

Université de Montréal

Caractérisation du risque associé au virus de l'hépatite E chez le porc

Par

GENEVIÈVE SIMARD

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire

en vue de l'obtention du grade de

maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Décembre 2008

© Geneviève Simard, 2008

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

**Caractérisation du risque associé au virus de
l'hépatite E chez le porc**

présenté par

GENEVIÈVE SIMARD

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Amer Silim, président-rapporteur
Carole Simard, directrice de recherche
Sylvain Quessy, codirecteur
Yvan L'Homme, membre du jury

SOMMAIRE

Dans cette étude, la bile d'un porc canadien naturellement infecté par une souche du virus de l'hépatite E (VHE) a été utilisée afin d'inoculer deux groupes de porcelets. Dans l'étude précoce (E), 4 porcelets âgés de 4 semaines et exempts de pathogènes spécifiques (SPF), ont été suivis jusqu'à 14 jours post-inoculation (pi). Dans l'étude tardive (L), 9 porcelets ont été suivis à chaque semaine jusqu'à l'abattage, soit 120 jours pi. À la nécropsie, la présence du VHE a été évaluée dans différents organes à 7, 14 et 120 jours pi. Des porcelets témoins (E=2 et L=3) ont été inoculés par de la bile exempte de VHE. Le virus a persisté chez certains animaux jusqu'à 84 à 105 jours pi dans le sérum malgré la présence d'anticorps IgG anti-VHE dans le sang, suggérant une virémie prolongée. L'excrétion virale dans les fèces s'est étalée également sur une période de 105 jours pi chez certains animaux. De plus, la détection de l'ARN viral dans les organes évalués s'est révélée presque nulle à l'âge d'abattage à l'exception de quelques vésicules biliaires, alors qu'on retrouvait l'ARN viral dans plusieurs organes à 7 et 14 jours pi.

Pour évaluer la distribution du VHE chez les porcs commerciaux du Québec, un échantillonnage de porcs de trois abattoirs a été réalisé. Environ 100 échantillons de sang, fèces, foies et bile provenant des mêmes animaux en processus d'abattage ont été prélevés dans chacun des abattoirs, sur des porcs destinés à la consommation humaine. La détection de l'ARN viral et des anticorps du VHE a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR nichée et d'un test ELISA adapté pour détecter les anticorps porcins anti-VHE. Chez les porcs d'abattoir, 12,9 % des échantillons de bile contenaient de l'ARN viral du VHE, alors que la détection virale était moindre dans les autres organes. Une séroprévalence en IgG de 26,0 % a été obtenue pour les sérums porcins analysés. Une analyse phylogénétique des différentes souches isolées pendant l'étude a démontré qu'elles sont du génotype 3. Ces données indiquent une exposition potentielle des travailleurs de l'industrie porcine au VHE porcine, notamment par les fèces, le sang et les organes et également pour les consommateurs par le biais des foies.

Mots-clés : virus de l'hépatite E (VHE), infection expérimentale, porcs, séroprévalence, analyse phylogénétique

SUMMARY

In this study, a strain of porcine hepatitis E virus (HEV) isolated from the bile of a naturally-infected Canadian pig was used to inoculate two groups of piglets. In the early-phase experiment (E), 4 one month-old piglets, specific pathogen free (SPF), were monitored for 14 days. In the late-phase experiment (L) 9 piglets were monitored up to slaughter (120 days post-inoculation (pi)). Controls piglets (E=2 and L=3) were inoculated with free HEV bile. The presence of HEV was monitored routinely in their blood and feces. At necropsy, viral occurrence was evaluated in organs at 7, 14 and 120 days pi. Interestingly, HEV was found to persist in the serum of some animals up to 84-105 days pi, despite the presence of IgG HEV antibodies in their blood. Fecal shedding was detected until 105 days pi for a portion of pigs. In organs, HEV RNA was detected in low amount of gallbladders at killing time, while it was detected in a large number of organs at 7 and 14 days pi.

To assess the distribution of HEV in commercial finishing pig in Quebec, a sampling was realised in pigs from three slaughterhouses from Quebec. Approximately a hundred samples of feces, blood, bile and liver were collected in each slaughterhouse, on pigs intended for human consumption. A sample of each type was collected on each of the chosen pigs. Detection of HEV RNA was carried out using a nested RT-PCR on each sample and a human ELISA test was adapted for the detection of swine antibodies against HEV in swine serum samples. For pigs at slaughter, 12,9 % of the bile samples were positive to HEV RNA and a seroprevalence of IgG of 26,0 % was detected in swine. A phylogenetic analysis demonstrated that all strains of the study were in the genotype 3. All results demonstrate that porcine industry workers are potentially exposed to swine HEV by feces, blood and organs.

Keywords: hepatitis E virus (HEV), experimental infection, swine, seroprevalence, phylogenetic analysis

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	III
SUMMARY	IV
TABLE DES MATIÈRES.....	V
LISTE DES TABLEAUX.....	VIII
LISTE DES FIGURES	IX
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	X
REMERCIEMENTS.....	XIII
1. INTRODUCTION.....	1
2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE.....	3
2.1 DESCRIPTION DU VIRUS	3
<i>2.1.1 Organisation génomique.....</i>	<i>3</i>
<i>2.1.2 Protéines produites</i>	<i>3</i>
<i>2.1.3 Classification.....</i>	<i>6</i>
<i>2.1.4 Réplication et expression génomique.....</i>	<i>8</i>
2.2 ÉPIDÉMIOLOGIE.....	10
<i>2.2.1 Modes de transmission et réservoirs</i>	<i>10</i>
<i>2.2.2 Séroprévalence.....</i>	<i>12</i>
2.2.2.1 Au Canada.....	13
<i>2.2.3 Étude phylogénétique.....</i>	<i>14</i>
2.2.3.1 Au Canada.....	14
2.3 PATHOGENÈSE.....	15
<i>2.3.1 Chez l'homme.....</i>	<i>16</i>
2.3.1.1 Symptômes.....	16
2.3.1.2 VHE et la grossesse.....	17
2.3.1.3 Organes cibles.....	17
<i>2.3.2 Chez le porc.....</i>	<i>19</i>

2.3.2.1 Symptômes.....	19
2.3.2.2 VHE et la reproduction	20
2.3.2.3 Organes cibles.....	20
2.4 MÉTHODES DE DÉTECTION	21
2.4.1 Méthodes moléculaires.....	22
2.4.1.1 RT-PCR nichée	22
2.4.1.2 Hybridation <i>in situ</i>	24
2.4.1.3 PCR quantitatif.....	24
2.4.2 Méthodes immunologiques.....	25
2.4.2.1 ELISA	25
2.4.2.2 Immunohistochimie	26
2.4.3 Méthodes de culture <i>in vitro</i>	27
2.4.3.1 Culture de cellules.....	27
3. PREMIER ARTICLE	30
EXPERIMENTAL INFECTION OF SWINE WITH A CANADIAN ISOLATE OF HEPATITIS E VIRUS (HEV)	30
4. DEUXIÈME ARTICLE	49
DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS (HEV) IN CANADIAN COMMERCIAL SLAUGHTERED PIGS	49
5. DISCUSSION GÉNÉRALE.....	67
5.1 ÉTUDE DE LA CINÉTIQUE DE L'INFECTION VIRALE DU VHE CHEZ DES PORCS INOCULÉS EXPÉRIMENTALEMENT	67
5.1.1 Cinétique des anticorps anti-VHE dans le sérum.....	68
5.1.2 Présence ou absence du VHE dans les organes.....	69
5.1.3 Persistance du virus dans les fèces et le sérum.....	70
5.2 ÉTUDE DE LA DISTRIBUTION DU VHE DANS LA PRODUCTION PORCINE AU QUÉBEC.....	71
5.2.1 Détermination de la séroprévalence chez les porcs d'abattoir	72
5.2.2 Répartition du virus chez les porcs, lors de la mise en marché	73
5.3 ÉTUDE DE LA CARACTÉRISATION DES SOUCHES DE VHE MISES EN ÉVIDENCE PENDANT L'ÉTUDE	75
5.3.1 Évaluation de la diversité génétique du VHE au Québec.....	76

5.4 CARACTÉRISATION DU RISQUE ASSOCIÉ AU VIRUS DE L'HÉPATITE E CHEZ LE
PORC..... 77

6. CONCLUSION 78

BIBLIOGRAPHIE81

LISTE DES TABLEAUX

TABLE I. DEGENERATE HEV PRIMERS SEQUENCES USED FOR NESTED RT-PCR IN THE DETECTION OF THE ORF2, IN PIGS.	45
TABLE II. DETECTION OF HEV RNA IN PIGS INOCULATED WITH SWINE HEV STRAIN.....	48
TABLE III. DETECTION OF IGG ANTI-HEV ANTIBODIES IN THE SERUM OF SLAUGHTERED PIGS, USING A SWINE-ELISA	63
TABLE IV. MEAN S/PC RATIO WITH CORRESPONDING STANDARD DEVIATION (SD) OF HEV IGG SERONEGATIVE AND HEV IGG SEROPOSITIVE PIGS, AS DETECTED BY THE SWINE-ELISA .	63
TABLE V. DETERMINATION OF THE HEV IGG ANTIBODY STATUS OF DISTINCT LOTS OF PIGS GROUPED ACCORDING TO THEIR EAR-TAG NUMBERS.....	64
TABLE VI. DETECTION OF VIRAL HEV RNA IN THE SERUM OF SLAUGHTERED PIGS, USING RT-NPCR.....	64
TABLE VII. DETECTION OF VIRAL HEV RNA IN THE LIVER AND THE CORRESPONDING BILE OF SLAUGHTERED PIGS, USING RT-NPCR	64
TABLE VIII. DETECTION OF VIRAL HEV RNA IN THE FECAL CONTENT OF SLAUGHTERED PIGS, USING RT-NPCR.....	65
TABLE IX. NUMBER OF HEV MARKERS PER SLAUGHTERED PIGS	65

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 : ORGANISATION GÉNOMIQUE DU VHE.....	6
FIGURE 2 : SCHÉMA DU MODÈLE RÉPLICATIF DU VIRUS DU VHE (30).	9
FIGURE 3 : GRAPHIQUE DE LA CINÉTIQUE D'INFECTION DU VHE CHEZ L'HOMME (1).....	18
FIGURE 4. HEV IGG SPECIFIC ANTIBODY RESPONSES FROM 0 TO 120 DPI IN THE SERUM OF EXPERIMENTALLY-INOCULATED PIGLETS OF THE L TRIAL, USING THE ADAPTED SWINE ANTI-IGG ELISA.	46
FIGURE 5. DISTRIBUTION OF VIRAL HEV RNA IN THE FECES AND SERUM OF THE EXPERIMENTALLY-INFECTED SWINE OF THE L TRIAL, FROM 0 TO 120 DPI.....	47
FIGURE 6. PHYLOGENETIC TREE CREATED BY THE BOOTSTRAP NEIGHBOR-JOINING METHOD BASED ON THE NUCLEOTIDE SEQUENCES REPRESENTING A PORTION OF THE ORF2 GENE. ORIGINS OF STRAINS OF HEV ARE INDICATED, AND THEIR GENBANK ACCESSION NUMBERS ARE PRESENTED. THE BAR REPRESENTS 5% SEQUENCE DIVERGENCE. STRAINS FROM THIS STUDY HAD A CIRCLE BEFORE THEIR NAME.	66

LISTE DES ABRÉVIATIONS

aa:	Acide aminé
Ab, Abs:	Anticorps (antibody), antibodies
ACIA/CFIA:	Agence canadienne d'inspection des aliments
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	ADN complémentaire
ALT:	Alanine aminotransférase
ARN:	Acide ribonucléique
DO:	Densité optique
DPI:	Days post-inoculation
E:	Early (précoce)
ECP:	Effets cytopathiques
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
GDD:	Tripeptide glycine-aspartate-aspartate
gpORF:	Forme glycosylée de pORF
GST:	Glutathione-S-transférase
Hel:	Hélicase
HEV:	Hepatitis E virus
IgA:	Immunoglobuline de type A
IgG:	Immunoglobuline de type G
IgM:	Immunoglobuline de type M
IV:	Intraveineux
jpi:	Jour post-inoculation
kb:	Kilo base
kDa:	Kilo Dalton
KT:	Killing time
L:	Late (tardive)
m7G:	Guanidine 7-méthyle
MAPK:	Protéine kinase active par un mitogène

min:	Minute
MeT:	Méthyltransférase
NC:	Negative control
OD:	Optical density
OPD:	O-phenylenediamine
ORF:	Open reading frame
pb:	Paire de base
PC:	Positive control
PCR:	Polymerase chain reaction
pi:	Post-inoculation
PLC/PRF/5:	Lignée cellulaire d'un hépatocarcinome humain
pORF:	Protéine codée par l'ORF
Pr:	Protéase <i>papain-like</i>
Q-PCR:	PCR en temps réel
RdRp:	ARN polymérase ARN dépendante
RT-PCR:	Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-nPCR:	Nested reverse transcription polymerase chain reaction
S:	Sample
SD:	Standard deviation
Ser80:	Sérine à la position 80
SH3:	Domaine src-homologue 3
slh:	Slaughterhouse
SPF:	Specific pathogen free (exempts de pathogènes spécifiques)
SRRP:	Syndrome reproducteur et respiratoire porcin
UTR:	Untranslated regions
VHE:	Virus de l'hépatite E

*À tous ceux qui y ont cru
jusqu'au dernier moment ...*

REMERCIEMENTS

Plusieurs personnes ont permis la réalisation de ce projet de maîtrise et l'élaboration de ce mémoire et je tiens à les remercier sincèrement de leur appui. Ces 4 années d'études n'ont pas toujours été faciles, mais votre présence et vos bons mots furent très appréciés.

Merci à ma directrice, Dre Carole Simard, et à mon co-directeur, Dr Sylvain Quessy, pour leur confiance, leur patience et leurs conseils.

Merci à Peter Müller d'avoir répondu à toutes mes questions si patiemment. Tes connaissances, ta grande expérience et ton aide ont été souvent d'un grand secours pour moi. Merci également à Louise Lessard pour ses encouragements et sa présence. Merci à Ann Letellier pour ses contacts avec l'industrie porcine. Grâce à toi, les échantillonnages à l'abattoir ont pu être possibles!

Merci à mon chéri, Luc, pour ses encouragements, ses bons petits plats et son aide pour la correction du français. Ton support moral a été apprécié pendant ma rédaction.

Merci à mes parents et à ma sœur pour leurs encouragements (et Émile pour ses gazouillements). Même si vous êtes loin, votre support à distance fut très important pour moi.

Merci également aux étudiants stagiaires, Charles-Alain, Julien, Guillaume et Cindy, pour leur aide à la réalisation de certaines analyses. Vous avez été d'une aide précieuse à tout le projet.

1. INTRODUCTION

Le virus de l'hépatite E (VHE) est associé à plusieurs épidémies et cas sporadiques d'hépatites virales chez l'humain des régions tropicales et subtropicales (l'Asie, le Moyen-Orient, des zones de l'Afrique et le Mexique) (1). Le plus souvent, les manifestations cliniques comme la jaunisse, les avortements et la mortalité associés à ce virus résultent d'une contamination orofécale à partir d'eau contaminée. Des cas récents d'hépatites associés au VHE chez l'homme ont été rapportés dans différents pays industrialisés, notamment au Japon, impliquant de la viande et des foies d'animaux contaminés (sangliers, porcs, cerfs), insuffisamment cuits (46,50,69,83). Aux États-Unis, deux patients atteints d'une hépatite de type E ont contribué à identifier deux souches humaines de VHE partageant 97% d'identité au niveau des acides aminés, des cadres de lecture ouvert (open reading frame, ORF) 1 et 2, avec une souche porcine de VHE (57). Depuis, le VHE porcine a été reconnu comme un virus à caractère potentiellement zoonotique (3,5,17).

Le VHE porcine est en émergence dans les pays industrialisés. Au Canada, les études sont limitées sur le sujet, mais on a évalué une séroprévalence aussi élevée que 59,4 % dans la population porcine, avec des taux plus ou moins élevés selon les provinces (84). Également, des souches virales canadiennes ont été caractérisées (63,84). Il est important de caractériser le risque associé à la présence du virus de l'hépatite E chez les porcs canadiens, car les porcs semblent être une source significative d'exposition au VHE pour les travailleurs canadiens de l'industrie porcine, ce que cette étude tentera de déterminer.

Cette étude a comme premier objectif d'étudier la cinétique de l'infection virale du VHE porcine chez des porcs inoculés expérimentalement avec une souche canadienne provenant du terrain. Cet objectif sera atteint en déterminant le

développement et la persistance des anticorps anti-VHE dans le sérum, la présence ou absence du virus des organes cibles et la bile, l'excrétion du virus par les matières fécales et la virémie dans le sérum. Ensuite, le second objectif est d'évaluer la répartition du virus dans différents abattoirs de la province de Québec, lors de la mise en marché des porcs pour avoir une vue d'ensemble de l'étendue du virus dans la province. Finalement, le troisième objectif est de caractériser à un niveau moléculaire les différentes souches de VHE mises en évidence pendant l'étude, en contribuant à l'évaluation de la circulation du virus de l'hépatite E au Québec.

2. RECENSION DE LA LITTÉRATURE

2.1 Description du virus

2.1.1 Organisation génomique

Le VHE est un virus sans enveloppe, sphérique, de 32-34 nm de diamètre et qui possède une molécule d'ARN monocaténaire à polarité positive. Le génome du virus a une longueur de 7.2kb, possède une queue polyadénylée en 3' et une coiffe guanidine 7-méthyle (m7G) en 5' (33,62). La coiffe a pu être mise à jour par une méthode directe à l'aide d'anticorps anti-coiffe et par une méthode indirecte, une réaction d'élongation pyrophosphatase-dépendante (33,90). La partie codante du génome du VHE est divisée en trois cadres de lecture ouverts (ORF1, 2 et 3) qui se chevauchent. Le chevauchement des ORF est différent pour les génotypes 1 à 3 que pour le génotype 4. L'ORF1 est d'une longueur de 5kb et code pour une polyprotéine virale non structurale, ORF2 mesure environ 2kb et code pour la protéine de capsid et ORF3, région d'environ 350pb (62), code pour une petite protéine de fonction encore indéfinie (30). L'ARN viral contient également 2 petites régions en 5' et 3' non traduites (UTRs, untranslated regions) de 28 et 68 nucléotides, respectivement (62) (voir figure 1). Le VHE est résistant au changement de pH entre moyennement alcalin et acide, puisqu'il peut supporter le pH de l'appareil gastro-intestinal (l'estomac a un pH au environ de 2 et l'intestin grêle au environ de 6) et causer des infections (86). Cependant, il ne semble pas tolérer des expositions à de fortes concentrations de sel, comme par exemple le chlorure de césium (62).

2.1.2 Protéines produites

Le génome du virus de l'hépatite E code pour trois protéines : pORF1, pORF2 et pORF3. La protéine du gène ORF1, la plus grosse protéine ORF (1693aa), a des activités non structurales. Elle est située à l'extrémité 5' du génome. Le

clonage de certaines portions du gène de la protéine a permis d'affirmer que celle-ci a une fonction enzymatique. Cette protéine code pour des motifs géniques non-structuraux comme par exemple les fonctions hélicase (Hel), méthyltransférase (MeT), protéase *papain-like* (Pr) et ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (voir figure 1). Jusqu'à maintenant, la fonction hélicase n'a pas été démontrée expérimentalement, mais elle contient les 7 segments conservés, typiques de la Superfamille Hélicase I (62). La protéase est possiblement impliquée dans le processus co ou post-traductionnel pour la transformation de la polyprotéine virale en produit génique non-structural. La présence de la coiffe m7G confirme le rôle fonctionnel de la méthyltransférase virale. L'activité *RdRp* a été exprimée dans *E. coli* en une protéine de 59kDa. De plus, des essais avec la technique de retardement sur gel ont démontré que l'ARN polymérase se lie à l'extrémité 3' de l'ARN génomique du VHE et que la queue poly-A est nécessaire à l'attachement. Un motif conservé chez tous les virus à ARN à polarité positive, qui se retrouve dans plusieurs ARN polymérase ARN dépendant, est également retrouvé chez VHE, celui du tripeptide glycine-aspartate-aspartate (GDD). Également, des épitopes hautement immuno-réactifs ont été retrouvés dans la région RdRp du polypeptide ORF1 (62).

