration. *J Clin Epidemiol.* 2009;62(10):e1–34.
- Munn Z, Moola S, Lisy K, Riitano D, Tufanaru C. Methodological guidance for systematic reviews of observational epidemiological studies reporting prevalence and cumulative incidence data. *Int J Evid Based Healthc.* 2015; 13(3):147–53.
- McGowan J, Sampson M, Salzwedel DM, Cogo E, Foerster V, Lefebvre C. PRESS Peer Review of Electronic Search Strategies: 2015 Guideline Statement. *J Clin Epidemiol.* 2016;75:40–6.
- Hoy D, Brooks P, Woolf A, Blyth F, March L, Bain C, Baker P, Smith E, Buchbinder R. Assessing risk of bias in prevalence studies: modification of an existing tool and evidence of interrater agreement. *J Clin Epidemiol.* 2012;65(9):934–9.
- Barendregt JJ, Doi SA, Lee YY, Norman RE, Vos T. Meta-analysis of prevalence. *J Epidemiol Community Health.* 2013;67(11):974–8.
- Cochran WG. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics.* 1954;10(1):101–29.
- Higgins JP, Thompson SG. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat Med.* 2002;21(11):1539–58.
- Egger M, Davey Smith G, Schneider M, Minder C. Bias in meta-analysis detected by a simple, graphical test. *BMJ (Clinical research ed).* 1997; 315(7109):629–34.
- Alkali BR, Bello M, Hussaini S, Onwuliri CO. Serological evidence and public health implication of hepatitis E virus infection in pigs found in Zaria, Kaduna State. *Afr J Microbiol Res.* 2015;9(46):2270–4.
- Alkali BR, Shuaibu AB, Bello M, Abubakar MB, Daneji AL. Sero-prevalence of hepatitis E virus (HEV) genotype 3 in goats from Sokoto Metropolis, Nigeria. *Afr J Microbiol Res.* 2018;12(33):815–9.
- de Paula VS, Wiele M, Mbunkah AH, Daniel AM, Kingsley MT, Schmidt-Chanasit J. Hepatitis E virus genotype 3 strains in domestic pigs, Cameroon. *Emerg Infect Dis.* 2013;19(4):666–8.
- Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V, Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Klose SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, et al. Bats worldwide carry hepatitis E virus-related viruses that form a putative novel genus within the family Hepeviridae. *J Virol.* 2012;86(17):9134–47.
- El-Tras WF, Tayel AA, El-Kady NN. Seroprevalence of hepatitis E virus in humans and geographically matched food animals in Egypt. *Zoonoses Public Health.* 2013;60(3):244–51.
- Ghoneim NH, Abdel-Aziz Abdel-Moein K, Hamza DA, Hagag NM. Occurrence of human hepatitis E virus in Norway rats: a zoonotic potential with great public health implications. *Asian Pac J Trop Dis.* 2016;6(9):718–21.
- Guerrero-Latorre L, Carratala A, Rodriguez-Manzano J, Calgua B, Hundesa A, Girones R. Occurrence of water-borne enteric viruses in two settlements based in eastern Chad: analysis of hepatitis E virus, hepatitis A virus and human adenovirus in water sources. *J Water Health.* 2011;9(3):515–24.
- Guthmann JP, Klovstad H, Boccia D, Hamid N, Pinoges L, Nizou JY, Tatay M, Diaz F, Moren A, Grais RF, et al. A large outbreak of hepatitis E among a displaced population in Darfur, Sudan, 2004: the role of water treatment methods. *Clin Infect Dis.* 2006;42(12):1685–91.
- Issaeva O, Ahmed Eladly M, Kiuregyan K, Potemkin I, Gordeyuk I, Karlsen A, Zhavoronok S, Mikhailov M. Rabbit hepatitis E virus circulation in endemic and non-endemic regions. *J Viral Hepat.* 2015;22:121–2.
- Junaid SA, Agina SE, Jaiye K. Seroprevalence of hepatitis E virus among domestic animals in plateau state-Nigeria. *Br Microbiol Res J.* 2014;4:924–34.
- Kaba M, Colson P, Musongela JP, Tshililo L, Davoust B. Detection of hepatitis E virus of genotype 3 in a farm pig in Kinshasa (Democratic Republic of the Congo). *Infect Genet Evol.* 2010;10(1):154–7.
- Katagwa M, Ssemadaali MA, Tumwine G, Majalija S, Mugisha L. Seroprevalence of hepatitis E virus in slaughter pigs and practices of abattoir workers in Kampala, Uganda. *Pan Afr Med J.* 2017;27(4):8.
- Li TC, Yoshizaki S, Zhou X, Sentsui H, Shirato K, Matsuyama S, Melaku SK, Bazartseren B, Takeda N, Wakita T. Serological evidence of hepatitis E virus infection in dromedary camels in Ethiopia. *J Virol Methods.* 2017;246:34–7.
- Mesquita JR, Istrate C, Santos-Ferreira NL, Ferreira AS, Abreu-Silva J, Veiga J, van der Poel WHM, Nascimento MSJ. Short communication: detection and molecular characterization of hepatitis E virus in domestic animals of Sao Tome and Principe. *Trop Anim Health Prod.* 2019;51(2):481–5.
- Modiyinji AF, Nola M, Monamele GC, Atsama MA, Njouom R. High seroprevalence of hepatitis E among pigs suggests an animal reservoir in Cameroon. *J Infect Dev Ctries.* 2018;12(08):676–9.
- Ouoba JB, Ouedraogo A, Kuan T, Ouoba BL, Rouamba H, Zerbo LH, Moctar S, Traore A, Roques PA, Barro N. Serological evidence of hepatitis E virus in dromedary camels in the Sahelian Zone of West Africa. *J Adv Microbiol.* 2019;15(4):1–7.
- Owolodun OA, Gerber PF, Gimenez-Lirola LG, Kwaga JK, Opriessnig T. First report of hepatitis E virus circulation in domestic pigs in Nigeria. *Am J Trop Med Hyg.* 2014;91(4):699–704.

42. Saad MD, Hussein HA, Bashandy MM, Kamel HH, Earhart KC, Fryauff DJ, Younan M, Mohamed AH. Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt. *Infect Genet Evol*. 2007;7(3):368–73.
43. Temmam S, Besnard L, Andriamandimby SF, Foray C, Rasamoelina-Andriamanivo H, Heraud JM, Cardinale E, Dellagi K, Pavio N, Pascalis H, et al. High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*. 2013;88(2):329–38.
44. Traore KA, Ouoba JB, Huot N, Rogee S, Dumarest M, Traore AS, Pavio N, Barro N, Roques P. Hepatitis E virus exposure is increased in pork butchers from Burkina Faso. *Am J Trop Med Hyg*. 2015;93(6):1356–9.
45. Antia RE, Adekola AA. Hepatitis E virus infection seroprevalence and the associated risk factors in animals raised in Ibadan, Nigeria. *J Immunoassay Immunochem*. 2018;39(5):509–20.
46. Meseko C, Odurinde O, Odaibo G, Olaleye D: Serological Evidence and Risk Factors Associated With Hepatitis E Virus Infection in Pigs and Human at an Intensive Piggery Complex, Lagos Nigeria. *J Health Commun* 2016;1(1):5.
47. Modiyinji AF, Sanding G, Atsama MA, Monamele CG, Nola M, Njoum R. Serological and molecular investigation of hepatitis E virus in pigs reservoirs from Cameroon reveals elevated seroprevalence and presence of genotype 3. *PLoS One*. 2020;15(2):e0229073.
48. Modiyinji AF, Amougou Atsama M, Monamele Chavely G, Nola M, Njoum R. Detection of hepatitis E virus antibodies among Cercopithecidae and Hominidae monkeys in Cameroon. *J Med Primatol*. 2019;48(6):364–6.
49. Salines M, Andraud M, Rose N. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res*. 2017;48(1):31.
50. Yue N, Wang Q, Zheng M, Wang D. Prevalence of hepatitis E virus infection among people and swine in mainland China: a systematic review and meta-analysis. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(3):265–75.
51. Wu J, Si F, Jiang C, Li T, Jin M. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes*. 2015;50(3):410–7.
52. Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, Huang F. High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J Med Virol*. 2017;89(11):1981–7.
53. Di Martino B, Di Profio F, Melegari I, Sarchese V, Robetto S, Marsilio F, Martella V. Detection of hepatitis E virus (HEV) in goats. *Virus Res*. 2016;225:69–72.
54. Woo PC, Lau SK, Teng JL, Tsang AK, Joseph M, Wong EY, Tang Y, Sivakumar S, Xie J, Bai R, et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis*. 2014;20(6):1044–8.