La protéine codée par le gène ORF2, la protéine de capsid virale de 660 acides aminés (2,30) est située à l'extrémité 3' du génome. L'analyse de la séquence des acides aminés de pORF2 a révélé la présence d'un large segment hydrophobe à l'extrémité N-terminal suivi d'une région riche en résidus basiques. Ce domaine hydrophobe est impliqué dans la maturation du virion en association avec le réticulum endoplasmique lors de la traduction de pORF2 (62). Une fois dans le réticulum endoplasmique, la protéine est glycosylée (gpORF2) par l'addition de résidus de mannose sur trois sites de glycosylation qui sont tous des asparagines, aux positions 137, 310 et 562 de la chaîne d'acides aminés. Asn310 semblerait être le site le plus glycosylé, selon les études de Zafrullah (87). Dans les cellules animales, on retrouve une protéine ORF2 d'environ 74kDa et une autre d'environ 88kDa qui serait la forme

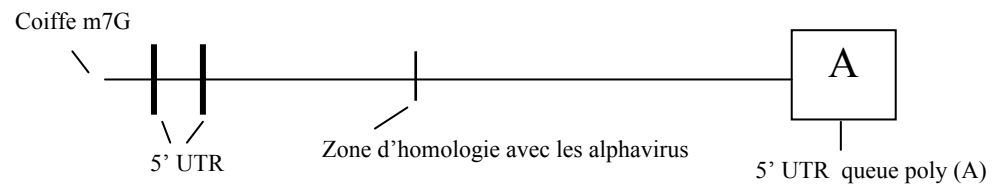
glycosylée de pORF2 (gpORF). La protéine ORF2 peut également être présente à la surface cellulaire; pour que son expression ait lieu, le passage dans le réticulum endoplasmique est nécessaire, mais pas la glycosylation. Dans l'assemblage de la capsid, pORF2 prend part à l'assemblage, tandis que le rôle de gpORF2 n'est pas défini. pORF2 a été étudié à l'aide de différents systèmes d'expression, comme par exemple dans *Escherichia coli*, dans des cellules d'insectes utilisant un vecteur du baculovirus et dans des cellules animales utilisant des plasmides d'expression.

Le gène ORF3 code pour une petite protéine de 123 acides aminés (30). Ce gène chevauche l'ORF1 d'un seul nucléotide et partage la majorité du reste de la séquence avec l'ORF2 (62). Cette protéine est la plus variable entre les souches de VHE. Sa fonction est encore inconnue, mais elle a tout de même été étudiée dans différents systèmes d'expression. Dans les cellules animales, pORF3 est exprimée comme une phosphoprotéine modifiée sur un résidu sérine en position 80 (Ser80) par la protéine kinase cellulaire activée par un mitogène (MAPK) (2,88). Par fractionnement, pORF3 semble s'associer au cytosquelette en utilisant un de ses domaines hydrophobiques en N-terminal, contenant une suite de cystéine. Cette association suggère la possibilité que pORF3 pourrait servir d'ancrage pour pORF2 dans l'assemblage de la nucléocapside virale (62). D'autres études suggèrent que la phosphorylation de pORF3 par MAPK serait aussi reliée à la transduction de signal. Donc, la liaison du cytosquelette en N-terminal et de domaines SH3 en C-terminal, nous amène à penser que pORF3 serait une protéine adaptatrice. Ces protéines sont bien connues pour jouer des rôles critiques dans la transduction intracellulaire de signaux extracellulaires. La partie C-terminal est quant à elle riche en proline et deux séquences homologues à l'hélice polyproline présentent dans les protéines liant le domaine src-homologue 3 (SH3), dont les tyrosines kinases et certaines protéines du cytosquelette. Une étude préliminaire a démontré que pORF3 purifiée se lie à la glutathionne-S-transférase (GST), une protéine de fusion qui contient plusieurs domaines SH3 différents. Les domaines SH3 sont retrouvés

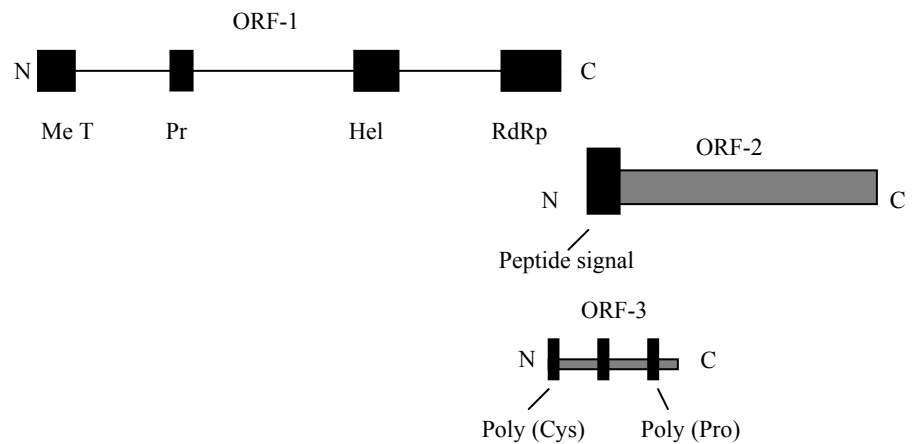
dans les protéines impliquées dans les signaux de transduction, donc pORF3 pourrait être reliée à cette fonction.

Figure 1 : Organisation génomique du VHE.

A) Génome du HEV



B) Gène ORF-1 à 3



Légende : A (poly A), C (carboxy terminal), Cys (cystéine), Hel (hélicase), m7G (guanidine 7-méthyle), Me T (méthyltransférase), N (amino terminal), Pr (protéase *papain-like*), Pro (proline), RdRp (ARN polymérase ARN dépendante), UTR (région non-traduite). Adapté du schéma de Expert Reviews in Molecular Medicine, 1999 Cambridge University Press (30)

2.1.3 Classification

Au point de vue de l'organisation de son génome, de son coefficient de sédimentation dans le sucrose et de sa densité « buoyant », le VHE partage des ressemblances avec les virus de la classe des *Caliciviridae*. Suite à des comparaisons de séquences du VHE de 2 régions plus conservées (l'hélicase et

l'ARN polymérase ARN dépendant) avec d'autre virus à ARN positif, le VHE serait plus rapproché de la famille des *Togaviridae* (15,62). Dernièrement, à la suite d'analyses phylogénétiques des gènes non-structuraux, le VHE a été classé comme l'unique membre d'une nouvelle famille, les *Hepeviridae*, dans le genre *Hepevirus* (34,53). Cependant, lorsque des séquences de l'ORF1 sont analysées, le VHE partage des similitudes avec la grande famille des alphavirus, à ARN positif (62).

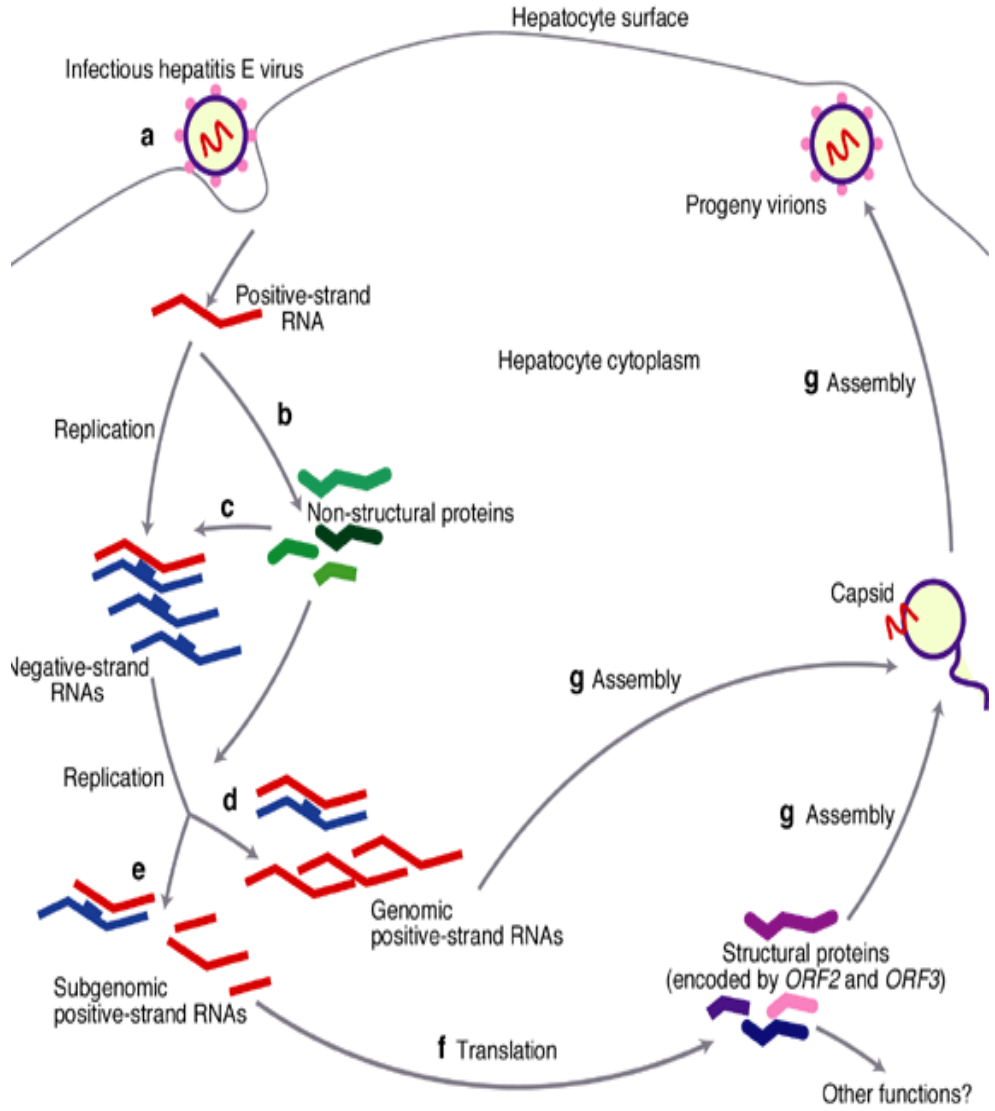
Quatre génotypes majeurs de VHE ont été identifiés chez les mammifères suite à une analyse de toutes les séquences récupérées de *Genbank* et ceux-ci ont été subdivisés en sous-types (48). C'est la séquence de l'extrémité 5' de l'ORF2 qui a été utilisée dans l'étude phylogénétique, due à sa grande conservation d'une souche à l'autre. Le génotype est défini comme un groupe de virus présentant une divergence de nucléotides de moins de 20% dans la région de l'ORF2. Le génotype 1, retrouvé dans les régions tropicales et subtropicales de l'Asie et de l'Afrique, est subdivisé en 5 sous-types, car les séquences génomiques sont plus conservées. Le génotype 2 a été isolé au Mexique, au Nigeria et au Chad, et est réparti en seulement 2 sous-types. Le génotype 3 est retrouvé un peu partout dans le monde : Asie, Europe, Océanie et Amérique du Nord et du Sud. Ce génotype contient les séquences les plus diversifiées et elles sont regroupées en 10 sous-types. Le génotype 4 est quant à lui isolé seulement en Asie et est réparti en 7 sous-types. Les génotypes 3 et 4 sont retrouvés chez les humains et certaines espèces animales, comme les porcs, mais aussi chez des espèces sauvages, comme les cerfs et les sangliers (48). La grande variété de sources possibles de VHE pour les génotypes 3 et 4 compte pour beaucoup dans la diversité de ces sous-types. Des séquences humaines et animales caractérisées au niveau de l'ORF2 ont démontré un haut niveau de conservation (98,5 à 100%), laissant supposer une source infectieuse unique (46,83). En 2001, un cinquième génotype de VHE a été trouvé chez des poulets (aviaire). Les séquences nucléotidiques sont homologues à celles des mammifères à

environ 60% (28). Bien qu'une grande diversité soit observée dans les séquences de VHE, un seul sérotype est reconnu (48).

2.1.4 Réplication et expression génomique

La réplication du virus de l'hépatite E n'est pas encore confirmée, mais un schéma a été réalisé basé sur les similitudes et les homologies de séquences remarquées en comparaison avec les autres virus déjà caractérisés de types ARN positif (voir figure 2) (30,62). L'attachement du virus aux cellules permissives se fait par un récepteur non caractérisé à la surface des hépatocytes. Ensuite, le virus est internalisé dans le cytoplasme par un mécanisme inconnu. 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. Une homologie de séquence avec les alphavirus laisse croire que la séquence jonction présente sur l'ARN négatif du VHE agirait de la même manière que celle des alphavirus. 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. L'ARN subgénomique est traduit en protéines structurales à partir du gène ORF2 et possiblement du gène ORF3. Celles-ci s'assemblent pour former la capsid 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 (62).

Figure 2 : Schéma du modèle réplcatif du virus du VHE (30).



2.2 Épidémiologie

Les manifestations du virus de l'hépatite E chez l'humain se traduisent par des épidémies et des cas sporadiques de la maladie. Plusieurs pays en voie de développement sont affectés par le VHE, notamment à cause des faibles conditions sanitaires (15,40,62). La principale source de transmission du virus est l'eau contaminée par les matières fécales, mais d'autres voies de passage pourraient être en cause.

2.2.1 Modes de transmission et réservoirs

La contamination des humains par le VHE se fait principalement par voie orofécale. En Inde, plusieurs épidémies de VHE ont été associées à des contaminations d'eau par des matières fécales (62). Les périodes les plus à risque pour les pays endémique en regard de ce genre de contaminations sont la saison hivernale où les niveaux d'eau descendent et concentrent les contaminants ou encore pendant la saison printanière où les inondations augmentent les chances de contamination de l'eau par les matières fécales (62).

Dans certains pays industrialisés, la transmission du VHE par de la viande ou du foie contaminé, insuffisamment cuits est en cause, notamment au Japon (46,50,60,69,83). L'association avec la nourriture ingérée a été démontrée par le séquençage des isolats viraux détectés dans les échantillons, avec des taux aussi élevés que 99% d'identité entre le génome entier des souches (60). Les génotypes 3 et 4 sont associés à ces cas. Également au Japon, des cas de transmission de VHE par transfusion sanguine ont été rapportés et le risque associé aux transfusions sanguines est pris en compte par la Croix Rouge japonaise qui évalue le niveau d'enzyme alanine aminotransférase (ALT) dans le sang des donneurs (51,52). L'ALT est une enzyme spécifique principalement au foie et sert de marqueur sensible d'une nécrose hépatique. L'activité de cette enzyme dans le sérum, provenant de la lyse des hépatocytes, augmente avant

même l'apparition des premiers symptômes cliniques. Même si l'augmentation de cette enzyme n'est pas spécifique au cas de VHE, c'est un excellent indicateur d'un problème hépatique (13).

La transmission du virus par contact de personne à personne semble être de faible importance (62,68). Seulement 1 à 2% des cas se produisent dans une famille où la maladie est présente de manière aiguë chez un de ses membres (62). La transmission verticale de la mère à l'enfant est cependant rapportée chez 33,3% des femmes enceintes, pendant le troisième trimestre de leur grossesse, lors d'une étude en Inde (1,41,57) Dans cette étude, le tiers des enfants naissants de mères positives le sont également. Différents symptômes sont observés chez les nouveaux-nés: ictère, nécrose hépatique et hépatite sans ictère (1,41,57).

Chez les porcs, l'étude de Kasorndorkbua et collaborateurs a évalué les modes de transmission possible du VHE entre les individus (34). Plusieurs trios de porcs ont été suivis pendant une cinquantaine de jours. Un premier groupe de porcs a été inoculé par voie intraveineuse et a servi d'inoculum pour les porcs naïfs, 3 jours consécutifs (9, 10 et 11 jours pi). Les premières voies de transmission évaluées ont été les amygdales et les sécrétions nasales. Un écouvillonnage des amygdales et des voies nasales a été fait sur les porcs positifs et a servi à inoculer les porcs sains en frottant les mêmes zones. Un autre groupe a été inoculé avec une seringue qui avait servi précédemment à injecter un vaccin aux porcs positifs, pour évaluer la transmission par les aiguilles souillées. Les porcs inoculés de ces 3 premières façons n'ont développé aucun anticorps contre le VHE et aucun ARN viral n'a été détecté dans leur sérum ou leurs fèces. Ensuite, un autre groupe a permis d'évaluer la transmission orofécale, en gavant les porcs de matières fécales fraîches, où l'ARN viral a été détecté. Dans ce groupe, un porc a développé des anticorps anti-VHE et un autre a été trouvé positif pour l'ARN de VHE dans les fèces. Finalement, un trio a servi à évaluer l'exposition par contact direct aux porcs

contaminés. Deux individus ont développé des anticorps contre le VHE, trois ont excrété de l'ARN dans les matières fécales et un autre dans le sérum. La transmission orofécale a moins bien fonctionné comparativement au groupe ayant eu des contacts directs avec les porcs positifs.

Des anticorps contre le VHE ont été retrouvés chez les vaches (1,42%), les chiens (6,97%), les poulets (20%), les porcs (24,28%) et les rongeurs (50%) au sud-est du Brésil (76). Les rats sont d'ailleurs principalement suspectés à cause de leur présence ubiquitaire dans le monde, autant à la ville qu'à la campagne. Cependant, les études sur la présence du VHE chez les autres espèces animales sont très limitées. La crédibilité de la méthode utilisée dans cet article serait à vérifier.

2.2.2 Séroprévalence

Plusieurs groupes de chercheurs ont étudié la présence d'anticorps contre le VHE chez l'humain, et également chez le porc. Du côté humain, des anticorps anti-VHE ont été détectés chez des donneurs de sang aux États-Unis (1 à 2%) (80), aux Pays-Bas (0,4%) (85), en Italie (0,74% à 1,94%) (89), en Grèce, en Angleterre, en Espagne, en Allemagne, en Suède, en Finlande, au Brésil (2,6 à 3%) (22) et à Taiwan (80). Une étude en Caroline du Nord a démontré que 10,9% des travailleurs de l'industrie porcine avaient développé des anticorps contre le VHE comparativement à 2,4% chez des personnes non exposées aux porcs (81), presque cinq fois plus.

Des anticorps ont été décelés chez des porcs dans certains pays industrialisés comme les États-Unis, le Canada, l'Australie, la Corée et Taiwan (80). Certains pays, où l'infection est endémique, comme le Népal (9), la Chine et la Thaïlande ont également des porcs sérologiquement positifs (62,80).

2.2.2.1 Au Canada

Au Canada, les études chez l'humain portant sur le virus de l'hépatite E sont restreintes. Cependant, chez les porcs, quelques études ont eu lieu et une de celles-ci a permis l'identification d'une souche porcine canadienne (SK3) de VHE (84). Dans cette étude, la prévalence d'anticorps anti-VHE à travers les troupeaux de porcs au Canada est également examinée. À l'aide d'une trousse commerciale de détection des anticorps anti-VHE humains (*Hepatitis E [rDNA] Antigen Abbott HEV EIA kit*) adaptée pour les porcs, la séroprévalence a pu être déterminée. Au total, 998 échantillons de sang ont été récoltés chez des porcs âgés de 6 mois, dans 5 provinces canadiennes, et la prévalence obtenue était de 59,4% en 2001. Pour les provinces du Québec et de l'Ontario, les pourcentages obtenus étaient respectivement de 88,8% et 80,1% et étaient les plus élevés de l'étude (84). Ces régions ont une forte densité de fermes porcines et ces conditions géographiques pourraient avoir contribué à ces hauts taux de prévalence en permettant le déplacement du virus entre les fermes. Dans cette étude, à partir d'un échantillonnage de 165 sérums humains de la province de la Saskatchewan, 2,4% étaient séropositifs pour le VHE par ELISA (84).

Une étude québécoise a évalué la dissémination naturelle du VHE dans une population porcine sur une ferme expérimentale, de l'âge de 2 semaines jusqu'à l'abattage, sur des porcelets provenant de plusieurs sources, de nature inconnue (43). Quatre échantillonnages ont été réalisés à 2, 8 et 18 semaines et à l'abattage (22 à 29 semaines). Un ELISA (similaire à celui utilisé dans cette étude) a été fait sur les plasmas des porcelets, ainsi que la détection de l'ARN du VHE dans les fèces et le plasma à chaque prélèvement. Aucune corrélation n'a pu être établie entre les valeurs de densité optique (DO) et la présence de l'ARN viral dans les fèces et le plasma. Au départ (2 semaines), les DO étaient faibles et la distribution limitée. Au second échantillonnage, les valeurs obtenues n'étaient pas significativement différentes du précédent. À partir du troisième prélèvement, la majorité des porcs avaient obtenu des DO faibles,

mais une augmentation des valeurs a été observée chez certains sujets et la distribution des valeurs était plus grande. À l'abattage, trois groupes distincts étaient perceptibles, en ayant des valeurs de DO faibles, intermédiaires et élevées. Les porcs ont développé des anticorps contre le VHE au cours de l'étude. Aucune valeur seuil n'a été déterminée dans cette étude, donc aucun pourcentage de porcs positifs n'a pu être déterminé.

2.2.3 Étude phylogénétique

Des études phylogénétiques sur le VHE ont été réalisées partout dans le monde. Près de 420 isolats du VHE ont été répertoriés dans *Genbank*. Autant les souches humaines que les souches animales y sont classées. Les séquences proviennent de différentes parties des ORF1 à 3 du génome du VHE et d'autres du génome complet. La région 5' de l'ORF2 sur une longueur de 300 à 450 paires de bases est la région la plus conservée parmi les isolats du VHE. Les séquences déterminées à partir de cette région sont les plus retrouvées entre toutes les séquences du VHE.

2.2.3.1 Au Canada

À notre connaissance, aucun cas clinique du VHE humain n'a été rapporté au Canada. Donc nous n'avons pas d'informations reliées au génotype du VHE humain au Canada. Chez les porcs canadiens cependant, une souche isolée précédemment par Yoo et collaborateurs (SK3) et un nouvel isolat (Arkell) furent caractérisées à partir de la séquence entière du virus (63,84). C'est dans le génotype 3 que ces souches furent classées. La séquence des souches était différente de celles des isolats américains de porcs et japonais par 13 et 14% respectivement, mais les séquences variaient également entre elles; elles différaient de 11,8%, démontrant une grande hétérogénéité génétique (63).

Dans l'étude de Lu et collaborateurs, on analyse la souche Arkell provenant d'un porc du Canada (48). D'après les auteurs, comme cette souche a été séquencée à l'aide de 30 paires d'amorces et d'un pool de matières fécales, elle ne représente peut-être pas un seul isolat, mais plutôt un mélange de plusieurs isolats.

Au Québec, une étude a été réalisée dans 70 fermes ayant des porcs en engraissement, dans 4 régions différentes de la province (78). Une RT-PCR nichée (similaire à celle utilisée dans cette étude) a été effectuée sur les matières fécales récoltées directement sur le plancher des fermes, pour la détection de l'ARN du VHE. La caractérisation génétique des souches détectées s'est fait au niveau 5' de l'ORF2 du gène de VHE sur une longueur de 304 pb puisque la majorité des souches déjà caractérisées génétiquement le sont au niveau de cet ORF. Toutes les souches analysées étaient regroupées dans le génotype 3 et étaient plus rapprochées des souches porcines du Japon que de la souche canadienne Arkell (78).

2.3 Pathogenèse

Les cas cliniques d'hépatites causées par le VHE chez l'homme sont rencontrés en général chez les jeunes adultes mais peuvent également se retrouver chez les adultes d'âge mûr (15 à 40 ans). Le virus de l'hépatite E cause des décès chez 1 à 2 % des individus contaminés (30). Plusieurs pays endémiques au VHE sont touchés par ces épidémies (82). Le diagnostic de VHE chez l'humain peut se faire par la détection d'anticorps (IgM ou IgG) anti-VHE ou encore par la détection de l'antigène viral. Les tests moléculaires pourraient permettre également le diagnostic.

2.3.1 Chez l'homme

L'homme des pays en voie de développement est l'hôte principal du VHE. Le virus entraîne l'apparition de plusieurs symptômes chez les patients atteints. Le système immunitaire développe à son contact des anticorps contre celui-ci. Le taux de mortalité est faible pour ce virus (0,5 à 4%). Toutefois, quand on se penche sur le taux de mortalité chez les femmes enceintes (20 à 25%), celui-ci est beaucoup plus important et plus inquiétant (21).

2.3.1.1 Symptômes

Le virus de l'hépatite E cause des hépatites aiguës chez certains individus qui contractent le virus. Le temps d'incubation du virus est approximativement entre 2 et 10 semaines, selon les résultats associés à l'inoculation de volontaires lors d'une étude (30). Les dommages au foie sont la principale conséquence associée au VHE. L'hépatite ictérique aiguë est la forme de la maladie la plus facilement détectable. Un large éventail de symptômes peut être aperçu chez les patients atteints du VHE. Les patients peuvent présenter des symptômes de fièvre, des frissons, des douleurs abdominales, de l'anorexie, des nausées, des vomissements, des matières fécales de couleur argileuse, de l'urine foncée et de la diarrhée (15,21). Une jaunisse est également possible chez les patients. La sévérité des symptômes varie selon le niveau de l'infection, soit de sous clinique à fulminante. Au point de vue histologique, certains changements peuvent survenir comme par exemple des nécroses focales, de l'inflammation légère et des modifications au niveau des hépatocytes (15). Aucune évidence d'hépatite chronique ou de cirrhose n'a été révélée suite à une hépatite E aiguë (1). Dans les cas où le VHE se développe de manière bénigne, l'infection est asymptomatique et passe inaperçue (62).

Lorsque le virus a pénétré dans l'hôte, le système immunitaire humoral s'active et les IgM peuvent être détectés à l'aide d'un test ELISA. Ceux-ci seront

déTECTABLES dans le sérum de 4 à 5 mois (40). Les IgG vont se retrouver par la suite dans le sang une fois produits par le système immunitaire et vont persister chez l'homme pendant plusieurs années dans le sérum (30). Les IgA sont une autre classe d'immunoglobulines produites à la suite d'une infection, que l'on retrouve au niveau des muqueuses et des sécrétions. Herremans et collaborateurs ont tenté de développer un test ELISA pour la détection des IgA, cependant le test s'est révélé trop limité pour le sérodiagnostic de cas de VHE, particulièrement pour le génotype 3 (25).

2.3.1.2 VHE et la grossesse

Des infections hépatiques fulminantes chez les femmes enceintes peuvent amener à un taux de mortalité aussi élevé que 20-25%, au troisième trimestre de grossesse. La transmission transplacentaire peut contaminer le fœtus dans 79% des cas, alors qu'elle peut entraîner la mort *in utero* dans 25% des cas (38,39). Des accouchements prématurés sont observés dans 33% des cas (41) et la transmission verticale du VHE de la mère à l'enfant dans 50% des cas (62). Les raisons de ces mortalités ne sont pas claires pour le moment, mais dans 15 à 20% des cas, c'est une défaillance multi-viscérale (hépatique, rénale, respiratoire, cérébrale) qui provoque les décès. Le VHE pourrait favoriser l'éclampsie et augmenter les risques de mortalité (68).

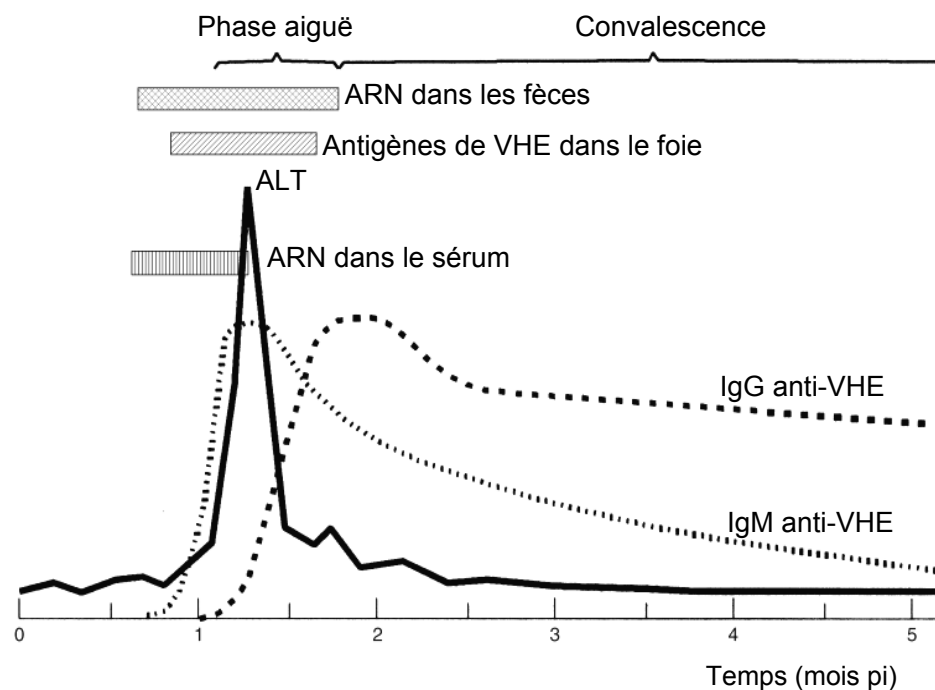
2.3.1.3 Organes cibles

Le virus utilise la voie orale pour pénétrer chez son hôte, puis atteint le foie. Cependant, aucune étude ne permet de démontrer comment le virus procède pour atteindre sa cible, mais est possiblement acheminé au foie par la veine porte (62). Lorsque le foie est atteint, le virus est acheminé vers la vésicule biliaire où on pourra le retrouver concentré dans la bile. Le VHE passe ensuite des canaux biliaires au tractus intestinal. Le virus est finalement excrété dans les matières fécales. Le virus peut être détecté dans les fèces et le sérum environ

1 semaine avant l'apparition des premiers symptômes chez l'homme. L'enzyme alanine aminotransférase peut être détectée dans le sérum à un niveau plus élevé que la normale lorsque le VHE est présent, après la période d'incubation. Au même moment, les symptômes commencent à être visibles et le niveau d'anticorps contre le VHE augmente. En premier lieu, le taux des IgM augmente en pic pendant la phase symptomatique et décline par la suite à un niveau de base. Ensuite, ce sont les IgG qui prennent la relève en augmentant progressivement. Ceux-ci seront présents dans le sang des individus pendant plusieurs années (2-13 ans) (30) (voir figure 3).

Les patients déjà atteints d'une maladie hépatique chronique et qui contractent le VHE peuvent développer une défaillance du foie et ceci peut aller jusqu'à des problèmes rénaux et une encéphalopathie hépatique, c'est-à-dire une maladie du foie associée à des troubles des fonctions neurologiques (21).

Figure 3 : Graphique de la cinétique d'infection du VHE chez l'homme (1).



2.3.2 Chez le porc

Le VHE semble avoir comme réservoir principal le porc. Chez cette espèce, le VHE peut causer des épidémies sous-cliniques dans les troupeaux porcins à travers le monde (62). Des infections expérimentales ont été réalisées de différentes façons pour étudier les différents effets du VHE : les symptômes, le développement des anticorps, l'effet du virus sur la reproduction, les organes cibles, les sites de réplication et les moyens de transmission (6,34,35,37,44,56,80).

2.3.2.1 Symptômes

Les porcs inoculés expérimentalement sont cliniquement normaux. En effet, ils demeurent asymptomatiques lors d'une infection au VHE. Selon les études, la durée de l'excrétion virale dans les matières fécales varie. Dans l'étude de Lee et collaborateurs, les animaux âgés de 3 semaines ont été inoculés par voie intraveineuse avec une suspension de fèces provenant d'un porc infecté expérimentalement avec une souche porcine (44). L'excrétion du VHE a persisté presque 7 semaines et a été détectée à partir de 3 jours pi, pour tous les sujets. Dans une autre infection expérimentale utilisant des porcelets âgés de 4 semaines infectés de manière intraveineuse avec du sérum de porcs infectés, la virémie du VHE a duré environ 1 à 3 semaines chez des porcs inoculés et l'ARN viral a été détecté dans les fèces 2 semaines après l'inoculation et a persisté environ 7 semaines (56). Dans cette étude, on a également mis en évidence la rapide dispersion du virus parmi les porcs d'un même parc. La durée de la virémie a varié également entre les études. Dans une 3^e infection expérimentale sur des porcelets âgés entre 3 et 4 semaines, la virémie décelée par RT-PCR nichée n'a duré qu'environ 1 semaine (80). Ces porcelets avaient été infectés par voie intraveineuse avec une dose infectieuse porcine de $10^{4,5}$ TCID₅₀%.

2.3.2.2 VHE et la reproduction

Les truies ne semblent pas montrer un plus haut taux de mortalité ou de morbidité lorsqu'elles sont gestantes et qu'elles sont trouvées positives au VHE. Les symptômes ne sont pas visibles. Une étude de Kasorndorkbua et collaborateurs a décrit l'infection de cochettes par voie intraveineuse avec le VHE (37). Les fœtus des cochettes inoculées n'ont démontré aucune évidence de transmission de la mère aux fœtus. Aucun signe clinique n'a été observé chez les cochettes, mais des hépatites lymphohistiocytaires multifocales légères ont été détectées par microscopie chez 1/3 des cochettes inoculées. Aucun effet significatif n'a été démontré lors de l'étude du poids des porcelets à la naissance, de la viabilité fœtale et des dimensions fœtales. Des anticorps maternels peuvent être détectés chez des cochonnets nés de mères séropositives suite à l'ingestion du colostrum, mais les porcelets sont demeurés séronégatifs suite à la disparition des anticorps maternels. Dans une autre étude, des porcelets de mères séropositives pour les IgG anti-VHE, sont également séropositifs à 2 semaines d'âge (58). Par la suite, ceux-ci s'atténuent après 8 à 9 semaines et les porcelets développent leur propre immunité (IgM et IgG) contre le VHE. Malgré le haut taux de transmission verticale de la mère à l'enfant chez l'humain, dans le cas des truies, il n'y a aucune évidence semblable (21).

2.3.2.3 Organes cibles

Le virus entre dans l'hôte par la voie orale, principalement via l'eau contaminée. Le VHE est retrouvé au niveau du foie, mais le mécanisme par lequel il atteint cet organe est encore inconnu. Cependant, l'hypothèse que le virus atteigne le foie par la veine porte a été énoncée (62,80). Ensuite, le virus se réplique dans le cytoplasme des hépatocytes. Les virions produits dans les cellules sont éliminés du foie vers la vésicule biliaire par les canaux biliaires, dans la bile et atteignent ensuite le duodénum du petit intestin par les canaux biliaires encore une fois (44,62,80). Plusieurs organes ont été testés positifs

pour l'ARN du VHE de 3 à 27 jours pi : le foie, les ganglions lymphatiques, le colon, le petit intestin, l'estomac, la rate, les reins, les amygdales, les glandes salivaires et les poumons (80). Une étude a permis d'identifier les cellules dans lesquelles le virus se localise au niveau du foie, par une méthode d'hybridation *in situ* : les hépatocytes, les cellules de Kupffer, les cellules épithéliales des canaux biliaires et les lymphocytes interstitielles (44). Les hépatocytes sont très fortement positifs pour la sonde d'ADN complémentaire (ADNc) au virus et ce résultat suggère que ces cellules permettent la réplication de VHE et représente la cible principale du virus. Cependant, comme aucun hépatocyte dégénéré n'a été trouvé positif, les dommages au foie chez les porcs ne sont probablement pas dus à la réplication du virus dans ces cellules (44). L'ARN viral a également été détecté dans les cellules mononucléaires de tissus extra-hépatiques, laissant supposer que le VHE pourrait se répliquer dans les monocytes périphériques circulant sur une étendue limitée. Ceci contribuerait à la distribution du virus dans les tissus extra-hépatiques comme les ganglions lymphatiques, la rate, les amygdales et le petit et gros intestin (44).

Des données histologiques ont été rapportées en Corée suite à une infection expérimentale de porcs. Une infiltration lymphoplasmatique moyenne et des lésions nécrotiques hépatocellulaires ont été observées chez les porcs, suite à une infection du VHE (24,44,58). Cependant, deux autres études laissent supposer que les lésions au niveau du foie ne seraient pas directement reliées à l'infection par le VHE et à sa réplication, mais plutôt à une co-infection, comme par exemple le circovirus porcin ou encore le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) (12,80).

2.4 Méthodes de détection

Différentes techniques directes peuvent être utilisées afin de détecter le virus de l'hépatite E. Les méthodes moléculaires, par exemple, permettent de déceler le

bagage génétique du virus, tandis que les méthodes de culture *in vitro* permettent de vérifier la viabilité du virus en culture cellulaire. La culture cellulaire peut également permettre de créer des banques virales. Les méthodes immunologiques comme l'ELISA et l'immunohistochimie permettent de détecter les anticorps qui sont produits suite à l'infection du virus chez l'hôte. Ce sont des méthodes indirectes.

2.4.1 Méthodes moléculaires

Ces techniques moléculaires sont utilisées pour détecter le matériel génétique du VHE, soit son ARN. La biologie moléculaire est une discipline qui a transformé la microbiologie depuis le début des années 1970. Ces méthodes permettent de détecter l'ADN et l'ARN retrouvés dans les fluides humains (salive, fèces, sang, bile), les cellules et les tissus. Pour les méthodes PCR, l'extraction du matériel génétique est nécessaire avant de procéder à l'amplification. Maintenant, plusieurs trousseaux d'extraction sont disponibles commercialement pour l'ADN et l'ARN, selon la matrice d'où il doit être extrait (36,51,92). Autrement, des méthodes utilisant le TriZol (80) ou encore le phénol-chloroforme-alcool isoamylique (32) peuvent aussi être réalisées pour extraire l'ARN et l'ADN.

2.4.1.1 RT-PCR nichée

La RT-PCR nichée (RT-nPCR) est une méthode sensible 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.

Une étude de l'équipe de Huang et collaborateurs a permis de développer une RT-PCR nichée universelle pour le VHE (27). 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 (3156N/3157N et 3158N/3159N), 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 choisi pour la détection du VHE. Ce sont ces amorces qui ont été utilisées au cours de la présente étude. Dans la majorité des études, les isolats trouvés sur le terrain sont séquencés pour permettre l'étude des séquences et de la phylogénie des souches (27,58,84).

De son côté, Williams et collaborateurs ont mis au point une RT-PCR pour la détection du VHE, mais également une RT-PCR spécifique au brin négatif de l'ARN du VHE (80). C'est également une RT-PCR nichée ciblant une partie du gène de l'ORF2 qui a été développée. Le protocole spécifique au brin négatif a été réalisé pour permettre d'identifier des sites de réplication du VHE. Le matériel génétique du VHE étant un simple brin d'ARN positif, lors de sa réplication, il doit passer par un brin d'ARN négatif pour se multiplier. Grâce à ce PCR, les auteurs ont pu déceler jusqu'à 10pg d'ARN à l'étape du RT-PCR et jusqu'à 1fg à l'étape du PCR nichée. Un contrôle a été réalisé avec un échantillon de sérum positif au brin positif du VHE.

2.4.1.2 Hybridation *in situ*

L'hybridation *in situ* est également une autre méthode utilisée pour localiser l'ARN viral de VHE dans les tissus. À l'aide d'une sonde complémentaire à la séquence nucléotidique recherchée, il est possible de mettre en évidence l'endroit où se trouve le virus dans les organes. La sonde peut être couplée à un fluorochrome qui sera révélé par microscopie à fluorescence, à une enzyme qui peut être révélée par l'addition d'un substrat ou d'un anticorps ou encore d'un isotope radioactif, révélé par autoradiographie. Cette technique possède un avantage sur le PCR, parce qu'elle permet d'identifier dans quels types cellulaires le virus est présent à travers une population diversifiée de cellules ou tissus (44). L'équipe de Lee et collaborateurs a observé la présence d'ARN viral dans plusieurs types cellulaires du foie (hépatocytes, cellules de Kupffer, cellules épithéliales des canaux biliaires et les lymphocytes interstitielles) ainsi que les cellules mononucléaires des tissus extra-hépatiques (44). Cependant, elle ne peut pas être utilisée par tous les laboratoires à cause des équipements spécialisés et de la complexité de la technique (23). C'est une méthode qui nécessite des coûts élevés, donc qui ne peut être faite de routine pour la détection du VHE.

2.4.1.3 PCR quantitatif

La réaction en chaîne de la polymérase, en temps réel (Q-PCR), est un autre type de PCR, qui permet la détection et la quantification de l'ARN viral. Plusieurs technologies de détection sont possibles pour cette méthode 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/absence du VHE dans l'échantillon.

Plusieurs essais ont été réalisés par différentes équipes. L'article de Li et collaborateurs démontre l'utilisation d'un Q-PCR à l'aide de la technologie SYBR Green I, un agent intercalant, qui s'incorpore dans l'ADN double brin (47). Cependant, avec ce type de PCR, une courbe standard doit être réalisée pour pouvoir comparer les échantillons inconnus au standard. Dans cet article, les auteurs utilisent des échantillons de sérum et de fèces provenant de macaques inoculés expérimentalement. Ce protocole serait sûrement applicable aux porcs en changeant les amorces utilisées dans le mélange de PCR. Particulièrement, dans cet essai, un cycle PCR limité a été ajouté avant la réaction de Q-PCR pour empêcher la possibilité d'amplification non spécifique.

2.4.2 Méthodes immunologiques

Les méthodes immunologiques permettent de détecter les anticorps dirigés contre le VHE, ou encore de détecter les antigènes du VHE à l'aide d'anticorps. Les méthodes ELISA permettent de détecter plusieurs types d'anticorps : IgM, IgG et IgA. Au point de vue de l'immunohistochimie, les antigènes du VHE sont détectés dans des coupes histologiques à l'aide d'anticorps attachés à un marqueur fluorescent.

2.4.2.1 ELISA

Plusieurs études ont été réalisées suite à la détection d'anticorps chez des patients ou encore chez des espèces animales. Les antigènes dérivés de VHE humain et de VHE porcin ont été comparés et semblent contenir les mêmes épitopes immunodominants (16). Selon les études, différents antigènes ont été ciblés dans les 3 ORFs pour permettre la détection des anticorps. Dans l'ORF1, 12 domaines antigéniques ont été identifiés, 6 dans l'ORF2 et 3 dans la protéine

de l'ORF3 (62). Les antigènes reliés à ces domaines ont été utilisés au fond des puits des plaques ELISA pour permettre la fixation des anticorps des échantillons de sérum ou de plasma sur les antigènes. Différents ELISA provenant de trousse commerciales (77,84) ou faits maisons (58,76,81) ont été utilisés à travers les diverses études.

La trousse qui a été utilisée pour cette étude était une trousse commerciale, disponible pour la recherche uniquement et utilisée pour la détection chez l'humain des anticorps IgG anti-VHE (Genelabs Diagnostics, Singapore). Ce sont ces plaques ELISA qui ont été utilisées dans la présente étude. Les puits de la plaque ELISA sont enduits d'un mélange de trois antigènes recombinants de VHE humain correspondant à la région structurale du virus de l'hépatite E. Les sérums et les plasmas humains dilués dans un tampon sont incubés dans les puits. Les anticorps IgG anti-VHE si présents dans les échantillons, vont adhérer aux antigènes. Après avoir lavé les puits pour éliminer les résidus rester en suspension, des IgG anti-humain couplés à la peroxydase de raifort sont ajoutés aux puits et se collent aux complexes antigènes-anticorps formés précédemment. Par la suite, la solution de substrat contenant du peroxyde d'hydrogène et de l'o-phénylènediamine (OPD) permettra de révéler les anticorps spécifiques par une coloration des puits allant du jaune à l'orangé. Une fois la solution d'acide sulfurique ajouté, la réaction est arrêtée. La densité optique à 492nm permettra de déterminer la concentration d'anticorps présente dans l'échantillon, celle-ci étant proportionnelle à l'intensité de la couleur mesurée.

2.4.2.2 Immunohistochimie

Cette technique est utilisée pour détecter le VHE dans les tissus hépatiques fixés dans le formol, puis enrobés dans la paraffine. Dans une étude de Ha et Chae, des échantillons de foie, de ganglions lymphatiques, d'amygdales, de rates, de cœurs, de poumons, de reins, et de petits et grands intestins de porcs

ont été utilisés pour faire des coupes de tissus de 4µm, fixés au formol et ensuite enrobés dans la paraffine (23). Des anticorps polyclonaux de lapins contre le VHE humain (protéine de la capsid), qui réagissent avec le VHE porcin, ont été incubés avec les coupes de tissus. Puis des IgG de chèvres, anti-lapin, biotinylés ont été mis en présence des coupes pour révéler la présence du virus, après l'ajout du conjugué (streptavidine-phosphatase alcaline) et du substrat rouge. Des antigènes ont été détectés dans le foie des porcs, plus particulièrement dans le cytoplasme des hépatocytes. Pour certains porcs, des cellules positives au VHE ont été détectées dans les ganglions lymphatiques, dans les follicules des amygdales, dans la rate et dans la lamina propria du petit et gros intestin pour certains porcs (23). Cette technique permet également de voir des changements au niveau histologique.

2.4.3 Méthodes de culture *in vitro*

Les méthodes *in vitro* permettent de suivre le développement viral en milieu artificiel. De cette façon, on peut propager le virus en culture de cellules et étudier les différents facteurs qui font varier la croissance du virus.

2.4.3.1 Culture de cellules

La culture de cellules est un moyen de détecter le virus infectieux dans un échantillon. Lorsque le virus est mis en culture cellulaire sur un feuillet, si celui-ci est infectieux, il se propagera et formera de nouveaux virions. Des effets cytopathiques (ECP) peuvent également être observés sur le feuillet cellulaire à la suite de la propagation virale, cependant ce ne sont pas tous les virus et toutes les cellules qui font des ECP. On peut ensuite détecter ceux-ci par une méthode PCR ou immunologique, par exemple, l'immunohistochimie.

Il y a un dizaine d'années, une équipe de chercheurs ont réussi à mettre en culture primaire un isolat d'hépatocytes à partir d'un macaque infecté expérimentalement avec la souche de VHE Burma (72). Pour permettre le maintien de la culture primaire d'hépatocytes, un milieu de culture sans sérum, contenant des facteurs de croissance et des hormones a été développé. En utilisant un RT-PCR spécifique au brin positif et négatif (brin intermédiaire nécessaire à la réplication virale du VHE), ils ont pu démontrer l'évidence de la réplication du virus en culture primaire d'hépatocytes, même après plusieurs passages successifs (72).

La même équipe a également réussi à contrer le virus *in vitro* pour démontrer le pouvoir neutralisant des anticorps anti-VHE (73). Une culture primaire d'hépatocytes a été inoculée avec un volume de milieu sans sérum mélangé avec un échantillon de bile, positif et dilué dans un tampon phosphate. Par la suite, une solution purifiée d'anticorps ciblant l'ORF2 ou l'ORF3 a été ajoutée aux flacons de cellules. Un RT-PCR spécifique au brin positif et négatif a aussi été utilisé pour vérifier si les anticorps bloquent la réplication virale. Les résultats obtenus démontrent que les anticorps neutralisent la propagation puisque qu'aucun brin négatif n'est détecté suite à la neutralisation (73).

Dans les dernières années, l'équipe de Tanaka a également mis en évidence une lignée cellulaire permettant la propagation du VHE (74). Les cellules PLC/PRF/5, une lignée provenant d'un hépatocarcinome humain, ont été utilisées pour propager le virus en culture et des essais ont été effectués sur vingt autres lignées cellulaires. Aucun effet cytopathique n'a été observé pour les lignées cellulaires supportant la réplication du VHE. Pour détecter l'ARN du VHE, un PCR en temps réel a été utilisé et a permis d'obtenir un nombre de copies pour l'inoculum et également dans le surnageant suite à la réplication du virus en culture. De hauts titres de virus ont été obtenus, par PCR en temps réel, avec cette lignée cellulaire, mais les titres de départ de l'inoculum doivent être assez élevés, sinon le virus ne peut se propager. Ils sont également parvenus à

neutraliser le virus de génotype 3 à l'aide de sérums contenant des anticorps des classes IgM, IgG et IgA, provenant de patients atteints avec le VHE de génotypes 1, 3 ou 4.

Plusieurs études ont déjà été réalisées au sujet du virus de l'hépatite E chez le porc à travers le monde. Cependant, les études canadiennes et québécoises sont peu nombreuses sur ce point. Les objectifs énoncés dans l'introduction permettront de compléter les informations déjà acquises sur le VHE. Cette étude permettra également de tirer des conclusions quant à la caractérisation du risque associé au VHE porcin pour l'homme.

3. PREMIER ARTICLE

Experimental infection of swine with a Canadian isolate of hepatitis E virus (HEV)

Geneviève Simard^{1,2}, Sylvain Quessy², et Carole Simard^{1,2}.

¹Agence Canadienne d'inspection des aliments, Laboratoire de Saint-Hyacinthe, 3400 Boulevard Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 8E3, Canada.

²Département de Pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

ABSTRACT

Experimental inoculations of one month-old specific pathogen-free (SPF) piglets with a Canadian field strain of genogroup 3 swine hepatitis E virus (HEV, strain swSTHY23, GenBank accession number FJ617438) were performed. Two main experiments were conducted. The early-phase experiment (E) followed 6 piglets during 14 days post-inoculation (DPI). The late-phase experiment (L) was done with 12 pigs tested up to 120 DPI. Each piglet was inoculated intravenously (IV) with bile collected from the gallbladder of HEV positive (infected, n = 13) or HEV negative (control, n = 5) swine. Blood and feces were sampled weekly, starting 7 days prior the inoculation time (-7 DPI). ELISA and nested RT-PCR were used to follow the kinetic of HEV infection in pigs. Specific IgG HEV antibodies (Ab) were detected between 7 to 42 DPI for all infected pigs. Viral RNA was detected at 7 DPI in the serum and/or feces of those pigs, and lasted for up to 110 DPI for some of them. Furthermore, various organs were collected during autopsies performed at the end of each experimental trial. Viral RNA was present in numerous tissues of the hepatic and extrahepatic organs early after infection (7 and 14 DPI) as expected, and was still detected in the gallbladder wall of 2 pigs at 120 DPI. In contrast to other reported studies in swine, those data suggest that HEV is persistent despite early and sustained humoral responses and that gallbladder may be the latest site of viral replication. Infected swine are thus a continuous source of environmental contamination of HEV through their contaminated feces, blood and tissues.

INTRODUCTION

HEV is a non-enveloped icosahedral virus of approximately 32-34 nm in diameter with single positive stranded RNA harbouring three open reading frames (ORF 1-3) (1,15,68). It is the unique member of the *Hepeviridae*, *Hepevirus* genus (34,53). Four genotypes (G) are recognized so far in mammalian species. G1 and G2 are detected in humans in tropical and subtropical countries whereas G3 and G4 are both detected in human and animal species (7,26,48,61). G3 has a widespread distribution worldwide while G4 is from Asia mainly. Both G3 and G4 share very high degree of homology with animal isolates. HEV is now recognized as a zoonotic virus (48,61,83).

Transmission of HEV occurs mainly by the fecal-oral route through contaminated drinking water (31,61). Clinical manifestations depend on geographical situations. In non-industrialized countries, endemic HEV is responsible for mild hepatitis in symptomatic patients, although severe hepatitis and mortality is observed at high frequency in infected pregnant women (38,39). In industrialized countries, sporadic autochthonous HEV cases have been reported recently, following the ingestion of contaminated undercooked meat of wild boar and deer (46,50,71), and pig livers (83).

To our knowledge, no symptomatic case has been reported so far in human in Canada. Antibodies against HEV have been detected however in the Canadian population (84). A study performed in the province of Saskatchewan between 1998 and 2000 revealed that 2,4% of the tested individuals harboured anti-HEV antibodies against the ORF2 and ORF3 proteins of HEV. The same study revealed also a mean prevalence of 59,4% of anti-HEV Abs in pigs from various Canadian provinces, reaching more than 80% in Quebec and Ontario (84). Recent studies by our group showed that the HEV sequences isolated from pigs clustered all in genotype 3. Interestingly, some G3 Canadian isolates

showed 95% identity with two Japanese (swJ1-1 and HE-JA10) and one American (US1) strains implicated in human hepatitis (78).

The objective of the present study was to gain further information on the kinetic development of swine HEV following experimental infection of piglets with a Canadian G3 field isolate.

MATERIELS AND METHODS

Pigs. 18 Yorkshire/Landrace specific pathogen free piglets (tested for brucellosis, porcine circovirus 2, swine influenza, porcine parvovirus, porcine reproductive respiratory syndrome, transmissible gastroenteritis, porcine corona respiratory virus, pseudorabies, toxoplasmosis and mycoplasma hyopneumoniae) of 4 weeks of age were obtained from the pig colony of the Canadian Food Inspection Agency (CFIA), Fallowfield Laboratory, Ontario. Piglets were grouped and housed in three level-2 isolation cubicles at the CFIA, Saint-Hyacinthe Laboratory, Quebec. They were fed daily with grower ration, had water *ad libidum*, and were treated according to the Canadian Animal Care Committee of the CFIA. Sera were collected and tested by ELISA and PCR prior the experiments were conducted, to ensure the absence of HEV in those pigs.

Viral inoculum. Bile was collected aseptically from the gallbladder of a Canadian HEV positive field Yorkshire pig of 5 months old (swSTHY23 GenBank number FJ617438) (43) with a 18 gauge syringe of 30ml capacity. The level of viral RNA was estimated in bile extract by end-point titrations, using the conventional RT-PCR on 5 μ l of RNA extract, and primers specific to HEV (below). The expected band of 731bp was detected on the agarose gel stained with ethidium bromide (Fisher scientific, Nepean, ON) up to a limit of 1:10⁴ dilutions, suggesting the presence of 2X10⁶ RT-PCR units per ml of RNA extract. The bile was clarified by centrifugation at 626 x g (IEC DPR-6000 centrifuge, Canadian Cabinets Company Ltd, Ottawa, ON) for 10 min at 4°C and filtered through a 0,45 μ m filter (Baxter Corporation, Mississauga, ON), prior to be diluted in equal volume with phosphate-buffered saline (PBS), pH 7,4 (Gibco, Invitrogen, Burlington, ON). Filtered aliquots were kept at -70°C until used. Bile from a HEV non-infected pig housed at the same farm than the infected pig was treated similarly.

Experimental designs. Two sets of experimental trials were conducted: the early (E) and the late (L) phases. In the E trial, 4 piglets of group E1 (# 710-01, 02, 03 and 06) were inoculated IV through the jugular vein with 4ml each of the inoculum plus an additional 4ml *per os*. The E2 group (# 710-05 and 08) were non-inoculated piglets. The L experimental trial consisted of group L1 composed of 9 piglets (# 721-04 to 721-12) inoculated IV with 6ml of the infected bile. Group L2 comprised 3 negative controls (# 721-01 to 721-03) inoculated IV with the same amount of the HEV-free preparation. Each week, from pre-inoculation (-7 DPI) to post-inoculation times (up to 14 DPI for the E-trial, and 120 DPI for the L-trial), blood and faeces were collected from each animal. Blood was collected from the jugular vein with a 1½-in.-long, 20-gauge, hypodermic needle (BD, Franklin Lakes, NJ). Faeces were sampled directly from their rectum with a whirl-pack plastic bag. At the end of each trial, bile was collected from the gallbladder of each animal. Pieces of organs including the liver, gallbladder, mesenteric, hepatic and tracheo-bronchial lymph nodes, small intestine, colon, stomach, spleen, tonsil, kidney and skeletal muscle of the back leg were also collected, using a sterile scalpel for each sample. Tissues and body fluids were individually packaged and kept at -70°C until used.

Sample processing. Sera were collected from clotted blood centrifuged at 1800 x g (IEC DPR-6000 centrifuge) for 10 minutes at 4°C. Fecal samples were suspended in sterile, 20% (wt/vol) serum-free modified eagle medium (MEM) (Gibco), homogenized with a stomacher 400 (Seward Medical, Corp. Baxter, Pointe-Claire, QC) and clarified by centrifugation at 17 000 x g (Sorvall® Legend RT centrifuge, Mandel, Guelph, ON) for 5 min at room temperature. Pieces of tissues (2 grams) were homogenized similarly in sterile 20% (wt/vol) serum-free MEM. The homogenates were centrifuged at 2250 x g (IEC DPR-6000 centrifuge) for 15 minutes at 4°C. All sera and supernatants were aliquoted and stored at -70°C until used.

Serological analysis. All serum samples of a series were tested by ELISA at the same time. For the detection of anti-HEV IgG Abs in swine, a commercial ELISA for the detection of specific anti-HEV IgG Abs in humans (Genelabs® Diagnostics, ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, NY) was used with minor modifications, to adapt it to pigs (swELISA). Previous study showed cross-reactivity between human and swine HEV capsid antigens (19). In this kit, wells are coated with three recombinant HEV proteins corresponding to the ORF2 structural proteins of HEV. The method was used as suggested by the manufacturer, but the conjugate was replaced by a peroxidase-labeled goat anti-swine IgG (H+L) (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, ON) diluted at 1:1000. The plates were read at a wavelength of 492nm with a spectrophotometer (Multiskan Labsystems RC, type 351, Fisher scientific).

To establish an assay cut-off specific to swine HEV, negative (NC) and positive control (PC) serum samples from pigs were used. First, all serum samples from pigs inoculated with the preparation free of HEV were tested by swELISA. Their mean optical densities ($\bar{x}OD_{NEG} = 0,152$) and standard deviations ($\bar{x}SD = 0,0323$) were calculated. For each test, the same PC was used and its OD determined. The NC/PC cut-off was estimated at the $\bar{x}OD_{NEG} + 3\bar{x}SD / PCOD$, or 0,249. For the validity of the test, the PC and NC were included in all plates. A test sample (S) with an S/PC ratio higher or equal to the cut-off was declared positive, and negative if it was lower.

RNA extraction, RT-nestedPCR and sequencing. In the E trial, serum and fecal suspensions were tested by RT-nPCR at the time of slaughter, at 7 (2 pigs) and 14 (2 pigs) DPI. For the L trial, they were tested one week on two from -7 to 120DPI. All bile and homogenized tissues samples were tested. Viral RNA was extracted with the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON) from 140 μ l of the homogenized tissues, homogenized feces, serum and bile according to the manufacturer instructions. To elute RNA, 40 μ l of buffer AVE provided by the kit and 40 μ l of RNase, DNase free water were used one

time each. A reverse transcription nested PCR (RT-nPCR) assay (27) was used on 5ul extract, with some minor modifications. A one-step RT-PCR kit (Qiagen) was used for the first-round PCR with primers 3156N and 3157N (Table I) (27) (Armand-Frappier Institute, Laval, QC). The parameters consisted of a reverse transcription of 30 min at 50°C, followed by a denaturation step at 95°C for 15 min, and by 40 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 60°C, extension for 2 min at 72°C, and a final incubation for 7 min at 72°C. For the second-round PCR, primers 3158N and 3159N (Table I) (27) (Armand-Frappier Institute) were used with the Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The annealing temperature of this second round was 55°C. Samples with expected amplified product of the first-round of 731pb or 348pb for the second round amplification were declared positives.

To confirm the presence of the swSTHY23 in the inoculated pigs, RT-nPCR amplified fragments of 348pb from 5 samples were sequenced at the end of the E trial. The amplified PCR products were purified from the agarose gel with the QIAquick Gel Extraction kit from Qiagen, quantified with the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE) and sequenced at Laval University (Quebec, Canada). The resulting sequences were analysed with the Chromas Lite program (www.technelysium.com.au) and were aligned by Clustal W in the MEGA4 program (www.megasoftware.net).

RESULTS

Detection of HEV anti-IgG by swELISA over time. None of the E1 and E2 pigs killed at 7 or 14 DPI had detectable HEV IgG Abs in their sera (data not shown). Figure 4 shows the distribution of HEV IgG Abs in the sera of the L1 and L2 pigs. In the L1 animals, IgG HEV Abs started to be detected three weeks post-inoculation. The level of the Abs increased from 21 to 49 DPI for all pigs, and were maintained at high levels (n = 7) or decreased to detectable levels (n = 2) up to 120 DPI. Levels of Abs were not detected in all pre-inoculated sera (-7 and 0 DPI), nor in the sera of the E2 and the L2 control animals, with the exception of the L2 pigs showing a very slight increased of the S/PC ratio over the cut-off at 14 and 28 DPI, for an unknown reason.

Detection of HEV RNA in the serum and feces by RT-nPCR over time. HEV specific viral RNA was detected in all the serum and fecal samples of the E1 and L1 pigs, but in none of the E2 and L2 control animals and in the sera and feces of the E1 and L1 animals prior their inoculation with HEV. In general, HEV RNA was detected during a longer time period in the feces than in the serum of the same animal. In the sera, HEV RNA was detected at day 7 DPI for 2/2 (E1) and 6/9 (L1) pigs, and the detection continue up to 42-105 days for the L1 animals (Figure 5). The other 3 pigs of the L1 started to show specific HEV viral RNA in their serum at 21DPI, up to 63-84 DPI for two of them. Interestingly, the third pig (721-07) had viral RNA detected in its serum only at 21 DPI, while in contrast, pig 721-10 had detectable RNA in its sera from 7 DPI to 105 DPI. HEV was detected in feces of all pigs of the E1 and L1 at 7 DPI. Excretion was maintained from 7 up to 63 DPI (1 pig), 84 DPI (5 pigs) and 105 DPI (3 pigs). It is interesting to note that viral RNA was detected in the serum and /or feces in the presence of high levels of IgG Abs for most of the pigs. Pig 721-07 excreted also the virus during a long lasting period (from 7 to 84 DPI) albeit the viremia was detectable only at day 21 DPI. None of the

pigs of the L1 were having detectable RNA in their serum and/or feces at the time of killing (120 DPI).

Detection of HEV RNA in pig organs. During the time course of the experiment, all pigs appeared clinically normal. In the E trial at the time of slaughter, HEV RNA was detected in numerous organs at 7 DPI (2 pigs) and 14 DPI (2 pigs) in E1 group (Table II). In particular, all the livers, gallbladders and corresponding bile were harbouring viral RNA at this time post-inoculation. (Table II). Viral RNA was detected less frequently in extra-hepatic tissues such as the lymph nodes, spleen, kidney, small intestine and colon. None of the tonsils, stomach walls and muscles were found infected for the L groups, the same types of organs were collected and tested by RT-nPCR at the time of slaughter. Two out of 9 infected animals had detectable HEV viral RNA in their gallbladder's wall, but not in their corresponding bile or liver at 120 DPI. None of the other tested tissues harboured detectable viral RNA (Table II). Viral RNA was not detected in organs of the E2 and L2 pigs either.

Analysis of HEV sequences. Sequence analysis of the amplified 348bp fragments from 5 bile samples of the E1 animals showed 100% identity with the swSTHY23 inoculum, as expected.

DISCUSSION

In this study, young SPF piglets were inoculated intravenously with the bile of a HEV Canadian infected pig showing a strong HEV specific amplification signal when tested by RT-PCR, corresponding to 2×10^6 RT-PCR units per ml of RNA extract. The donor pig was infected with a G3, the genotype commonly reported in the Canadian pig population (84). All experimentally-inoculated piglets developed viremia, as demonstrated by the presence of viral RNA in their blood and the development of an immune response soon after viral inoculation. Our previous studies revealed like others (8,12) that bile of naturally-infected pigs was containing high levels of viral RNA. This study showed moreover the infectious potential of this body fluid. Bile was found more appropriate than fecal suspensions for trial inoculations to reduce the risk poses by the presence of microbial or toxin contaminants in feces (75). Other enteric viruses found in faeces (e.g. noroviruses and sapoviruses) (42,49,91), could interfere indeed in experimental designs. Due to its collecting and processing simplicity, bile was also preferred to liver extracts (35). Serum has been used also with success to inoculate pigs with HEV (56).

Detection of IgG Abs in blood was performed using a commercial ELISA adapted to pigs (16). In this commercial kit, three HEV recombinant proteins corresponding to the ORF2 structural proteins of human HEV are present. All swine of our experimental trial seroconverted following experimental inoculations. Our data confirmed cross-reactivity between human and swine HEV. Specific IgG Abs were detected between 14 to 42 DPI, and were still detected 4 months post-inoculation. Similar data were obtained for other experimental designs with HEV, where animals developed also sustained IgG responses following HEV inoculation. In infected humans, IgG anti-HEV Abs persists for at least few years (1).

Detection of HEV was performed using a nested reverse transcriptase PCR (27). Doing only the first round PCR amplification with primers 3156N and 3157N was not enough sensitive, as many samples were found positive only after the second (nested) round with 3158N and 3159N. Those data suggest that viral RNA was not expressed at high levels in blood, bile and tissues. To get maximum infectivity, the bile sample used to inoculate the pigs was giving a strong positive amplification signal following the first round PCR. With the selected inoculum, all experimental pigs became viremic, as demonstrated by the detection of viral RNA in their serum, using the RT-nPCR. As in the study of Meng et al.(58), viremia appears prior seroconversion, and was detected between 7 to 21 DPI. Detection of viral RNA in blood persisted during a longer-lasting period for 3 pigs (721-10; 09; 04), up to 84 and 110DPI. Excretion of HEV was also persistent in feces. Excretion of the virus was detected at 7 DPI for all pigs, up to 84 DPI (5 out of 9) and 105 DPI (3 out of 9).

Our study showed that viremia and viral excretion was present despite high level of IgG HEV Abs in blood, suggesting HEV is a persistent virus. Those findings differ from other studies in which RT-PCR was used instead. In the study of Kasorndorkbua et al., HEV RNA was detected only 3 to 7 and 14 to 20 DPI in swine inoculated with liver homogenates (35). Halbur et al. and Williams et al. detected also viral RNA between 3 to 27 DPI in various tissues during the viremic period (24,80). Natural transmission of HEV was monitored by Bouwknegt et al (6), using RT-PCR on individual faecal samples taken every 2 to 3 days. For susceptible pigs, the average period between exposure to an infectious pig and HEV excretion was 6 days, and the length of HEV excretion (infectious period) was estimated at up to 49 days only. In human, HEV is not considered as a persistent virus. Our data suggest that swine maintain the virus for a long time, although at low levels and thus, represent a good reservoir for HEV replication and dispersion.

Pigs of our experimental trials looked clinically normal along the study, as reported by others following experimental (56) or natural infections (63) of pigs. It has been reported however that young pigs naturally infected with swine HEV had in some cases microscopic evidence of viral hepatitis (58). Although microscopic lesions were not evaluated in our study, viral RNA was nevertheless found in various pig organs in the early phase trial, mainly in livers and gallbladder wall, as reported by others (80). The virus was found also in some pigs in extrahepatic sites such as the intestine, spleen, kidney and lymph nodes that were studied, but not in the tonsil, stomach and muscles (80). Lee et al. found the liver to be the most consistently positive organ for swine HEV antigen using immunohistochemistry and *in situ* hybridization, but found less frequently also the virus antigens in extrahepatic tissues such as lymph nodes, tonsil, spleen, and intestine (44). In their study, the infected cells were hepatocytes, Kupffer cells, bile epithelial cells and interstitial lymphocytes. Choi and Chae detected also strong signals in the hepatocytes and bile ducts in pigs naturally-infected with swine HEV, but also in small and large intestine, lymph node, tonsil, spleen and kidney by *in situ* hybridization (8). In our study, HEV RNA was detected later in the gallbladder wall, but not in other organs including liver at 120 DPI, suggesting that the gallbladder may be the latest site of viral replication. In natural conditions, De Deus et al. using RT-PCR found that bile was the most frequently positive sample, followed by mesenteric lymph nodes, liver, faeces and serum (12).

Despite long-lasting viral excretion into the environment of swine HEV through contaminated faeces and high prevalence of HEV in the Canadian pig population, to our knowledge, no clinical case of HEV has been reported so far in Canada. Canadian has been nevertheless exposed to the swine virus as showed by Yoo et al (84), similarly to people of other industrialized countries such as USA, Spain, France, Greece, Sweden (14), Japan (51,83), Netherlands (79) and Germany (64) where surveys have been conducted. HEV Abs are detected at higher frequency in workers of the swine industry. Exposure to

swine or their environment have been associated with elevated HEV seroprevalence in humans in The Netherlands (5,6). Strain variability or underestimation of asymptomatic or mild clinical cases in humans may account for such observations. Although usually asymptomatic, genotype 3 HEV infection can cause severe hepatitis in people (11,29). Sporadic autochthonous cases of hepatitis E have been reported following contaminated water, and through the ingestion of undercooked infected pig meat or through infected blood products (4). The presence of a Canadian strain of HEV in hepatic organs may thus represent a risk of zoonosis infection by the ingestion of contaminated pork liver. Human cases of HEV due to ingestion of contaminated undercooked meat of wild boar and deer (46,50,69), and pig livers (83) have been reported in other industrialized country. Interestingly, no muscles were found positive at 7, 14 and 120 DPI. Pork muscles may not pose such a human risk.

In USA, two HEV strains recovered from two patients with clinical hepatitis E (US-1 and US-2) with no history of travel to areas where HEV is endemic had high homology with porcine HEV. Those strains were capable of infecting chimpanzee, rhesus monkeys, and SPF pigs (US-2), providing experimental evidence of cross-species infection from human to swine also (57).

HEV raises also a potential public health concern for zoonosis or xenozoonosis following xenotransplantations with pigs organs (24,58) or in patients with reduced immune system as induced by chemotherapy or post-transplant immunosuppression (4). More experimental studies are needed on HEV. Our experimental model may help in understanding better the risk poses by swine HEV.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr Julien Delisle and Charles-Alain Lamarche for technical assistance in the experimental infection. We thank also Dr. Alain Houde for providing the inoculum used for the experimental infection. A greet thank to Yvon-Louis Trottier and Peter Müller for scientific advises.

Table I. Degenerate HEV primers sequences used for nested RT-PCR in the detection of the ORF2, in pigs.

Fragment length	Primer sequence
731 pb	3156N, forward, 5'-AAT TAT GCC (T)CA GTA C(T)C GG(A) GTT G-3'
731 pb	3157N, reverse, 5'-CCC TTA (G)TC C(T)T GCT GA(C) GCA TTC TC-3'
348 pb	3158N, forward, 5'-GTT (A)AT GCT T(C)T GCA TA(T) CAT GGC T-3'
348 pb	3159N, reverse, 5'-AGC CGA CGA AAT CAA TTC TGT C-3'

FIGURE 5. Distribution of viral HEV RNA in the feces and serum of the experimentally-infected swine of the L trial, from 0 to 120 DPI.

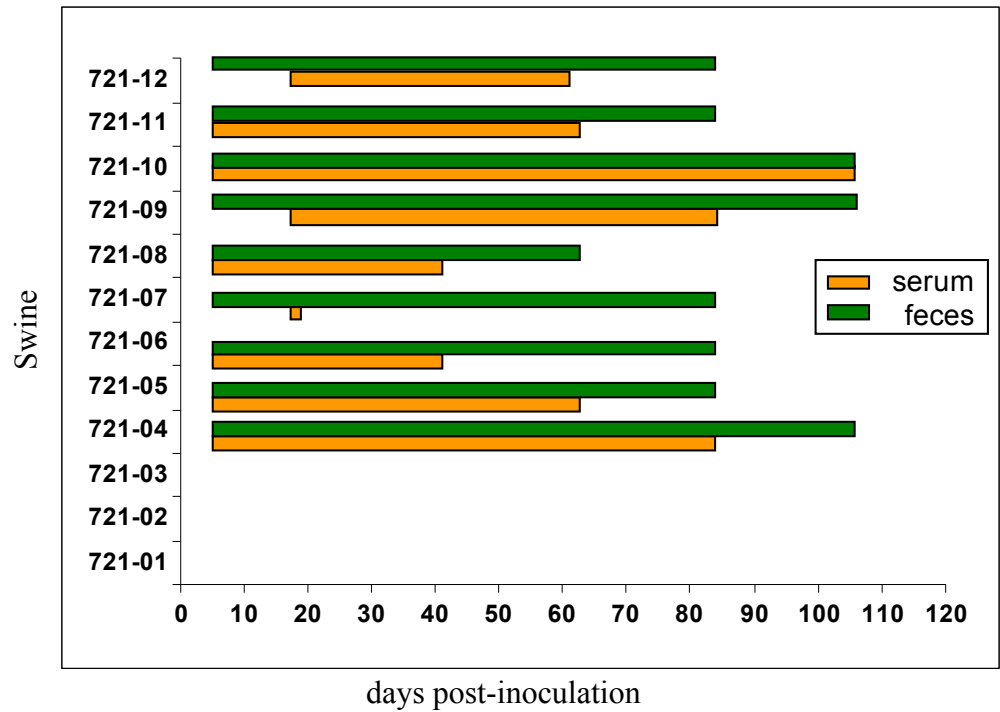


Table II. Detection of HEV RNA in pigs inoculated with swine HEV strain

Tissue	No. of necropsied pigs testing positive for HEV RNA in indicated tissue at DPI:		
	7 ^a	14 ^b	120 ^c
Tonsil	0	0	0
Liver	2	2	0
Gallbladder	2	2	2
Bile	2	2	0
Hepatic lymph nodes	1	1	0
Mesenteric lymph nodes	1	0	0
Tracheobronchial lymph nodes	1	0	0
Spleen	1	1	0
Stomach	0	0	0
Kidney	1	0	0
Small intestine	2	0	0
Colon	1	0	0
Muscle	0	0	0
Serum	2	2	0
Feces	2	2	0

^a 2 pigs were necropsied at 7 DPI

^b 2 pigs were necropsied at 14 DPI

^c 9 pigs were necropsied at 120 DPI

All negative swine controls gave consistently negative results

4. DEUXIÈME ARTICLE

Detection of Hepatitis E virus (HEV) in Canadian commercial slaughtered pigs

Geneviève Simard^{1,2}, Sylvain Quessy² et Carole Simard^{1,2}.

¹Agence Canadienne d'inspection des aliments, Laboratoire de Saint-Hyacinthe, 3400 Boulevard Casavant Ouest, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 8E3, Canada.

²Département de Pathologie et microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada.

ABSTRACT

Swine HEV is highly prevalent in Canadian pigs, as in pigs of other industrialized countries. In Canada, genotype 3 has been found exclusively so far. A close relationship exists between human and swine HEV of genotype 3 (G3). Both genomes share high degree of homology. Indeed, G3 has been associated with autochthonous human hepatitis, and is now considered zoonotic. This study was undertaken to evaluate the presence of swine HEV in Canadian pigs intended for human consumption. Pigs at the age of market were selected randomly from three slaughterhouses located in the province of Quebec, Canada. Overall, 100 corresponding sets of feces, blood, bile and livers were collected from pigs in each establishment. HEV exposure was determined by ELISA and nested RT-PCR. HEV IgG antibodies were detected at a mean of 26% of the pigs. Viral RNA was detected also in 10,7% of the blood, 12,9% of the bile, 7,4 % of the livers and 14,5% of the intestinal contents of the tested pigs. Phylogenetic analysis of 17 amplified sequences from positive samples showed the presence of genotype 3 in all of them. This study demonstrates that HEV is highly present in commercial pig intended for human consumption, and should raise some concerns while considering its potential transmission to humans through the consumption of pork products.

INTRODUCTION

Hepatitis E virus (HEV) is a non-enveloped, icosahedric virus of approximately 32-34 nm in diameter. The positive single-strand RNA virus of 7,2kb contains three open reading frames (ORF 1-3) (15). ORF1 encodes a non-structural polyprotein, ORF2 the capsid protein, and ORF3, a protein of less known function (62). HEV is the unique member of the *Hepeviridae* family, genus *Hepevirus* (34). Four genotypes are recognized in mammalian species so far. Genotypes 3 and 4 have been detected in both, pigs and humans (48), while genotypes 1 and 2 are of human origins only. Autochthonous HEV of genotypes 3 and 4 have been implicated in some cases of human diseases (10,65,69,70,83) in USA (65), Europe (10,66) and Japan (69,70,83), following ingestion of undercooked meat and livers of swine and deer (10,65,83). HEV is now recognized as a zoonotic disease. In pigs, the infection appears sub-clinical (44,56).

Studies on HEV are limited in Canada. Using a commercial HEV ELISA kit (Abbott GmbH, Biesbaden-Delkenheim, Germany), antibodies against HEV have been detected in the Saskatchewan population, with a prevalence of 2,4% (84). The same kit adapted for pigs showed a prevalence of swine HEV antibodies as high as 59,4% in 6-months-old healthy hogs, with the highest percentages found in the provinces of Quebec (88,8%) and Ontario (80,1%) (84). Pigs of 2 to 3 months of age were showed to be at higher risk of contracting HEV infection (55). The distribution of natural swine HEV in randomly selected pigs in an all-in all-out pig herd research facility revealed that the peak of viral antigen detection in the blood and feces of the animals was between 8 and 18 weeks of age, while the level of viral detection was reduced between 18 weeks to the slaughter time (22-29 weeks) (43).

The first genomic characterization of a Canadian swine HEV isolate suggested the presence of genotype 3 in our country (63). Recently, our group extended

this study by comparing numerous HEV isolates from randomly selected pig manure from distinct farms located in the province of Quebec. Sequencing of the 348bp amplified fragments in the ORF2 region by RT-nPCR (27) confirmed the circulation of high genetic diversity at nucleotide levels of genotype 3 among Canadian pigs of various ages (43,78).

The kinetic of swine HEV following experimental infection of SPF piglets with a Canadian isolate of genotype 3 was studied (67). In the early-phase experimental infection, the virus was excreted in the feces of all piglets, and was detected in body fluids and various hepatic and extra-hepatic organs as reported before (67). The late-phase experimental infection of piglets suggested the persistence of the virus in blood and sustained excretion in feces up to 110 days following exposure, despite the presence of high levels of IgG antibodies against HEV. The virus was also detected at 120 days post-inoculation in the gallbladder of 20% of the infected pigs. Those data suggested the presence of HEV in commercial slaughtered pigs despite their immune status against HEV. In Japan and USA, infectious HEV RNA was detected in grocery pig livers (17,83).

This study was undertaken to gain further information on swine HEV in commercial Canadian pigs intended for human consumption. Using a nested RT-PCR assay, the presence of HEV in randomly selected pigs at the market age from three slaughterhouses located in two regions of the province of Quebec, Canada, was evaluated. Exposure to HEV was also determined by a commercial ELISA (Genelabs Diagnostics Pte Ltd, Singapore) adapted to pig as done before by our group. Overall, one hundred corresponding sets of feces, blood, bile and livers were collected per establishment.

MATERIELS AND METHODS

Slaughterhouses. Three pig slaughterhouses from the province of Quebec were selected for this study. Two were located in the Montérégie region (slh1 and slh2) while the third one (slh 3) was located around 250km apart, in the Beauce region. Slaughtered pigs were around 5 to 6 months of age, with a weight averaging 100kg.

Sample collection and processing. One hundred pigs were selected randomly in each abattoir. From each selected animal, the intestinal content, blood, bile and liver were sampled. A 18 gauge syringe of 30 ml capacity was used to collect the bile aseptically, directly from the gallbladder of each pig. The blood was collected from the brachial artery, using a collecting tube. The fecal material was taken with a spatula from the large intestine incised with a scalpel. A piece of liver from each swine was cut using a second scalpel. Samples were individually packaged in whirl-pack or tubes and recorded, using a unique identification number for each.

Samples were processed the same day upon their arrival to the laboratory located in St-Hyacinthe, Quebec, Canada. Clotted blood was centrifuged at 1800 x g (IEC DPR-6000 centrifuge) for 10 minutes at 4°C. Serum was harvested, aliquoted in vials and stored at -70°C until used. Two grams of feces or organs were homogenized in 20% (wt/vol) sterile serum-free modified eagle medium (MEM) (Gibco) using a stomacher 400 (Seward Medical, Corp. Baxter, Pointe-Claire, QC). The organ homogenates were centrifuged at 2250 x g (IEC DPR-6000 centrifuge) for 15 minutes, at 4°C. The fecal homogenates were clarified by centrifugation at 17 000 x g (Sorvall® Legend RT centrifuge, Mandel, Guelph, ON) for 5 min at room temperature. Bile was distributed in vials. All processed samples were frozen at -70°C until tested.

Serological analysis. HEV anti-IgG ELISA in swine was performed essentially as described for the detection of HEV IgG in human (Genelabs® Diagnostics and MP Diagnostics, ZeptoMetrix Corporation, Buffalo, N.Y.), except that the secondary antibody was replaced by a peroxidase-labeled goat anti-swine IgG (Cedarlane Laboratories Ltd, Hornby, ON) diluted at 1:1000. The wells in that kit are coated with three recombinant HEV antigens which corresponded to the structural regions of HEV (Genelabs®). The plates were read at 492 nm on a spectrophotometer (Multiskan Labsystems RC, type 351, Fisher scientific). A cut-off specific for the swine assay was already determined from a previous study (67). A sample with an optical density (OD) equal or higher than the S/PC cut-off value (0.249) was considered positive, otherwise, it was declared negative. In each plate, a PC and a NC were used as reference samples (67).

RNA extraction and RT-nPCR analyses. Viral RNA was extracted with the QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen Inc., Mississauga, ON) from 140µl of 20% homogenates, serum or bile according to the manufacturer instructions. A published nested RT-PCR assay for the universal detection of HEV was used (27). The RT-nPCR was carried out using the One-step RT-PCR kit (Qiagen) with 3156N and 3157N primer set (Armand-Frappier Institute, Laval, QC) (27). The primers target a sequence in the ORF2 of 731 bp. The parameters consisted of a reverse transcription of 30 min at 50°C, followed by a denaturation step at 95°C for 15 min, then 40 cycles of denaturation for 1 min at 94°C, annealing for 1 min at 60°C, extension for 2 min at 72°C, and a final incubation for 7 min at 72°C. The nested-PCR required a second PCR round with the 3158N and 3159N primer set (Armand-Frappier Institute). In the second-round PCR, the temperature of annealing was setted at 55°C and the Platinum® *Taq* DNA polymerase (Invitrogen) was used. The second primers target a sequence included within the first amplified fragment, with an expected amplicon size of 348 bp.

Sequence analysis. Amplified nested PCR fragments of 348bp from organs or body fluids of commercial pigs (n = 50) were purified from the agarose gel with the QIAquick Gel Extraction kit from Qiagen. The purified DNA was quantified with the Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (Nanodrop Technologies Inc., Wilmington, DE). Both strands were sequenced by the Laval University (Quebec, Canada). The resulting DNA profiles were analysed with the Chromas Lite program (www.technelysium.com.au) and were aligned by Clustal W in the MEGA4 program (www.megasoftware.net). The bootstrap neighbor-joining method was used to construct the phylogenetic tree based on the partial nucleotide sequence of the ORF-2 region (348pb) using the MEGA4 program.

RESULTS

Detection of anti-HEV IgG antibodies in slaughtered pigs by swELISA.

Our previous study using experimentally inoculated SPF piglets with a Canadian isolate genotype 3 HEV showed the efficiency of the commercial human HEV ELISA (Genelabs Diagnostics Pte Ltd, Singapore) adapted to swine to detect antibodies in the blood of HEV infected pigs during the time course of the study, but not in the blood of the non-infected pigs. This study uses the same protocol with a S/PC cut-off of 0,249. Overall, swELISA was carried out in the serum of 273 slaughtered pigs (slh1=91; slh2=92 and slh3=90). At the time of slaughter, a mean of 26% of pigs were harbouring IgG antibodies against HEV (Table III). Negative animals had a mean S/PC ratio of 0,078 (sd=0,046) while it was 1,455 (sd=0,985) for the positive animals (Table IV). The percentages of HEV IgG positive animals were differently distributed among the randomly selected pigs of the three slaughterhouses, with 35,2%, 29,4% and 13,3% for slh1, 2 and 3 respectively (Table III). By grouping the animals according to their ear tag numbers, pigs from apparently 83 distinct groups were tested (Table V). Among them, 36,1% had at least one animal harbouring IgG HEV antibodies in their blood (Table V).

Detection of HEV RNA in the serum of slaughtered pigs by RT-nPCR

Overall, 272 serum samples were tested by RT-nPCR. A total of 29 pigs (10,7%) were found viremic. Out of the 71 seropositive animals at the time of slaughter (ELISA+), 12 pigs (16,9%) harboured the virus in their blood, while viral RNA was detected in 17 pigs (8,4%) of the 201 seronegative pigs (ELISA-) (Table VI). Variation in the percentage of viremia was found, according to the slaughter. It was detected respectively at 18,7%, 10,9% and 2,2% for slh1, 2 and 3.

Detection of HEV RNA in the liver and the corresponding bile of slaughtered pigs by RT-nPCR

Detection of HEV RNA was done on 271 paired bile / liver (Table VII). Overall, 35 bile (12,9%) and 20 livers (7,4%) were found to harbour HEV viral RNA (Table VII). Only 8 sets of samples (2,9%) were positives in the associated bile and liver. The percentage of positive livers and/or bile were respectively of 32,9% (slh1), 11,1% (slh2) and 10,8% (slh3).

Detection of HEV RNA in the fecal content of the slaughtered pigs by RT-nPCR

Fecal material was collected from the intestinal content of respectively 98, 99 and 99 pigs for slh 1, 2 and 3. Out of the 296 samples that were tested, viral RNA was detected in 43 animals (14,5%) (Table VIII). Viral RNA was detected in the fecal content of respectively 14,8% (slh1), 29,3% (slh2) and 1% (slh3) pigs.

Exposure of slaughtered pigs to HEV

Both viral RNA and HEV anti-IgG Abs are markers for exposure to HEV. Overall, 5 assays were conducted in parallel for most of the slaughtered pigs. The analyses of 243 sets of corresponding bile, serum, feces and livers showed that 108 of the slaughtered pigs (44,4%) were exposed to HEV. While 72 of them presented only one marker of viral infection, in 36 pigs, two or more markers of HEV infection were detected concomitantly (Table IX). From the exposed animals, 78 of them (72,2%) harboured the virus, as determined by the presence of viral RNA.

Sequence analysis of amplified fragments

Initial sequence analyses were done using randomly selected 50 amplified fragments from various tissues and body fluids. They originated from serum (S), feces (Fe), bile (B), gallbladder (VB) or livers (Fo). Some sequences of the 348pb fragment shared 100% homology among them, so only one sequence

each was kept for further analysis. Sequences of distinct isolates from 17 slaughtered pigs infected with HEV were analysed in more depth (from slh1: swSTHY2Fe, swSTHY10Fe, swSTHY59Fe, swSTHY64Fe, swSTHY99Fe, swSTHY58S and swSTHY91S; from slh2: swSTHY113B, swSTHY118B, swSTHY129B, swSTHY156Fo and swSTHY156VB; from slh3: swSTHY229B, swSTHY290B, swSTHY255Fe and swSTHY276VB). All the isolates belonged to the genotype 3 (figure 6). Interestingly, strain swSTHY229B appeared in the same cluster as human US-1 and swine US1 strains (58). Nucleotide identities varied from 92 % to 100% when compared with other strains of genotype 3 isolated from swine.

DISCUSSION

This is the first study reporting the presence of HEV in commercial slaughtered pigs in Canada, as showed by the detection of HEV isolates in body fluids, feces and hepatic tissues of those animals. To estimate the immune status of the slaughtered pigs, a commercial ELISA (Genelabs Diagnostics Pte Ltd, Singapore) was adapted to pigs. A S/PC cut-off ratio of 0,249 was established and evaluated previously, using pigs experimentally-inoculated with a Canadian isolate of HEV (67). Anti IgG antibodies were detected in 26% of the 273 pigs selected randomly from three abattoirs located in two distinct regions of the province of Quebec, Canada. Seronegative slaughtered pigs had a mean S/PC of 0,078 +/- 0,046, while the seropositive slaughtered pigs had a much higher mean S/PC value of 1,455 +/- 0,985.

A study performed in 1999 showed that 38% of the adult pigs that were tested, and 26% of nursery pigs were seropositive for HEV in Quebec herds (55). In this study, the authors used an ELISA based on the ORF2 protein of strain Sar55 from Pakistan. Also, a pan-Canadian study performed in 2001 revealed a seroprevalence of HEV of 88,8% in pigs of 6 months old from the province of Quebec by using the Abbott HEV EIA commercial kit (84). Our study revealed a much lower prevalence of HEV in that age group. The time of sampling and the ELISA formats used to estimate the prevalence might have accounted for the noted difference. The group of Waar et al. (77) compared the Abbott HEV EIA used by Yoo et al. (84) and the Genelabs Diagnostics HEV ELISA used in our study. Significant differences for the same sampling serums were observed. The divergence between both kits was explained by the distinct viral proteins used to coat the ELISA plates. Both tests are based on different non-European strains (77). The sensitivity of our kit was however previously tested and showed to be efficient in detecting HEV specific HEV Abs in experimentally-inoculated pigs with a Canadian isolate of genotype 3 HEV.

For pigs of the slaughterhouses # 1 and 2 (region 1), respectively 35,2% and 29,4% of the pigs had anti-IgG antibodies in their sera, while the percentage was much lower in the slaughterhouse of the other region (13,3%), suggesting the level of HEV exposure is not equally distributed in the province. Further studies are thus needed to determine the regional distribution of HEV in pigs. In other industrialized countries such as USA and Australia, high prevalence of HEV in pigs is also noticed (80).

HEV RNA was detected in the serum and fecal material of a significant percentage of slaughtered pigs. 43 out of 296 (14,5%) fecal samples and 29 out of 272 (10,7%) blood samples were harboring the virus. Those data suggest a high exposure risk of industry workers to HEV. Transmission of HEV normally occurs by the fecal-oral route (15,30,62). Swine industries workers (farmers, slaughter workers and veterinarians) are a group at risk for HEV infection most probably through their exposition to the infected fecal material and blood. Higher seroprevalence of specific HEV antibodies have been detected in swine veterinarians compared to normal blood donors (59).

HEV RNA was detected also in 12,9% of the bile and 7,4% of the livers of the slaughtered pigs that were tested. When the corresponding bile and livers from the same pigs were analysed however, only 8 corresponding sets were both positives for HEV RNA. Albeit those findings, swine HEV is asymptomatic in pigs. Microscopic evidences of hepatitis have been observed histologically in experimentally and naturally infected pigs (44). Interestingly, viral HEV was detected also in commercial pig livers in grocery stores in USA and in Japan (17,83). Using bioassay in the USA study, the isolates from grocery stores were found to be infectious (18). Our findings suggest also that some pig livers sold in grocery stores in Canada, are contaminated by autochthonous swine HEV. Care should be taken while consuming pig livers because HEV is a potential zoonotic virus. Cases of hepatitis E in human have been reported after they had eaten undercooked meat or livers from swine, deer or wild boar (10,50,69,70).

All strains of swine HEV detected so far in Canada clustered in the genotype 3, including all the isolates of this study. Genotype 3 has been recognised to be prevalent in swine herds worldwide including Asia, Europe, Oceania, North and South America (48,62). This study added information on the diversity of swine HEV in circulation among pigs in the province of Quebec, Canada. Interestingly, strain swSTHY229B appeared in the same cluster than the human US-1 and swine US1 strains (58), and is thus closely related to human HEV. The 5' end of the ORF2 is the most conserved region among HEV isolates (27,78).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Julien Delisle and Charles-Alain Lamarche for technical assistance in the sampling of the three slaughterhouses and the sample processing. A special thank to Dre Ann Letellier and Peter Müller for technical advices.

Table III. Detection of IgG anti-HEV antibodies in the serum of slaughtered pigs, using a swine-ELISA

Slaughterhouse	IgG HEV NEGATIVES		IgG HEV POSITIVES		Total
	n	%	n	%	
slh1	59	64,8	32	35,2	91
slh2	65	70,6	27	29,4	92
slh3	78	86,7	12	13,3	90
Total	202	74	71	26	273

Table IV. Mean S/PC ratio with corresponding standard deviation (SD) of HEV IgG seronegative and HEV IgG seropositive pigs, as detected by the swine-ELISA

Slaughterhouse	IgG HEV NEGATIVES			IgG HEV POSITIVES		
	number	mean S/PC	sd S/PC	number	mean S/PC	sd S/PC
slh1	59	0,094	0,051	32	1,613	1,311
slh2	65	0,065	0,041	27	1,474	0,605
slh3	78	0,078	0,043	12	0,99	0,368
Total	202	0,078	0,046	71	1,455	0,985

Table V. Determination of the HEV IgG antibody status of distinct lots of pigs grouped according to their ear-tag numbers

Slaughterhouse	lot number selected randomly for testing	mean number of pigs tested per lot	median number of pigs tested per lot	IgG HEV POSITIVE PIGS	
				lot number	%
slh1	31	2,7	2	15	48,4
slh2	7	13,1	11	5	71,4
slh3	45	1,9	1	10	22,2
Total	83	N/A	N/A	30	36,1

Table VI. Detection of viral HEV RNA in the serum of slaughtered pigs, using RT-nPCR

Slaughterhouse	ELISA+ nPCR +	ELISA+ nPCR -	ELISA - nPCR +	ELISA - nPCR -	Total
slh1	8	24	9	50	91
slh2	4	23	6	59	92
slh3	0	12	2	75	89
Total	12	59	17	184	272

Table VII. Detection of viral HEV RNA in the liver and the corresponding bile of slaughtered pigs, using RT-nPCR

Salughterhouse	Bile+ Liver +	Bile+ Liver -	Bile- Liver +	Bile- Liver -	Total
slh1	5	19	2	53	79
slh2	3	3	5	88	99
slh3	0	5	5	83	93
Total	8	27	12	224	271

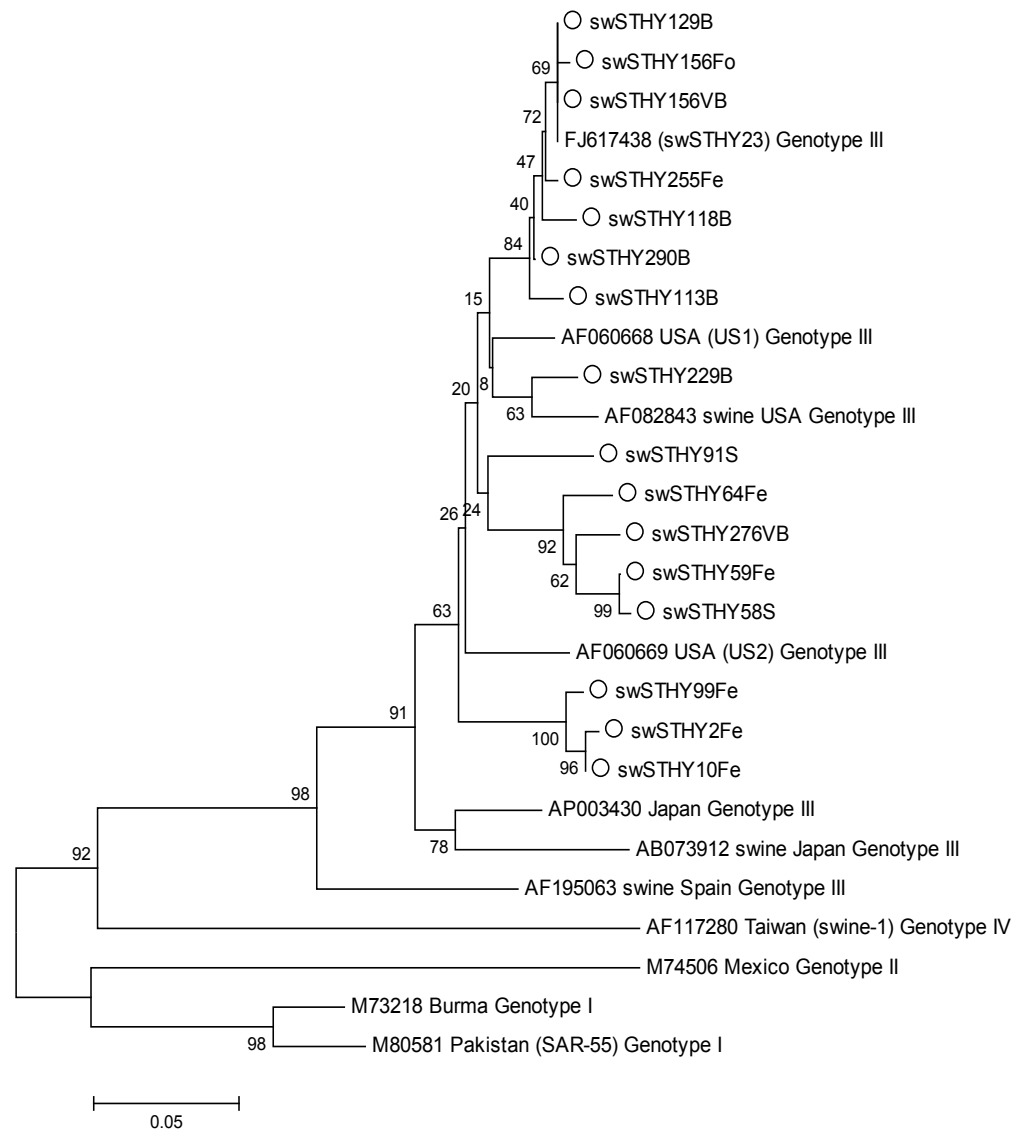
Table VIII. Detection of viral HEV RNA in the fecal content of slaughtered pigs, using RT-nPCR

Slaughterhouse	RT-nPCR of intestinal content		
	Positive	Negative	Total
slh1	13	85	98
slh2	29	70	99
slh3	1	98	99
Total	43	253	296

Table IX. Number of HEV markers per slaughtered pigs

Slaughterhouse	Markers of HEV infection						Total
	5	4	3	2	1	0	
slh1	3	2	5	7	25	28	70
slh2	2	0	5	11	29	42	89
slh3	0	0	0	2	18	64	84
Total	5	2	10	19	72	134	243

Figure 6. Phylogenetic tree created by the bootstrap neighbor-joining method based on the nucleotide sequences representing a portion of the ORF2 gene. Origins of strains of HEV are indicated, and their GenBank accession numbers are presented. The bar represents 5% sequence divergence. Strains from this study had a circle before their name.



5. DISCUSSION GÉNÉRALE

5.1 Étude de la cinétique de l'infection virale du VHE chez des porcs inoculés expérimentalement

Des infections expérimentales ont déjà été effectuées chez des porcs par le passé (44,56,57,80). Dans ces expériences, différentes variantes sont exploitées pour étudier l'infection virale du VHE : différents isolats de VHE, les voies d'infection, les doses virales, les modes de transmission, différentes espèces animales, etc. Selon les études, les facteurs suivis après l'infection expérimentale diffèrent, allant des anticorps anti-VHE (IgM et IgG) à la détection de l'ARN dans différentes matrices (organes, sérums, plasmas, bile et fèces). La majorité des chercheurs utilisent le sérum (56) ou les matières fécales (44,57) provenant d'animaux infectés pour réaliser leurs infections expérimentales. Nos données confirment que la bile filtrée peut également être une source acceptable de virus pour l'inoculation de porcs. Nous pensons qu'en utilisant ce type d'inoculum, les risques de contaminants viraux ou bactériens qui pourraient se retrouver dans les matières fécales et le sérum, en même temps que le VHE, sont diminués. De même, la bile est un fluide biologique nécessitant peu de manipulations avant l'inoculation expérimentale.

Aucune étude de ce genre n'a encore été réalisée au Canada et plus précisément au Québec. Il est important d'observer si des différences peuvent survenir suite à l'infection de porcs avec une souche de VHE porcine provenant du Canada. La souche peut partager des similitudes génétiques avec les autres du même génotype, mais différer au point de vue de la virulence.

L'objectif premier de cette portion de l'étude est d'évaluer la cinétique virale du VHE, suite à une infection expérimentale chez des porcs exempts de pathogènes spécifiques, avec un isolat canadien de VHE porcine trouvé au

hasard sur le terrain. La détection des anticorps anti-VHE dans le sérum, de l'ARN du VHE dans les organes, la bile, le sérum et les matières fécales ont été utilisés pour évaluer la progression et la persistance du virus chez le porc.

5.1.1 Cinétique des anticorps anti-VHE dans le sérum

Dans cette étude, des porcelets âgés de 4 semaines ont été inoculés par voie intraveineuse avec de la bile d'un porc canadien contaminé naturellement par le VHE. La souche de VHE du champ fait partie du génotype 3. Ce génotype a été identifié précédemment par d'autres chercheurs au Canada (43,78,84). Les porcelets inoculés dans la phase précoce n'ont développé aucun anticorps contre le VHE après 7 et 14 jours post-inoculation, ce qui est normal pour l'apparition des IgG. Par contre, les porcelets inoculés lors de la phase tardive ont tous développé des anticorps IgG anti-VHE. Le début de la réponse immunitaire est survenu très tôt après l'inoculation virale. Entre 14 et 42 jours pi, une augmentation de la concentration des anticorps IgG anti-VHE est détectable selon les porcelets et le taux des anticorps détectés demeure relativement stable par la suite, jusqu'au moment de l'abattage (voir section 3).

L'équipe de Engle et collaborateurs a mis en évidence le fait que les épitopes immunodominants sont les mêmes pour les antigènes du HEV provenant de l'humain ou du porc (16). Le test ELISA utilisé dans l'étude a été adapté pour le porc à partir d'une trousse de détection d'anticorps IgG anti-VHE humain et une valeur seuil (0,249) a été déterminée afin de faire la ségrégation des positifs et des négatifs. Ce test nous a permis de détecter les porcs positifs pour les anticorps IgG anti-VHE. Les études réalisées par d'autres auteurs arrivent à des résultats similaires. Les anticorps IgG sont détectés pendant au moins 10 semaines et les IgM sont détectés avant les IgG, mais ils sont éliminés en 1 à 2 semaines (56) (voir figure 3).

Les anticorps contre le VHE ne semblent pas avoir de pouvoir neutralisant contre le virus, puisque l'ARN viral est retrouvé dans le sérum malgré la présence d'anticorps en circulation chez les porcs (voir section 3). Cette affirmation semble contredire les résultats obtenus par les équipes de Tam et collaborateurs et de Tanaka et collaborateurs en culture cellulaire (73,74). Ceux-ci avaient réussi à neutraliser la réplication virale du VHE en culture de cellules, en ajoutant des anticorps ciblant l'ORF2 ou l'ORF3. Il est possible également que les virus demeurent à l'état latent dans certaines cellules cibles, et que le système immunitaire à médiation cellulaire ne soit pas efficace.

5.1.2 Présence ou absence du VHE dans les organes

Les porcs de l'infection expérimentale précoce et tardive sont demeurés cliniquement normaux. Ils n'ont développé aucun signe clinique apparent. Ceci avait déjà été observé lors des inoculations expérimentales précédentes (37,56,63) et également chez des porcs naturellement infectés (20,43). La détection de l'ARN viral dans les organes a été réalisée à l'aide d'une RT-PCR nichée adaptée de Huang et collaborateurs (27). Les amorces ciblent une région conservée de l'ORF2, faisant partie du gène de la capsid.

Les organes dans lesquels de l'ARN de VHE a été décelé à la fin de l'étude précoce (7 et 14 jours pi) sont le foie, la vésicule biliaire, la bile, les ganglions hépatiques, mésentériques et trachéobronchiques, la rate, les reins et le petit et gros intestin. À la fin de l'étude tardive (120 jours pi), quelques vésicules biliaires sont également positives à l'ARN viral (voir section 3). Après 120 jours, le virus a probablement été éliminé par le système immunitaire. Ces résultats confirment ceux obtenus lors de l'étude de Williams et collaborateurs (80), à l'exception que ces chercheurs en ont trouvé également dans les amygdales, l'estomac et les poumons (à 7 et 14 jours pi). Les muscles sont toujours négatifs peut importe l'étude, ce qui suggère que la viande des animaux atteints ne serait pas contaminée. Cependant, les foies porcins

contaminés qui sont consommés insuffisamment cuits pourraient être une source de contamination humaine, comme dans les cas retrouvés au Japon (46,50,69,83). La contamination de cet organe porcine par le VHE amène également à penser aux xénotransplantations, des opérations qui sont réalisées avec des organes porcins. Cependant, ces transplantations en sont encore aux essais cliniques dans les pays où elles sont acceptées, ce qui n'est pas le cas du Canada. Les personnes qui pourraient être greffées, sont généralement immunosupprimées, et seraient plus à risque de développer des symptômes associés au VHE.

Des méthodes d'hybridation *in situ* et d'immunohistochimie ont été utilisées respectivement par d'autres équipes pour mettre en évidence l'ARN de VHE et la présence d'antigènes du virus de l'hépatite E dans le foie et les tissus extra-hépatiques (8,23,44,45). L'ARN viral a été retrouvé moins fréquemment dans les ganglions lymphatiques, les amygdales, la rate, le petit et le gros intestin. À l'aide de la méthode d'hybridation *in situ*, on a observé chez les hépatocytes, les cellules de Kupffer, les cellules épithéliales des canaux biliaires et les lymphocytes interstitiels, un signal intense signifiant la présence d'ARN viral (44).

5.1.3 Persistance du virus dans les fèces et le sérum

L'ARN du VHE a été détecté par une RT-PCR nichée dans les fèces et le sérum chez 9 porcs inoculés expérimentalement (groupe L1) par le VHE. La détection se fait de 7 à 105 jours pi dans les matières fécales pour 3 des porcs, de 7 à 84 jours pi pour 5 autres porcs et de 7 à 63 jours pi pour le dernier porc (voir section 3). Dans le sérum, la virémie est plus variable, débutant à 7 jours pi pour la majorité des porcs et finissant entre 49 et 105 jours pi. Malgré la présence des anticorps dans le sang depuis 42 jours pi pour la majorité des porcs, l'ARN du VHE persiste dans le sérum et également dans les fèces.

En comparant avec d'autres études sur des infections expérimentales chez des porcs, la persistance de l'ARN viral en présence des anticorps est moindre en temps ou encore absente. Dans une étude de Lee et collaborateurs, des porcs ont été inoculés avec un mélange de matières fécales par voie intraveineuse (IV) (44). L'excrétion virale au niveau des matières fécales a débuté 3 jours pi et a persisté pendant 7 semaines selon les données rapportées dans cette étude. Dans une des études de Meng et collaborateurs, des porcs ont été inoculés par voie IV avec le sérum d'un porc naturellement contaminé (56). L'excrétion virale persiste également 7 semaines dans cette dernière étude. La différence entre les résultats peut s'expliquer par la route d'administration de l'inoculum, la souche de VHE porcin, la dose infectieuse et la méthode moléculaire utilisée pour la détection du VHE. Dans notre cas, une RT-PCR nichée a été utilisée, une méthode ayant une sensibilité accrue.

La route habituelle de transmission du virus de l'hépatite E se fait par voie orofécale. L'excrétion virale de VHE dans les fèces chez le porc pendant une aussi longue période explique probablement le fait que cet animal soit un réservoir majeur du virus. Ce qui amène à penser à la transmission du virus du porc aux humains par les matières fécales. Les travailleurs de l'industrie porcine seraient les personnes les plus exposées au VHE, puisqu'ils sont en contact avec les fluides des porcs. Une étude effectuée en Caroline du Nord vient corroborer ce fait en démontrant que 10,9% des travailleurs de l'industrie porcine avaient développé des anticorps anti-VHE comparativement à seulement 2,4% de la population qui n'est pas en contact avec les porcs (81).

5.2 Étude de la distribution du VHE dans la production porcine au Québec

Chez l'homme, le virus de l'hépatite E cause des hépatites virales sérieuses et nombreuses dans les pays tropicaux et subtropicaux majoritairement suite à

l'absorption d'eau contaminée par des matières fécales contenant des virions de VHE (1). Plus récemment, dans certains pays industrialisés, des cas sporadiques d'hépatite de type E ont été rapportés chez des patients ayant consommé de la viande ou du foie d'animaux contaminés (porcs, cerfs ou sangliers), insuffisamment cuits (46,50,69,83). Il est cependant important de caractériser le risque encouru par l'homme suite à la présence du VHE chez les porcs des pays industrialisés, notamment au Canada. Le VHE des génotypes 3 et 4 est reconnu comme étant un virus à caractère zoonotique.

5.2.1 Détermination de la séroprévalence chez les porcs d'abattoir

L'étude de la distribution du virus chez les porcs dans différents abattoirs québécois est la première rapportée au Canada. D'autres études ont été réalisées sur la séroprévalence du VHE chez les porcs du Québec (84) ou encore sur des fermes québécoises (43,78).

Selon l'étude de Yoo et collaborateurs, qui ont étudié la séroprévalence du VHE chez les porcs Canadiens de 6 mois, la séroprévalence au Québec était aussi élevée que 88,8% (84). Cependant, pour ce projet, la séroprévalence obtenue est beaucoup plus faible, à 26,0% (voir section 4). Les tests ELISA qui ont été utilisés dans ces 2 études sont différents l'un de l'autre comme l'a démontré l'article de Waar et collaborateurs (77). Selon eux, la séroprévalence est significativement différente selon qu'elle est déterminée avec un ou l'autre des tests (Abbot Laboratories versus Genelabs Diagnostics). La différence entre les tests est expliquée par les protéines utilisées pour la détection des IgG anti-HEV, qui proviennent de plusieurs souches non-européennes. De plus, ce sont des études effectuées à différentes périodes dans le temps; la prévalence réelle a pu changer depuis que l'étude de Yoo et collaborateurs a été réalisée (avant 2001) (84). L'inoculation expérimentale valide cependant nos résultats, puisque tous les porcs inoculés par le HEV ont été détectés sérologiquement.

Les porcs positifs aux anticorps IgG anti-VHE proviennent de 2 régions du Québec. Les 2 premiers abattoirs ont été échantillonnés dans la région 1 (Montérégie) et le troisième abattoir dans la région 2 (Beauce). Les résultats obtenus respectivement pour ces régions sont de 32,3% et 13,3% pour une moyenne de 22,8% (voir section 4).

5.2.2 Répartition du virus chez les porcs, lors de la mise en marché

Pour évaluer la dissémination du virus chez les porcs d'abattoirs, l'ARN du VHE a été recherché dans le sérum, le foie, la bile et les matières fécales de chacun des porcs échantillonnés. Avec ces données, nous pourrions estimer les risques associés à la présence du virus de l'hépatite E chez le porc, lors de la mise en marché.

Le virus est présent dans les fèces et le sérum de certains porcs en même temps que les anticorps dans le sérum, ce qui vient confirmer les données obtenues lors de l'infection expérimentale. Sur 71 porcs séropositifs aux anticorps anti-VHE, 12 (16,9%) de ceux-ci révèlent la présence d'ARN de VHE dans leur sang. Au total, 10,7% des porcs des 3 abattoirs démontrent une virémie et 14,5% des porcs excrètent le virus dans leurs matières fécales (voir section 4). La persistance du virus au niveau des matières fécales et du sang malgré la présence d'anticorps est possible, même chez des animaux naturellement contaminés.

L'ARN viral est détecté également dans le foie et la bile. En analysant 271 échantillons jumelés de foies et de biles, seulement 8 porcs sont positifs pour les 2 (2,9%). Cependant, 12,9% des échantillons sont positifs pour l'ARN viral dans la bile et 7,4% dans les foies. Cette différence est probablement due au fait que le virus est plus concentré dans la bile que dans le foie. Le pourcentage de porcs positifs soit dans le foie, soit dans la bile est respectivement de 32,9%, 11,1% et 10,8% pour les abattoirs slh1, slh2 et slh3 (voir section 4). Le foie de

porc est un aliment vendu sur les rayons des supermarchés au Canada. Les lésions retrouvées au niveau du foie des porcs atteints de VHE ne semblent pas visibles à l'œil nu puisqu'elles ont été détectées dans les études précédentes sur des coupes histologiques de foies au microscope (44,58). Dans le cas de l'infection expérimentale, les foies positifs à l'ARN de VHE ne sont détectés qu'à 7 et 14 jours pi, mais pas au moment de l'abattage, quoique deux vésicules biliaires contenaient de l'ARN viral (voir section 3). L'infection des porcelets expérimentaux a été effectuée à 4 semaines d'âge, alors que l'infection au VHE à l'état naturel semble plus tardive selon d'autres études (54,55,58). En analysant les résultats obtenus suite à l'échantillonnage à l'abattoir on note qu'un certain nombre de foies sont contaminés (7,4%). Les consommateurs peuvent donc être exposés à des foies contaminés lors de la mise en marché de ceux-ci. Cependant, avec une cuisson complète de l'aliment, les risques sont diminués.

Les anticorps anti-VHE et l'ARN du VHE sont 2 marqueurs de l'exposition des porcs au virus de l'hépatite E. Dans les abattoirs, 5 marqueurs ont été analysés : les IgG anti-VHE et l'ARN viral présents dans le sérum, les matières fécales, le foie et la bile. Au total, 243 porcs ont été testés pour tous ces marqueurs. De ceux-ci, 5 porcs (2,1%) sont positifs pour tous les marqueurs, 2 porcs (0,8%) pour 4 marqueurs, 10 porcs (4,1%) pour 3 marqueurs, 19 porcs (7,8%) pour 2 marqueurs et 72 porcs (29,6%) pour 1 marqueur (voir section 4). Les autres (55,1%) sont totalement négatifs pour les 5 marqueurs. Lorsqu'un animal est positif pour 2 marqueurs et plus, on peut affirmer avec plus de certitudes qu'il a été exposé au virus, tandis que ceux positifs pour seulement 1 marqueur sont davantage douteux. Dans notre étude, on a démontré la présence de deux marqueurs d'infection au VHE et plus chez 14,8% des porcs d'abattoirs.

Les travailleurs de l'industrie porcine sont donc exposés significativement au virus de l'hépatite E. Plusieurs types d'expositions sont observés.

Premièrement, la manipulation de la carcasse amène les travailleurs à être en contact avec le sang et les matières fécales. Ensuite, les travailleurs qui ont comme responsabilité l'éviscération de la carcasse peuvent être en contact avec le sang, les matières fécales, les foies et aussi la bile dans les cas où la paroi de la vésicule biliaire est rompue. En général, les postes de travail à l'intérieur des abattoirs peuvent être considérés à risque concernant l'exposition au virus de l'hépatite E porcine. Par contre, les employés responsables du parage des foies et de l'enlèvement de la vésicule biliaire apparaissent particulièrement exposés tout dépendant du nombre de porcs abattus par jour.

Les travailleurs des fermes porcines sont également à risque suite à des contacts avec du sang ou des matières fécales porcines. Comme l'ARN du VHE est détecté à long terme dans les matières fécales suite à une inoculation expérimentale, le virus pourrait être une source de contamination lors de l'utilisation du purin pour l'épandage dans les champs de cultures et pourrait aussi se retrouver dans l'eau de ruissellement. Ceci soulève un risque pour la santé publique. D'autres études quant à la persistance du virus dans l'environnement sont toutefois nécessaires pour mieux analyser ce risque (19,20,36).

5.3 Étude de la caractérisation des souches de VHE mises en évidence pendant l'étude

Les analyses phylogénétiques sont souvent réalisées à la suite de différentes études sur le VHE dans une région donnée (20,48,78,84). Ces analyses permettent de déterminer la variabilité des souches de VHE humain et porcine retrouvées partout dans le monde. Le VHE est divisé en 4 génotypes chez les mammifères et un autre génotype est présent chez les aviaires (28).

5.3.1 Évaluation de la diversité génétique du VHE au Québec

Pour commencer, 50 fragments amplifiés de VHE ont été séquencés, alignés et comparés. De cet alignement, 8 groupes de séquences identiques ont été identifiés. Une séquence de chaque groupe a été conservée pour l'alignement final, en plus de celles qui ne se classaient dans aucun groupe. Au total, 17 séquences ont été analysées en comparaison avec des séquences connues réparties à travers les 4 géotypes et prises dans la banque de séquences *GenBank*. Tous les isolats de l'étude se regroupent avec les autres souches du géotype 3 (voir section 4). Les isolats présentent entre 92 et 100% d'homologie au niveau des nucléotides avec d'autres séquences de VHE retrouvées dans *GenBank*, plus particulièrement les isolats retrouvés au Québec.

Ce géotype est reconnu pour être retrouvé à travers le monde, autant chez l'humain que dans la population porcine (48). Plusieurs études phylogénétiques ont été réalisées suite à des projets de recherche pour évaluer la diversité génétique du VHE dans une région ou un pays (7,17,21,78). La majorité de ces études analysent les séquences de la partie 5' de l'ORF2, reconnu pour sa région conservée à travers les souches porcines et humaines.

Quelques cas d'hépatites virales du VHE chez des patients ont été associés à de la viande ou des foies d'animaux contaminés par le VHE. Dans l'étude de Nishizawa et collaborateurs, une homologie de 100% a été observée au niveau d'une séquence partielle de l'ORF2 dans un isolat de VHE provenant d'un porc japonais et d'un patient japonais (60). Ceci nous permet de ne pas oublier le potentiel zoonotique du VHE.

5.4 Caractérisation du risque associé au virus de l'hépatite E chez le porc

Les résultats de notre étude ont permis d'identifier, de démontrer la présence et de caractériser génétiquement des souches de HEV au Québec. Ils ont aussi permis de démontrer l'exposition au virus pour l'humain, particulièrement pour les travailleurs d'abattoir, même si aucun cas n'a été rapporté au Québec à ce jour. Ces étapes, essentielles à la caractérisation et à l'évaluation du risque soulignent l'importance d'étudier plus à fond, au Québec, les conséquences chez l'homme de cette exposition afin de compléter le processus d'évaluation du risque. D'ici là, sur la base des données obtenues ailleurs indiquant des conséquences sérieuses pour la santé humaine, il convient de considérer des stratégies de gestion du risque. Parmi celles-ci, l'utilisation de vaccins est certes attrayante pour l'humain.

6. CONCLUSION

Les expériences réalisées au cours de ce projet de maîtrise ont permis de compléter les connaissances actuelles reliées à la présence du virus de l'hépatite E chez le porc au Québec et de fournir des données indispensables pour le processus d'évaluation du risque associé à la présence du virus. Les analyses ont permis de confirmer certaines données établies par d'autres chercheurs au sujet de la cinétique virale et d'amener également de nouveaux questionnements à ce sujet. Voici, de façon plus précise, les conclusions de ce projet de recherche :

- L'inoculation de porcelets à partir de la bile d'un porc naturellement infecté permet de suivre l'infection virale dans le temps.
- Les anticorps IgG anti-VHE persistent au moins pendant 120 jours post-inoculation dans le sang. Il y a persistance de l'excrétion virale dans les matières fécales et présence du virus dans le sang, malgré la présence des anticorps IgG.
- Suite à une inoculation du virus chez des porcs, l'ARN viral est présent dans les organes suivants en début d'infection (7 et 14 jours pi) : le foie, la vésicule biliaire, la bile, les ganglions hépatiques, mésentériques et trachéobronchiques, la rate, les reins, le petit et le gros intestin.
- La séroprévalence des anticorps IgG anti-VHE est en moyenne de 26,0% chez les porcs d'abattage, selon l'étude réalisée dans 3 abattoirs de la province de Québec. Elle s'est avérée ponctuellement plus élevée dans une des 2 régions visitées.

- L'ARN de VHE est détecté dans le sérum (10,6%), dans les matières fécales (14,5%), dans le foie (7,4%) et dans la bile (12,9%) de porcs d'abattoir.
- Il y a 14,8% des porcs des abattoirs qui sont positifs pour au moins 2 marqueurs d'exposition virale au VHE.
- Les souches de VHE porcine caractérisées dans ce projet sont toutes regroupées dans le génotype 3. Les isolats de VHE du Québec ont entre 92 et 100% d'homologie avec d'autres séquences de VHE retrouvées dans *GenBank*.
- Les travailleurs de l'industrie porcine peuvent être exposés au VHE lors de la manipulation et de l'éviscération des carcasses à l'abattoir, mais également lors de la manipulation des porcs à la ferme par contacts avec le sang et les matières fécales. Les employés responsables du parage des foies et de l'enlèvement de la vésicule biliaire apparaissent particulièrement exposés.

Perspectives

Suite à la réalisation de ce projet, de nouveaux questionnements s'ajoutent au sujet du virus de l'hépatite E chez le porc. Premièrement, il serait intéressant d'évaluer la séroprévalence du VHE dans la population québécoise et les travailleurs de l'industrie porcine. On pourrait ainsi mieux jauger l'exposition des travailleurs au VHE porcine. Des études au Canada quant à la persistance du virus dans l'environnement sont toutefois nécessaires pour mieux analyser ce risque, comme ça été fait en Espagne (19,20) et aux États-Unis (36).

Par la suite, une évaluation approfondie des sources d'exposition au VHE pour l'homme serait intéressante. Une étude basée sur le suivi des porcs sur une ferme naturellement contaminée par le VHE a déjà été réalisée, mais des analyses plus poussées permettraient d'évaluer aussi l'environnement de la ferme. Des échantillons de sérums et de fèces devraient être analysés pour l'ARN de VHE et une évaluation quantitative de la charge virale pourrait être déterminée par PCR en temps réel. La charge virale infectieuse ne pourrait cependant pas être déterminée précisément. Les organes des porcs pourraient aussi être testés par groupe d'âge, pour avoir une idée plus précise du moment où les porcs sont positifs pour l'ARN de VHE. Les souches canadiennes de terrain pourraient être cultivées *in vitro*, afin d'évaluer leur potentiel infectieux. Il serait également intéressant d'étudier les moyens efficaces de réduire le risque d'exposition au VHE, comme d'évaluer le pouvoir des désinfectants contre le VHE.

Finalement, l'étude de la diversité génétique du VHE dans les autres provinces du Canada pourrait être réalisée. Il serait intéressant de comparer la diversité des souches entre chaque province et de faire une analyse phylogénétique complète. Les sites qui présentent des variations de nucléotides pourraient être analysés plus en profondeur. Des comparaisons avec d'autres souches retrouvées chez les humains et les porcs seraient également nécessaires.

BIBLIOGRAPHIE

1. Aggarwal, R. and K. Krawczynski. 2000. Hepatitis E: an overview and recent advances in clinical and laboratory research. *J.Gastroenterol.Hepatol.* 15:9-20.
2. Anderson, D. A. and I. L. Shrestha. 2002. *Clinical virology. American Society for Microbiology Second Edition*:1-27.
3. Banks, M., R. Bendall, S. Grierson, G. Heath, J. Mitchell, and H. Dalton. 2004. Human and porcine hepatitis E virus strains, United Kingdom. *Emerg.Infect.Dis.* 10:953-955.
4. Bihl, F. and F. Negro. 2008. [New aspects of HEV infection]. *Rev.Med.Suisse* 4:1863-1866.
5. Bouwknecht, M., B. Engel, M. M. Herremans, M. A. Widdowson, H. C. Worm, M. P. Koopmans, K. Frankena, A. M. Husman, M. C. De Jong, and W. H. DER Poel. 2007. Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands. *Epidemiol.Infect.* 1-10.
6. Bouwknecht, M., K. Frankena, S. A. Rutjes, G. J. Wellenberg, A. M. de Roda Husman, W. H. van der Poel, and M. C. De Jong. 2008. Estimation of hepatitis E virus transmission among pigs due to contact-exposure. *Vet.Res.* 39:40.
7. Buisson, Y., M. Grandadam, E. Nicand, P. Cheval, H. van Cuyck-Gandre, B. Innis, P. Rehel, P. Coursaget, R. Teysou, and S. Tsarev. 2000. Identification of a novel hepatitis E virus in Nigeria. *J.Gen.Virol.* 81:903-909.
8. Choi, C. and C. Chae. 2003. Localization of swine hepatitis E virus in liver and extrahepatic tissues from naturally infected pigs by in situ hybridization. *J.Hepatol.* 38:827-832.
9. Clayson, E. T., B. L. Innis, K. S. Myint, S. Narupiti, D. W. Vaughn, S. Giri, P. Ranabhat, and M. P. Shrestha. 1995. Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu Valley of Nepal. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 53:228-232.
10. Clemente-Casares, P., S. Pina, M. Buti, R. Jardi, M. Martin, S. Bofill-Mas, and R. Girones. 2003. Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg.Infect.Dis.* 9:448-454.

11. Dalton, H. R., P. H. Thurairajah, H. J. Fellows, H. S. Hussaini, J. Mitchell, R. Bendall, M. Banks, S. Ijaz, C. G. Teo, and D. F. Levine. 2007. Autochthonous hepatitis E in southwest England. *J.Viral Hepat.* 14:304-309.
12. de Deus, N., C. Seminati, S. Pina, E. Mateu, M. Martin, and J. Segales. 2007. Detection of hepatitis E virus in liver, mesenteric lymph node, serum, bile and faeces of naturally infected pigs affected by different pathological conditions. *Vet.Microbiol.* 119:105-114.
13. Desjarlais, F. 2006. Fiches cliniques: AST, ALT, GGT. *Annales de biologie clinique du Québec* 43:40-43.
14. Drobeniuc, J., M. O. Favorov, C. N. Shapiro, B. P. Bell, E. E. Mast, A. Dadu, D. Culver, P. Iarvoi, B. H. Robertson, and H. S. Margolis. 2001. Hepatitis E virus antibody prevalence among persons who work with swine. *J.Infect.Dis.* 184:1594-1597.
15. Emerson, S. U. and R. H. Purcell. 2003. Hepatitis E virus. *Rev.Med.Virol.* 13:145-154.
16. Engle, R. E., C. Yu, S. U. Emerson, X. J. Meng, and R. H. Purcell. 2002. Hepatitis E virus (HEV) capsid antigens derived from viruses of human and swine origin are equally efficient for detecting anti-HEV by enzyme immunoassay. *J.Clin.Microbiol.* 40:4576-4580.
17. Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng. 2007. Detection and characterization of infectious Hepatitis E virus from commercial pig livers sold in local grocery stores in the USA. *J.Gen.Virol.* 88:912-917.
18. Feagins, A. R., T. Opriessnig, D. K. Guenette, P. G. Halbur, and X. J. Meng. 2008. Inactivation of infectious hepatitis E virus present in commercial pig livers sold in local grocery stores in the United States. *Int.J.Food Microbiol.* 123:32-37.
19. Fernandez-Barredo, S., C. Galiana, A. Garcia, M. T. Gomez-Munoz, S. Vega, M. A. Rodriguez-Iglesias, and M. T. Perez-Gracia. 2007. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs 2. *Can.J.Vet.Res.* 71:236-240.
20. Fernandez-Barredo, S., C. Galiana, A. Garcia, S. Vega, M. T. Gomez, and M. T. Perez-Gracia. 2006. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction. *J.Vet.Diagn.Invest* 18:462-465.

21. Goens, S. D. and M. L. Perdue. 2004. Hepatitis E viruses in humans and animals. *Anim Health Res.Rev.* 5:145-156.
22. Goncales, N. S., J. R. Pinho, R. C. Moreira, C. P. Saraceni, A. M. Spina, R. B. Stucchi, A. D. Filho, L. A. Magna, and F. L. Goncales Junior. 2000. Hepatitis E virus immunoglobulin G antibodies in different populations in Campinas, Brazil. *Clin.Diagn.Lab Immunol.* 7:813-816.
23. Ha, S. K. and C. Chae. 2004. Immunohistochemistry for the detection of swine hepatitis E virus in the liver. *J.Viral Hepat.* 11:263-267.
24. Halbur, P. G., C. Kasorndorkbua, C. Gilbert, D. Guenette, M. B. Potters, R. H. Purcell, S. U. Emerson, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2001. Comparative pathogenesis of infection of pigs with hepatitis E viruses recovered from a pig and a human. *J.Clin.Microbiol.* 39:918-923.
25. Herremans, M., E. Duizer, E. Jusic, and M. P. Koopmans. 2007. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin a in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin.Vaccine Immunol.* 14:276-280.
26. Huang, C. C., D. Nguyen, J. Fernandez, K. Y. Yun, K. E. Fry, D. W. Bradley, A. W. Tam, and G. R. Reyes. 1992. Molecular cloning and sequencing of the Mexico isolate of hepatitis E virus (HEV). *Virology* 191:550-558.
27. Huang, F. F., G. Haqshenas, D. K. Guenette, P. G. Halbur, S. K. Schommer, F. W. Pierson, T. E. Toth, and X. J. Meng. 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.
28. Huang, F. F., G. Haqshenas, H. L. Shivaprasad, D. K. Guenette, P. R. Woolcock, C. T. Larsen, F. W. Pierson, F. Elvinger, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2002. Heterogeneity and seroprevalence of a newly identified avian hepatitis e virus from chickens in the United States. *J.Clin.Microbiol.* 40:4197-4202.
29. Hyams, K. C. 2002. New perspectives on hepatitis E. *Curr.Gastroenterol.Rep.* 4:302-307.
30. Jameel, S. 1999. Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *Expert.Rev.Mol.Med.* 1999:1-16.
31. Jimenez de, O. N., E. Escribano-Romero, A. B. Blazquez, and J. C. Saiz. 2007. [Hepatitis E virus: zoonotic implications]. *Gastroenterol.Hepatol.* 30:408-418.

32. Jothikumar, N., T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. J. Meng, and V. R. Hill. 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J.Virol.Methods* 131:65-71.
33. Kabrane-Lazizi, Y., X. J. Meng, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1999. Evidence that the genomic RNA of hepatitis E virus is capped. *J.Virol.* 73:8848-8850.
34. Kasorndorkbua, C., D. K. Guenette, F. F. Huang, P. J. Thomas, X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2004. Routes of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J.Clin.Microbiol.* 42:5047-5052.
35. Kasorndorkbua, C., P. G. Halbur, P. J. Thomas, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2002. Use of a swine bioassay and a RT-PCR assay to assess the risk of transmission of swine hepatitis E virus in pigs. *J.Virol.Methods* 101:71-78.
36. Kasorndorkbua, C., T. Opriessnig, F. F. Huang, D. K. Guenette, P. J. Thomas, X. J. Meng, and P. G. Halbur. 2005. Infectious swine hepatitis E virus is present in pig manure storage facilities on United States farms, but evidence of water contamination is lacking. *Appl.Environ.Microbiol.* 71:7831-7837.
37. Kasorndorkbua, C., B. J. Thacker, P. G. Halbur, D. K. Guenette, R. M. Buitenwerf, R. L. Royer, and X. J. Meng. 2003. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Can.J.Vet.Res.* 67:303-306.
38. Khuroo, M. S. and S. Kamili. 2003. Aetiology, clinical course and outcome of sporadic acute viral hepatitis in pregnancy. *J.Viral Hepat.* 10:61-69.
39. Khuroo, M. S., S. Kamili, and M. S. Khuroo. 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.* 16:519-523.
40. Krawczynski, K., R. Aggarwal, and S. Kamili. 2000. Hepatitis E. *Infect.Dis.Clin.North Am.* 14:669-687.
41. Kumar, A., M. Beniwal, P. Kar, J. B. Sharma, and N. S. Murthy. 2004. Hepatitis E in pregnancy. *Int.J.Gynaecol.Obstet.* 85:240-244.
42. L'Homme, Y., R. Sansregret, E. Plante-Fortier, A. M. Lamontagne, G. Lacroix, M. Ouardani, J. Deschamps, G. Simard, and C. Simard. 2009. Genetic diversity of porcine Norovirus and Sapovirus: Canada, 2005-

2007

1. *Arch.Virol.* 154:581-593.

43. Leblanc, D., P. Ward, M. J. Gagne, E. Poitras, P. Muller, Y. L. Trottier, C. Simard, and A. Houde. 2007. Presence of hepatitis E virus in a naturally infected swine herd from nursery to slaughter. *Int.J.Food Microbiol.*
44. Lee, Y. H., Y. Ha, K. K. Ahn, and C. Chae. 2008. Localisation of swine hepatitis E virus in experimentally infected pigs. *Vet.J.*
45. Lee, Y. H., Y. Ha, K. K. Ahn, K. D. Cho, B. H. Lee, S. H. Kim, and C. Chae. 2008. Comparison of a new synthetic, peptide-derived, polyclonal antibody-based, immunohistochemical test with in situ hybridisation for the detection of swine hepatitis E virus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Vet.J.*
46. Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda, and T. Miyamura. 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg.Infect.Dis.* 11:1958-1960.
47. Li, X., S. Kamili, and K. Krawczynski. 2006. Quantitative detection of hepatitis E virus RNA and dynamics of viral replication in experimental infection. *J.Viral Hepat.* 13:835-839.
48. Lu, L., C. Li, and C. H. Hagedorn. 2006. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. *Rev.Med.Virol.* 16:5-36.
49. Martella, V., K. Banyai, E. Lorusso, A. L. Bellacicco, N. Decaro, V. Mari, L. Saif, V. Costantini, G. S. De, G. Pezzotti, A. Lavazza, and C. Buonavoglia. 2008. Genetic heterogeneity of porcine enteric caliciviruses identified from diarrhoeic piglets. *Virus Genes* 36:365-373.
50. Masuda, J., K. Yano, Y. Tamada, Y. Takii, M. Ito, K. Omagari, and S. Kohno. 2005. Acute hepatitis E of a man who consumed wild boar meat prior to the onset of illness in Nagasaki, Japan. *Hepatol.Res.* 31:178-183.
51. Matsubayashi, K., J. H. Kang, H. Sakata, K. Takahashi, M. Shindo, M. Kato, S. Sato, T. Kato, H. Nishimori, K. Tsuji, H. Maguchi, J. Yoshida, H. Maekubo, S. Mishiro, and H. Ikeda. 2008. A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route. *Transfusion* 48:1368-1375.

52. Matsubayashi, K., Y. Nagaoka, H. Sakata, S. Sato, K. Fukai, T. Kato, K. Takahashi, S. Mishiro, M. Imai, N. Takeda, and H. Ikeda. 2004. Transfusion-transmitted hepatitis E caused by apparently indigenous hepatitis E virus strain in Hokkaido, Japan. *Transfusion* 44:934-940.
53. Mayo, M. A. 2005. Changes to virus taxonomy 2004. *Arch.Virol.* 150:189-198.
54. Meng, X. J. 2009. Hepatitis E virus: Animal reservoirs and zoonotic risk 1. *Vet.Microbiol.*
55. Meng, X. J., S. Dea, R. E. Engle, R. Friendship, Y. S. Lyoo, T. Sirinarumitr, K. Uairong, D. Wang, D. Wong, D. Yoo, Y. Zhang, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1999. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in pigs from countries where hepatitis E is common or is rare in the human population. *J.Med.Virol.* 59:297-302.
56. Meng, X. J., P. G. Halbur, J. S. Haynes, T. S. Tsareva, J. D. Bruna, R. L. Royer, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1998. Experimental infection of pigs with the newly identified swine hepatitis E virus (swine HEV), but not with human strains of HEV. *Arch.Virol.* 143:1405-1415.
57. Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, I. K. Mushahwar, R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 1998. Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus. *J.Virol.* 72:9714-9721.
58. Meng, X. J., R. H. Purcell, P. G. Halbur, J. R. Lehman, D. M. Webb, T. S. Tsareva, J. S. Haynes, B. J. Thacker, and S. U. Emerson. 1997. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 94:9860-9865.
59. Meng, X. J., B. Wiseman, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, R. E. Engle, S. U. Emerson, and R. H. Purcell. 2002. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J.Clin.Microbiol.* 40:117-122.
60. Nishizawa, T., M. Takahashi, H. Mizuo, H. Miyajima, Y. Gotanda, and H. Okamoto. 2003. Characterization of Japanese swine and human hepatitis E virus isolates of genotype IV with 99 % identity over the entire genome. *J.Gen.Virol.* 84:1245-1251.
61. Okamoto, H. 2007. Genetic variability and evolution of hepatitis E virus. *Virus Res.* 127:216-228.

62. Panda, S. K., D. Thakral, and S. Rehman. 2007. Hepatitis E virus. *Rev.Med.Virol.* 17:151-180.
63. Pei, Y. and D. Yoo. 2002. Genetic characterization and sequence heterogeneity of a canadian isolate of Swine hepatitis E virus. *J.Clin.Microbiol.* 40:4021-4029.
64. Preiss, J. C., A. Plentz, E. Engelmann, T. Schneider, W. Jilg, M. Zeitz, and R. Duchmann. 2006. Autochthonous hepatitis E virus infection in Germany with sequence similarities to other European isolates. *Infection* 34:173-175.
65. Schlauder, G. G., G. J. Dawson, J. C. Erker, P. Y. Kwo, M. F. Knigge, D. L. Smalley, J. E. Rosenblatt, S. M. Desai, and I. K. Mushahwar. 1998. The sequence and phylogenetic analysis of a novel hepatitis E virus isolated from a patient with acute hepatitis reported in the United States. *J.Gen.Virol.* 79 (Pt 3):447-456.
66. Schlauder, G. G., S. M. Desai, A. R. Zanetti, N. C. Tassopoulos, and I. K. Mushahwar. 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: evidence for additional genotypes of HEV. *J.Med.Virol.* 57:243-251.
67. Simard, G., Quessy, S., and Simard, C. Experimental infection of swine with a Canadian isolate of hepatitis E virus (HEV). 2009. Ref Type: Unpublished Work
68. Smith, J. L. 2001. A review of hepatitis E virus. *J.Food Prot.* 64:572-586.
69. Sonoda, H., M. Abe, T. Sugimoto, Y. Sato, M. Bando, E. Fukui, H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, and H. Okamoto. 2004. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *J.Clin.Microbiol.* 42:5371-5374.
70. Takahashi, K., J. H. Kang, S. Ohnishi, K. Hino, H. Miyakawa, Y. Miyakawa, H. Maekubo, and S. Mishiro. 2003. Full-length sequences of six hepatitis E virus isolates of genotypes III and IV from patients with sporadic acute or fulminant hepatitis in Japan. *Intervirology* 46:308-318.
71. Takahashi, K., N. Kitajima, N. Abe, and S. Mishiro. 2004. Complete or near-complete nucleotide sequences of hepatitis E virus genome recovered from a wild boar, a deer, and four patients who ate the deer. *Virology* 330:501-505.

72. Tam, A. W., R. White, E. Reed, M. Short, Y. Zhang, T. R. Fuerst, and R. E. Lanford. 1996. In vitro propagation and production of hepatitis E virus from in vivo-infected primary macaque hepatocytes. *Virology* 215:1-9.
73. Tam, A. W., R. White, P. O. Yarbough, B. J. Murphy, C. P. McAtee, R. E. Lanford, and T. R. Fuerst. 1997. In vitro infection and replication of hepatitis E virus in primary cynomolgus macaque hepatocytes. *Virology* 238:94-102.
74. Tanaka, T., M. Takahashi, E. Kusano, and H. Okamoto. 2007. Development and evaluation of an efficient cell-culture system for Hepatitis E virus. *J.Gen.Virol.* 88:903-911.
75. Usmanov, R. K., M. S. Balaian, I. Kazachkov, D. B. Alymbaeva, N. A. Zamiatina, D. I. Dzhumalieva, and O. V. Voronina. 1994. [Further study of experimental hepatitis E in piglets]. *Vopr.Virusol.* 39:208-212.
76. Vitral, C. L., M. A. Pinto, L. L. Lewis-Ximenez, Y. E. Khudyakov, D. R. dos Santos, and A. M. Gaspar. 2005. Serological evidence of hepatitis E virus infection in different animal species from the Southeast of Brazil. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz* 100:117-122.
77. Waar, K., M. M. Herremans, H. Vennema, M. P. Koopmans, and C. A. Benne. 2005. Hepatitis E is a cause of unexplained hepatitis in The Netherlands. *J.Clin.Virol.* 33:145-149.
78. Ward, P., P. Muller, A. Letellier, S. Quessy, C. Simard, Y. L. Trottier, A. Houde, and J. Brassard. 2008. Molecular characterization of hepatitis E virus detected in swine farms in the province of Quebec. *Can.J.Vet.Res.* 72:27-31.
79. Widdowson, M. A., W. J. Jaspers, W. H. van der Poel, F. Verschoor, A. M. de Roda Husman, H. L. Winter, H. L. Zaaijer, and M. Koopmans. 2003. Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands. *Clin.Infect.Dis.* 36:29-33.
80. Williams, T. P., C. Kasorndorkbua, P. G. Halbur, G. Haqshenas, D. K. Guenette, T. E. Toth, and X. J. Meng. 2001. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J.Clin.Microbiol.* 39:3040-3046.
81. Withers, M. R., M. T. Correa, M. Morrow, M. E. Stebbins, J. Seriwatana, W. D. Webster, M. B. Boak, and D. W. Vaughn. 2002. Antibody levels to hepatitis E virus in North Carolina swine workers, non-swine workers, swine, and murids. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 66:384-388.

82. Worm, H. C., G. G. Schlauder, and G. Brandstatter. 2002. Hepatitis E and its emergence in non-endemic areas. *Wien.Klin.Wochenschr.* 114:663-670.
83. Yazaki, Y., H. Mizuo, M. Takahashi, T. Nishizawa, N. Sasaki, Y. Gotanda, and H. Okamoto. 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.* 84:2351-2357.
84. Yoo, D., P. Willson, Y. Pei, M. A. Hayes, A. Deckert, C. E. Dewey, R. M. Friendship, Y. Yoon, M. Gottschalk, C. Yason, and A. Giulivi. 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.* 8:1213-1219.
85. Zaaijer, H. L., E. P. Mauser-Bunschoten, J. H. ten Veen, H. P. Kapprell, M. Kok, H. M. van den Berg, and P. N. Lelie. 1995. Hepatitis E virus antibodies among patients with hemophilia, blood donors, and hepatitis patients. *J.Med.Virol.* 46:244-246.
86. Zafrullah, M., Z. Khursheed, S. Yadav, D. Sahgal, S. Jameel, and F. Ahmad. 2004. Acidic pH enhances structure and structural stability of the capsid protein of hepatitis E virus. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 313:67-73.
87. Zafrullah, M., M. H. Ozdener, R. Kumar, S. K. Panda, and S. Jameel. 1999. Mutational analysis of glycosylation, membrane translocation, and cell surface expression of the hepatitis E virus ORF2 protein. *J.Virol.* 73:4074-4082.
88. Zafrullah, M., M. H. Ozdener, S. K. Panda, and S. Jameel. 1997. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J.Virol.* 71:9045-9053.
89. Zanetti, A. R. and G. J. Dawson. 1994. Hepatitis type E in Italy: a seroepidemiological survey. Study Group of Hepatitis E. *J.Med.Virol.* 42:318-320.
90. Zhang, M., R. H. Purcell, and S. U. Emerson. 2001. Identification of the 5' terminal sequence of the SAR-55 and MEX-14 strains of hepatitis E virus and confirmation that the genome is capped. *J.Med.Virol.* 65:293-295.
91. Zhang, W., Q. Shen, X. Hua, L. Cui, J. Liu, and S. Yang. 2008. The first Chinese porcine sapovirus strain that contributed to an outbreak of gastroenteritis in piglets. *J.Virol.* 82:8239-8240.

92. Zhao, C., Z. Li, B. Yan, T. J. Harrison, X. Guo, F. Zhang, J. Yin, Y. Yan, and Y. Wang. 2007. 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.* 79:1966-1973.