55. Ryll R, Bernstein S, Heuser E, Schlegel M, Dremsek P, Zumpe M, Wolf S, Pepin M, Bajomi D, Muller G, et al. Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Black rats (*Rattus rattus*) from 11 European countries. *Vet Microbiol*. 2017;208:58–68.
56. Aggarwal R, Goel A. Natural History, Clinical Manifestations, and Pathogenesis of Hepatitis E Virus Genotype 1 and 2 Infections. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2018;9(7):a032136.
57. Zhao C, Li Z, Yan B, Harrison TJ, Guo X, Zhang F, Yin J, Yan Y, Wang Y. Comparison of real-time fluorescent RT-PCR and conventional RT-PCR for the detection of hepatitis E virus genotypes prevalent in China. *J Med Virol*. 2007;79(12):1966–73.
58. Geng Y, Zhao C, Huang W, Wang X, Xu Y, Wu D, Du Y, Liu H, Wang Y. Hepatitis E virus was not detected in feces and milk of cows in Hebei province of China: no evidence for HEV prevalence in cows. *Int J Food Microbiol*. 2018;291:5–9.
59. Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, He Z, Yang C, Bi Y, Cao W, et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*. 2016;64(2):350–9.
60. Geng Y, Zhao C, Huang W, Wang X, Xu Y, Wu D, Du Y, Liu H, Wang Y. Hepatitis E virus was not detected in feces and milk of cows in Hebei province of China: no evidence for HEV prevalence in cows. *Int J Food Microbiol*. 2019;291:5–9.
61. Vercouter AS, Sayed IM, Lipkens Z, De Bleeker K, De Vlieghe S, Colman R, Koppelman M, Supre K, Meuleman P. Absence of zoonotic hepatitis E virus infection in Flemish dairy cows. *Int J Food Microbiol*. 2018;281:54–9.
62. Tritz SE, Khounvisith V, Pommachichan S, Ninnasopha K, Keosengthong A, Phoutana V, Camoin M, Hubschen JM, Black AP, Muller CP, et al. Evidence of increased hepatitis E virus exposure in Lao villagers with contact to ruminants. *Zoonoses Public Health*. 2018;65(6):690–701.
63. Cornellie L, Banda DH, Meuleman P. Animal Models for Hepatitis E virus. *Viruses*. 2019;11(6):564.
64. Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, et al. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005;11(12):1958–60.
65. Johne R, Plenge-Bonig A, Hess M, Ulrich RG, 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(Pt 3):750–8.
66. Ivanova A, Tefanova V, Reshetnjak I, Kuznetsova T, Geller J, Lundkvist A, Janson M, Neare K, Velstrom K, Jokelainen P, et al. Hepatitis E virus in domestic pigs, wild boars, pig farm workers, and hunters in Estonia. *Food Environ Virol*. 2015;7(4):403–12.
67. McElroy A, Hiraide R, Bexfield N, Jalal H, Brownlie J, Goodfellow J, Caddy SL. Detection of hepatitis E virus antibodies in dogs in the United Kingdom. *PLoS One*. 2015;10(6):e0128703.
68. Caballero-Gomez J, Rivero-Juarez A, Cano-Terriza D, Risdale MA, Lopez-Lopez P, Frias M, Jimenez-Ruiz S, Rivero A, Garcia-Bocanegra I. Survey for hepatitis E virus infection in non-human primates in zoos in Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2019;66(4):1771–5.
69. Marczuk AK, Cwiek K, Wieliczko A. Avian hepatitis E virus is widespread among chickens in Poland and belongs to genotype 2. *Arch Virol*. 2019;164(2):595–9.
70. Kuniholm MH, Nelson KE. Of organ meats and hepatitis E virus: one part of a larger puzzle is solved. *J Infect Dis*. 2008;198(12):1727–8.
71. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res*. 2010;41(6):46.
72. Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect*. 2010;138(2):145–66.
73. Pavio N, Doceul V, Bagdassarian E, John R. Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Vet Res*. 2017;48(1):78.
74. Huang X, Huang Y, Wagner AL, Chen X, Lu Y. Hepatitis E virus infection in swine workers: a meta-analysis. *Zoonoses Public Health*. 2019;66(1):155–63.
75. Syed SF, Zhao Q, Umar M, Alagawany M, Ujjan IA, Soomro F, Bangulzai N, Baloch AH, Abd El-Hack M, Zhou EM, et al. Past, present and future of hepatitis E virus infection: zoonotic perspectives. *Microb Pathog*. 2018;119:103–8.

Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions

