

Apport de la sérologie et de la génomique dans la compréhension de la circulation des Virus zoonotiques hautement pathogènes à l'interface Homme Faune sauvage en République Démocratique du Congo : cas des virus Ebola et Monkeypox

Eddy Kinganda Lusamaki

▶ **To cite this version:**

Eddy Kinganda Lusamaki. Apport de la sérologie et de la génomique dans la compréhension de la circulation des Virus zoonotiques hautement pathogènes à l'interface Homme Faune sauvage en République Démocratique du Congo : cas des virus Ebola et Monkeypox. Médecine humaine et pathologie. Université de Montpellier, 2024. Français. ⟨NNT : 2024UMONT007⟩. ⟨tel-05084805⟩

HAL Id: tel-05084805

https://theses.hal.science/tel-05084805v1

Submitted on 26 May 2025

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



HAL Authorization

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biochimie et Biologie moléculaire (Virologie)

École doctorale : Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche : Recherches Translationnelles sur le VIH et les Maladies Infectieuses
(IRD UMI 233 – INSERM U1175 – Université de Montpellier)

Apport de la sérologie et de la génomique dans la compréhension de la circulation des Virus zoonotiques hautement pathogènes à l'interface Homme Faune sauvage en République Démocratique du Congo : Cas des virus Ebola et Mpox

Présentée par Eddy KINGANDA - LUSAMAKI
Le 19 décembre 2024

Sous la direction de Martine PEETERS et Steve AHUKA - MUNDEKE

Devant le jury composé de

Nathalie Chazal, Professeur des Universités, Université de Montpellier, France	Présidente
Antoine Gessain, Professeur, Institut Pasteur de Paris, France	Rapporteur
Mounerou Salou, Professeur, Université de Lomé, Togo	Rapporteur
François Simon, Professeur émérite, Université de Paris Diderot, France	Examinateur
Steve Ahuka Mundeke, Professeur Ordinaire, Université de Kinshasa, RD Congo	Co-Directeur de thèse
Martine PEETERS, Directeur de Recherche, IRD, Montpellier, France	Directeur de thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Epigraphe

Le hasard n'existe pas, tout ce qu'on attribue au hasard n'est que la somme de notre ignorance !
Vladmir LUBAKU

Le paresseux ne rôtit pas son gibier ; Mais le précieux trésor d'un homme, c'est l'activité.
Proverbes 12 : 27

Remerciements

A Celui en qui je me suis confié, Celui qui donne la force à celui qui est fatigué, Et qui augmente la vigueur de celui qui tombe en défaillance ; par Qui j'ai pris le vol, couru sans me lasser et enfin marché jusqu'au terme de ce travail, au Maître des temps et des circonstances, je rends toute la gloire !

Je tiens particulièrement à remercier le Docteur Martine Peeters, ma directrice de thèse, pour sa disponibilité à diriger ma thèse, son encadrement rigoureux et suivi minutieux à chaque étape de ma formation qui m'ont très positivement marqué à vie ;

Mes remerciements sincères vont également à l'égard du Professeur Steve Ahuka-Mundeke, mon co-directeur de thèse, qui m'a porté de mes débuts en biologie médicale à ce jour, et m'a pourvu d'orientations et conseils de maturité, au -delà de l'encadrement scientifique. A vos côtés j'ai beaucoup appris, et continue d'apprendre, merci infiniment !

Ma reconnaissance va à l'endroit du Professeur Éric Delaporte qui m'a non seulement accueilli dans son unité, mais aussi a accepté de me diriger durant la première moitié de ma thèse en dépit de ses multiples occupations. Vos encouragements et soins à l'égard des membres de l'unité, dont j'ai été bénéficiaire également et particulièrement, ont constitué un véritable socle solide qui m'a permis de travailler en toute quiétude ;

Au Professeur Placide Mbala Kingebeni pour vos encouragements récurrents qui m'ont été plus qu'utiles pour l'accomplissement de ce travail. Vos conseils, votre soutien intellectuel ont contribué à l'enrichir considérablement, et je ne saurai exprimer davantage ma gratitude à votre égard ;

Je suis très honoré par la présence dans ce jury des Professeurs Nathalie Chazal, Antoine Gessain, Mounerou Salou et François Simon, qui ont examiné ce travail et enrichi par leurs

commentaires. Je remercie également le Professeur Charles Kouanfack pour ses observations durant mes comités de suivi individuel. Qu'il me soit permis également de mentionner le Professeur Jean-Jacques Muyembe -Tamfum qui, au-delà d'avoir été invité au jury, représente tant pour la génération des jeunes chercheurs congolais.

Ce travail n'aurait certainement pas vu le jour sans la conjugaison des efforts et compétences des plusieurs personnes. Ainsi donc, à son terme, je me dois d'exprimer ma gratitude et ma reconnaissance à toutes les personnes qui m'ont accompagné de différentes manières dans son cours :

Je remercie premièrement le gouvernement français qui a financé ma formation de thèse, ainsi que Campus France qui l'a géré et m'a accompagné tout au long de ces années de thèse. En plus, je remercie le collège doctoral pour toutes les formations mises à disposition.

Qu'il me soit permis de mentionner également un échantillonnage représentatif de personnes ayant contribué à la rédaction de cette thèse :

- le Professeur Antoine Nkuba, qui a été pour moi non seulement un ainé par ses différentes orientations, mais surtout une famille et source de reconfort ;
- le Directeur A. Stomy Karhemere, le Professeur Mumba, Madame Bénedicte et toute l'administration INRB (dont Papa Franck Bile de triste mémoire…) ;
- le Professeur Edith Nkwembe, maman Elie Pukuta, papa Yogolelo Riziki, maman Elise Muyamuna, Tantine Yvonne, Lionel B., Naomie Mitongo, Frida N., Guylain et toute l'équipe du département de virologie à l'INRB ;
- le Professeur Daniel Mukadi et toute l'équipe de biologie moléculaire et de séquençage du Laboratoire Rodolphe à Goma ;
- le Professeur Octavie Lunguya, le Professeur Mulangu, le Professeur Tony Wawina, le Chef de Travaux Dr Olivier Tshiani, les surperviseurs, collègues assistants séniors et tout le staff du service de microbiologie(Cliniques Universitaires de Kinshasa) ;

- Le staff du Laboratoire des virus émergents : Fabrice Mambu, Meris Matondo, Etienne Ndomba, Junior Bulabula, Elysée Matungulu, … ;
- Les collègues ayant participé aux investigations : François Kasongo, Servet K., Guy Midingi, Emile Malembi, Thierry Kalonji, Sophie Gabia, Simon N.

Ma gratitude va aussi particulièrement à tous les membres du rayonnant et chaleureux laboratoire de TRANSVIHMI, dont Ahidjo Ayouba, Audrey Lacroix, Coralie Sigounios et Julie Pujet, pour l'accueil à Montpellier, accompagnement durant différentes phases de la vie et intégration rapide dans la grande famille que nous constituons avec les autres collègues Nicolas, Nicole, Amandine, Christelle, Laetitia, Jil'lea, Maellis, Julie B., Guillaume, Emilande, Caroline, Almudena, Angèle, Kareline, Néraide, Angelot… ça a été une joie de collaborer ensemble sur différentes activités ;

Une mention spéciale se doit d'être à l'égard du staff dynamique de la Biobanque et du Laboratoire génomique des pathogènes de l'INRB en général, et en particulier des collègues Amuri Aziza (Biaz), Francisca Muyembe, Jean-Claude M., Emmanuel, Gradi L., Princesse P., Raphael L., Gabriel K., Fiston C., Nelson K., Ange, Prince Akil, Zadoc, Sifa, André, Grace, Gisèle, Elzedek et plusieurs autres non cités (Biobanque, laboratoire, équipe data) qui, quoique loin, étaient bel et bien présent et disponibles pour nous accompagner dans la réalisation du dit travail.

Je remercie également tous les autres partenaires, réseaux et consortia tant nationaux qu'internationaux, qui accompagnent l'INRB dans la réponse aux émergences qui constitue le cadre de ce travail, et je puis mentionner spécifiquement le consortium Andemia (Fabian L., Grit S., Matthias B., Essia B.,…), le projet Ebosursy, Africa CDC, le consortium AFROSCREEN, le projet BIODIVERSA, le projet PANAFPOX, les études PALM (NIH-NIAD), l'IMT (projet MBOTE), le CDC-Atlanta, l'OMS, ImReC, UCLA-RDC, le groupe

ARTIC (Nick Loman, Josh Quick et Andrew Rambaut), BIOSURV international (Catherine Pratt), Edyth Parker, CZID, l'UNMC, le PNLMPXFHV, le PNLCD et le groupe SANDIA.

A mes pasteurs : Kasongo Banza Meso, Christian Mpengele, Lylliane Ngoli, Steave Makele et Vladmir Lubaku, vos prières et encouragements étaient pour moi un précieux réconfort ;

A ma famille spirituelle de la RD Congo : G-l'or Sabu, Simonet B., Olivier W., Placide K., Joel Sussa, Lebon T., Smith M., Egogé N., Patrick et Bénédicte E., le CCE, l'APJ Kinshasa et la Chorale Conservatoire, merci pour votre soutien morale et spirituel ;

A ma famille spirituelle de Montpelier : Urbain et Kate Moussavou, Carine et Marc, tantine Hadassa Nehema ainsi que toute la famille d'Impact de l'Ecusson, ainsi que tout ICC Montpelier, merci pour tout !

A mes parents : Job Lusamaki Kalobia et Suzanne Mbubu Watangabo, beaux -parents Flamboyant Ngoie et Esther Miji Pezu ; ainsi que mes frères et sœurs : Ya Willy Omari, Ya Nelly Mulumba, Ya Jolie, Ya Kabo, Ya Freddy, Naomie, Ya Clémentine, Ya Delphin, Ya Randy et Angélique, Ya Wanga et Gracia Wamenia, Oracle et Windridge sans oublier tous mes autres précieux neveux et nièces (Axel, Samuel, Eminence, Moïse, Florence,…) trouver ici l'expression de ma grande reconnaissance.

A ma bien aimée et tendre épouse Liège Lebeni, ma baïtello et pupille prophétique, tes conseils et ton implication dans ce travail font de toi autant auteur que moi, au-delà du régime conceptuel de la communauté des biens par lequel nous sommes liés.

Derechef, je rends grace à Dieu et prie qu'il rétribue chaque personne ayant participé de près ou de loin, au-delà de ses attentes imaginables et concevables.

Table des matières

Epigraphe i

Remerciements I

Table des matières V

Liste des figures XII

Liste des tableaux XIX

Résumé XXI

Summary XXIII

Introduction Générale 1

Revue de la littérature 9

Chapitre 1 : Maladie à virus Ebola 10

1.1. Virologie 11

1.1.1. Taxonomie et nomenclature 11

1.1.2. Morphologie du virus et organisation du génome des filovirus 13

1.1.3. Sensibilité aux agents physiques et chimiques 23

1.1.4. Réplication Virale 23

1.2. Historique, épidémies et risque pandémique 25

1.3. Evolution du virus Ebola 32

1.3.1. Taux de mutation 32

1.3.2. Taux d'évolution 32

1.3.3. Taux de substitution de nucléotide 33

1.3.4. Taux de fixation 33

1.4. Réservoir animal 34

1.4.1. Role de chiroptères 34

1.4.2. Rôle des Primates non-humains 36

1.4.3. Rôle des céphalophes et autres viandes de brousse 37

1.4.4. Rôle d'autres espèces 38

1.5. Transmission 38
1.6. Pouvoir pathogène des virus Ebola et pathogénèse de la MVE 41
1.7. Lésions histopathologiques et rôle des macrophages 44
1.8. Profil clinique et biologique 46
1.8.1. Présentation clinique 46
1.8.2. Evolution des tableaux cliniques au fil des épidémies 48
1.8.3. Profil biologique 49
1.8.4. Surveillance et facteurs de gravité 49
1.8.5. Persistance du virus chez les personnes guéries 51
1.9. Détection et confirmation de laboratoire 52
1.9.1. Culture virale 52
1.9.2. Immunochromatographie et tests rapides 53
1.9.3. Sérologie 54
1.9.4. Immunohistochimie 54
1.9.5. Réaction en chaîne par polymérase à transcription inverse (RT-PCR) 54
1.10. Prise en charge 55
1.10.1. Mesures générales de prévention 56
1.10.2. Vaccination 56
1.10.3. Traitement 62
Chapitre 2 : De l'Emergence du Mpox aux urgences de santé publique de portée internationale (USPPI) 65
2.1. De la découverte au premier cas humain 66
2.2. Virologie 68
2.2.1 Taxonomie des Orthopoxvirus 68
2.2.2. Structure et morphologie des orthopoxvirus et du MPXV 73
2.2.3. Structure génomique des poxvirus, des orthopoxvirus et du MPXV 75
2.2.4. Réplication virale 80
2.2.5. Diversité phylogénomique et dynamique des clades du MPXV 82
2.2.6. Différences génomiques entre clades I et II du MPXV 85
2.2.7. Evolution des poxvirus 87
2.3. Hôtes et réservoir des poxvirus 90

2.4. Transmission du MPXV 94
2.5. Epidémiologie et risque pandémique : épidémie globale 97
2.6. Diagnostic clinique 111
2.7. Diagnostic différentiel 118
2.8. Diagnostic virologique et profil biologique 119
2.9. Prise en charge 134
Travaux de thèse 140
Travaux de thèse (plan) 141
Contexte, justification et objectifs de thèse 142
1. Contexte et justification 142
a. Situation géographique et démographique 142
b. Situation politique et économique 144
c. Fonctionnement du système sanitaire 145
d. RDC : Terre des émergences, cas de la maladie à virus Ebola (MVE) et du mpox 146
2. Objectifs 151
3. Contribution personnelle et impact global 152
3.1. Contribution dans les travaux de thèse 152
3.2. Impact sur la riposte globale 155
Partie I : Séroprévalence et caractérisation moléculaire du mpox en RDC 157
Chapitre 1 : Utilisation de la sérologie mpox dans les investigations de cas et d'épidémies de mpox 160
a. Résumé : 160
b. Article, Pathogens, 2023. 162
Abstract 163
1. Introduction 164
2. Materials and Methods 166
3. Results 170
4. Discussion 179

5. Conclusions 182
References 186
Supplementary materials 189

Chapitre 2 : Cas de mpox clade I, associés à des contacts sexuels dans la province de Kwango, République démocratique du Congo 197

a. Résumé : 197

b. Dispatch, Emerging Infectious Diseases, 2024 199
Abstract 201
1. Introduction : 201
2. The Study : 202
3. Conclusions : 205
References 207

Chapitre 3 : Co-circulation du mpox et du swinepox dans la province de Tshuapa 209

3.1. Résumé : 209

3.2. Dispatch, Emerging Infectious Diseases, 2024 210
Abstract 211
1. Background 212
2. The Study 213
3. Conclusion 217
References 219

Chapitre 4: Presumed Transmission of 2 Distinct Monkeypox Virus Variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo 221

a. Résumé : 221

b. Dispatch, Emerging infectious Diseases, 2024 222
Abstract 225
1. Introduction 225
2. The study 226
3. Conclusion 232
References 234

Chapitre 5: Sustained Human Outbreak of a New MPXV Clade I Lineage in the Eastern Democratic Republic of the Congo 235

5.1. Résumé : 235

5.2. Article en communication brève, Nature Medecine, 2024 237

Abstract 241

1. Main 241

2. Online Methods 249

References 256

Supplementary information 259

Chapitre 6 : Premiers cas importés de MPXV Clade Ib à Goma, en République démocratique du Congo : implications pour la surveillance mondiale et la dynamique de transmission 268

6.1. Résumé 268

6.2. Article, preprint MedRix, 2024 269

Abstract 271

1. Introduction 272

2. Materials and Methods 274

3. Results 276

4. Discussion 284

References 287

Chapitre 7 : Co-circulation des sous-clades Ia et Ib du MPXV dans la province de Kinshasa, République démocratique du Congo, de juillet à août 2024 289

7.1. Résumé 289

7.2. Communication rapide, EuroSurveillance, 2024. 290

Abstract 292

1. Introduction 292

2. Mpox case sample collection, laboratory processing and bioinformatic analyses 293

3. Description of cases 294

4. Phylogenetic analysis of monkeypox virus strains affecting the cases 296

5. Discussion 297

Conclusion 299

References 301

Chapitre 8 : Caractérisation moléculaire du Monkeypoxvirus en RDC de 2018 à 2024 303

8.1. Résumé 303

8.2. Article, Cell, 2024 305
Summary 307
1. Introduction 308
2. Results 310
3. Discussion 319
4. Star Methods 324
Supplemental materials 329

Partie II : Récentes émergences zoonotiques de la MVE en Equateur (RDC) 351

Chapitre 1 : 2020 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterisations 352

1.1. Résumé 352

1.2. Article, Lancet Microbe, 2024 354
Summary: 356
1. Introduction 359
2. Methods: 361
3. Results: 364
4. Discussion: 372
References: 376
Figure legends 378
Supplemental material 380

Discussion générale et conclusion 392

1. La sérologie en contexte épidémique liée aux maladies émergentes 394
1.1 Discussion des résultats 394
1.2 Application en accompagnements aux investigations épidémiques 396
1.3 Perspectives : beaucoup reste à faire pour la sérologie 396

2. Apport de la génomique dans la gestion des épidémies 397
a. Evolution épidémiologique et génomique du mpox en RDC 397
b. Perspecives sur la surveillance du mpox pendant et après USPPI 404
c. Surveillance génomique dans les épidémies de MVE 405

3. Perspective recurrente : Importance de l'approche One Health 406

4. Conclusion 407

Valorisation des travaux de thèse 408

Autres publications 410

Références bibliographiques 413

Liste des figures

Figure 1 : Illustration du poids épidémique à l'échelle globale de 2011-2017, adaptée de (WHO, 2018b)..... 3

Figure 2 : Distribution spatio-temporelle des séquences publiées dans Genbank..... 10

Figure 3 : Phylogénie par maximum de vraisemblance (racine médiane) des filovirus construite à partir des génomes complets (ou quasi) des filovirus..... 13

Figure 4 : Forme filamenteuse caractéristique des filovirus visible sur cette photographie libre de droits de Cynthia Goldsmith et Pierre Rollin/CDC, Atlanta, USA 14

Figure 5 : Représentation schématique du virus Ebola adaptée de viralzone.org..... 15

Figure 6 : Architecture globale du génome des différents genres dans la famille des filoviridae adaptée de Biedenkopf et al. (Biedenkopf et al., 2024)..... 16

Figure 7 : Représentation schématique du génome du virus Ebola montrant les différents gènes adaptée de Bodmer et al.(Bodmer et al., 2024) et viral zone 17

Figure 8 : Expression de la glycoprotéine (GP) virale adaptée de (Jain et al., 2021). 18

Figure 9 : représentation schématique simple des différentes étapes du cycle de vie du EBOV adapté de (Jain et al., 2021)..... 24

Figure 10 : Lieux d'émergence du virus Ebola 1976-2022 28

Figure 11 : Transmission et étapes d'évolution vers une épidémie de la maladie à virus Ebola adaptée de (Feldmann et al., 2020)..... 41

Figure 12 : Phases cliniques, cinétique des marqueurs et apparition des complications adapté de (Jacob et al., 2020)..... 50

Figure 13 : Distribution spatio-temporelle des séquences publiées sur la Genbank 66

Figure 14 : Taxonomie des chordopovirinae et orthopoxvirus adaptée de https://ictv.global/taxonomy/visual-browser..... 71

Figure 15 : Relations phylogénétiques dans le genre Orthopoxvirius, avec des virus représentatifs appartenant à des espèces du genre Orthopoxvirus, adaptée de https://ictv.global/report/chapter/poxviridae/poxviridae. 73

Figure 16 : Représentation schématique d'une particule de poxvirus (créée avec Biorender.com) 74

Figure 17 : Taille des génomes de référence de 57 poxvirus avec séquences complètes disponibles sur Genbank (NCBI), figure créée avec geneious. 75

Figure 18 : Représentation schématique de la souche NC_063383 (clade II) adapté de https://viralzone.expasy.org/9959 77

Figure 19 : Représentation schématique de la souche Zaire-96-I-16 (MPXV-ZAI) NC_003310 (clade I) isolée durant l'épidémie de 1996 en RDC obtenue par courtoisie de Lebeni Liège et adaptée de (Sklenovská, 2020) 78

Figure 20 : Cycle de réplication virale des Orthopoxvirus créée par Biorender.com (image obtenue par courtoisie auprès de Lebeni Liège) 81

Figure 21 : Arbre phylogénétique montrant le regroupement des clades. 84

Figure 22 : Voie de transmission des poxvirus entre différents hôtes adapté de (Yang et al., 2024) 93

Figure 23 : Emergence et transmission du virus dans la faune, zone rurale et zone urbaine .. 96

Figure 24 : MPXV clades détectés globalement incluant les cas de 29 septembre 2024 (WHO, 2024a) 109

Figure 25 : Evolution annuelle des notifications des cas suspects de mpox en RDC de 1970 à novembre 2024 (mise à jour au 16 novembre 2024) 110

Figure 26 : Adénopathie latéro cervicale gauche ayant évolué vers une abcédation et fistulisation 112

Figure 27 : atteintes du Mpox aux des muqueuses buccales (langues, faces internes des joues et vermillon) A gauche : lésions vésiculo-papuleuses associées à de dépôts fibrineux

blanchâtres au-dessus et en-dessous de la langue chez un patient de 10 ans au 15ième jour d'infection (après début des symptômes), traité à domicile, au Mai-Ndombe, RDC 113

Figure 28 : nombreuses lésions (au-delà de 250): lésions ulcéreuses suintantes, papulo-ulcéreuse à nécrotiques..... 115

Figure 29 : Manifestations cliniques du Mpox et organes atteints (image de courtoisie créée avec biorender.com par Lebeni Liège)..... 116

Figure 30 : atteintes occulaires chez des patients mpox..... 117

Figure 31 : cinétique des marqueurs du mpox adapté de (Sklenovská, 2020) 119

Figure 33 : Approches et stratégies dans le séquençage du génome entier du MPXV 127

Figure 34 : Sites d'actions des thérapies antivirales dans le cycle de réplication des orthopoxvirus (image obtenue par courtoisie auprès de Lebeni Liège) 138

Figure 35 : Carte administrative de 26 provinces de la RDC avec les pays limitrophes. 143

Figure 36 : Graphique representant les nombres de publications sur pubmed mentionnant les mots cles « Monkeypoxvirus » Et « Ebola »..... 149

Figure 37 : MFI distribution per peptide for mpox PCR negative (blue) and positive (red) samples. 175

Figure 38 : (**A**) Phylogenetic tree based on complete genomes built by maximum likelihood using the GTR+G model. Clade II sequences are used as outgroup. (**B**) Subtree highlighting the newly identified monkeypox strain in Masimanimba in red and sequences in blue are from animals. Roman numbers indicate previously described MPXV lineages [31], each MPXV lineage is highlighted in a different color..... 178

Figure 39 : :workflow of the mpox Surveillance Algorithm in DRC 189

Figure 40 :Areas Under Curve (AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) curves per peptid summarizing the performances of the assay for each peptid. 190

Figure 41 : Areas Under curve(AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) curves per protein summarizing their performances. 191

Figure 42 : Graph bars showing the percentage of samples analyzed in this study (dark grey bar) of the total number of samples tested for mpox per year at INRB (light grey bar). The absolute number of samples included in the study or received at the INRB each year is displayed in the dark grey area and light grey area, respectively. The numbers displayed in the blue areas (upper graph) or yellow areas (lower graph) correspond to the total number of positive samples analyzed each year by PCR or serology, respectively 192

Figure 43 : Map of DRC Map showing the number of clinical mpox suspected samples tested by province and proportions of samples confirmed by PCR only (yellow), serology only (blue) and samples positive by serology and PCR (green) 193

Figure 44 : DRC map representing health zones in which outbreaks were not detected by PCR with serology evidence of mpox circulation(yellow) and health zones where originated mpox positive cases by PCR(blue triangle) or Serology (red asterisk fill) 194

Figure 45: Masimanimba Health zone in the Kwilu Province and main events around the first mpox confirmed case 195

Figure 46 : Penile lesions or papules associated with clade I MPXV infection. 203

Figure 47 : Phylogenetic analysis of MPXV sequences from the mpox cases described in Kwango Province, DRC. 205

Figure 48 : Phylogenetic analysis of swinepox virus 215

Figure 49 : Animals with mpox-like lesions in study of co-circulating monkeypox and swinepox viruses, Democratic Republic of the Congo, 2022. 216

Figure 50 : :Possible transmission route of monkeypox virus between Bangui, Central African Republic, and Mbaya Health Zone, South Ubangi Province, Democratic Republic of the Congo, January 2023. 227

Figure 51 : Possible transmission chain of monkeypox virus from CAR to the DRC and second identified chain at Mbaya General Reference Hospital, Mbaya, DRC. CAR, Central

African Republic; DRC, Democratic Republic of the Congo; HCW, healthcare workers; HZ, health zone. Created with BioRender.com. 228

Figure 52 : Clinical manifestations of suspected mpox from 2 mother-child pairs in study of presumed transmission of monkeypox virus variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo. One mother-child pair was linked to the deceased fisherman in Mbaya Health Zone, and the other pair were identified at Mbaya Hospital, Mbaya, Democratic Republic of the Congo. Created with BioRender.com. 229

Figure 53 : Phylogenetic analysis of monkeypox virus (MPXV) sequences from Mbaya Health Zone in study of presumed transmission of MPXV variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo. 231

Figure 54 : Mpox genomic surveillance in DRC in 2024 243

Figure 55 : A) Epidemiologic curve of Kamituga mpox outbreak (October 2023 to March 2024), Democratic Republic of the Congo; B) Counts of suspected mpox cases disaggregated by age and sex (Male in blue; Female in pink). 245

Figure 56 : maximum likelihood phylogeny using IQTREE2, including all high quality MPXV Clade I genome sequences available on GenBank 259

Figure 57 : maximum patristic distance in the maximum likelihood phylogeny 260

Figure 58 : Geographic locations of cases identified in North Kivu including Mudja displacement camp. Map constructed using QGIS3.22.11. 276

Figure 59 : Epidemiological linkages and suspected transmission chains among Clade Ib mpox cases identified in Goma, North Kivu, DRC. Transmission chain at the Division Provincial de la Santé (DPS), North Kivu..... 278

Figure 60 : A maximum likelihood tree constructed using IQ-Tree 2 (19) with the HKY substitution model (23). We included a Clade Ia genome as an outgroup and then removed it after rooting. Single nucleotide mutations are reconstructed and displayed denoting whether they are APOBEC3-mediated (red bars) or other mutations (blue bars). Genomes from recent

cases in Goma, North Kivu are denoted with yellow circles. Patients 1 and 2 each have multiple genomes sequenced from different samples. Blue circles are genomes from Kamituga, South Kivu from October and December 2023, and January 2024. Letters in parentheses are referenced in **Tableau 21** 281

Figure 61 : Geographic distribution of mpox confirmed cases, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, July–August 2024 (n = 11 cases) 295

Figure 62 : Phylogenetic tree of MPXV sequences (highlighted in blue) from confirmed cases of mpox, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, July–August 2024 (n = 11 cases).. 297

Figure 63 : Maps with number of monkeypox virus (MPXV) samples sequenced per province between 2018 and March 2024 and in the different health zones (HZ) per province. 311

Figure 64 : Phylogenetic tree analysis of newly obtained monkeypox virus (MPXV) strains and the geographical location of the different subclades and Clade Ia groups and period of sample collection. 315

Figure 65 : Phylogenetic trees showing examples of health zones where multiple monkeypox virus (MPXV) strains cocirculate in the same time period suggesting multiple introductions of viral strains. 317

Figure 66 : Scatterplot of genome called coverage versus PCR Cycle threshold, related to Results and STAR Methods 329

Figure 67 : Maximum likelihood tree generated with genomes colored by provinces, related to **Tableau 23** and STAR Methods 330

Figure 68 : APOBEC3 analysis on overall genomes covered above 70%, related to **Tableau 24** and STAR Methods 331

Figure 69 : Ebola virus outbreaks in the Democratic Republic of the Congo, 1976–2022... 360

Figure 70 : Demographics of EVD cases during the 2020 Équateur Province outbreak 364

Figure 71 : Social networks using interviews and contact tracing from the Équateur Province outbreak 366

Figure 72 : Ebola virus variants circulating during the 2020 Équateur Province outbreak .. 369

Figure 73 : Combining epidemiological and phylogenetic networks highlights unique details from the Equateur outbreak**.** 371

Figure 74 : Distribution of EVD cases by week of symptom onset (x-axis), health area (y-axis) and age distribution (z-axis, and stacked bars). 389

Figure 75 : Inferred evolutionary relationships for the Zaire ebolavirus species. Genomes from historic EBOV outbreaks (n=837) and the Equateur outbreak (n=87) are included in the midpoint-rooted maximum likelihood tree. 390

Figure 76 : Comprehensive overview of Equateur outbreak incorporating all available epidemiological data and genetic data..... 391

Figure 77 : Mis à jour de l'analyse phylogéographique au 10 octobre 2024 montrant 1078 MPXV clade I (nextstrain.org)..... 403

Figure 78 : phylogénie par maximum de vraissemblance intégrant les souches de 15 épidémies de MVE 405

Liste des tableaux

Tableau 1 *:* Liste des déclarations d'urgence de santé publique de portée internationale (USPPI) 4

Tableau 2 : Dernière mise à jour de la taxonomie des Filoviridae (Biedenkopf et al., 2023) 12

Tableau 3 : Gènes des orthoebolavirus avec les caractéristiques et fonctions des protéines qu'elles expriment (Biedenkopf et al., 2024; Jain et al., 2021)..... 21

Tableau 4 : Historique des épidémies importantes d'Ebola 1976-2023 adapté de (CDC, 2024a; Dembek et al., 2024; Judson & Munster, 2023)..... 29

Tableau 5 : Vue d'ensemble de principaux vaccins avec approbations..... 61

Tableau 6 : Résultats des études d'essai clinique des thérapies anti-Ebola 64

Tableau 7 : Facteur de croissance d'orthopoxvirus et gènes d'évasion immunitaire adapté de (S. N. Shchelkunov et al., 2002) 79

Tableau 8 : Les gènes d'intéraction avec hôtes de cinq poxvirus typiques sélectionnés. 89

Tableau 9 : Evènements de transmission interespèce rapportée adapté de (Yang et al., 2024) 94

Tableau 10 : Evolution des lésions cutanées (adaptée de https://www.cdc.gov/mpox/hcp/clinical-signs/index.html) 114

Tableau 11 : Stratégies diagnostiques innovantes en développement adapté de (Arunagiri et al., 2024)..... 128

Tableau 12 : Exemples de tests moléculaires publiés utilisé pour la détection MPXV avec spectre de virus ciblés (ou des Orthopoxvirus)(Zhou & Chen, 2023)..... 130

Tableau 13. Characteristics of patients and samples included in this study. 172

Tableau 14 : Serological results against the different peptides and peptide combinations... 173

Tableau 15 : Characteristics of patients and samples per serological results 196

Tableau 16 : Clinical and demographic characteristics of mpox suspected and confirmed cases 261

Tableau 17 : Previously published MPXV genomes used in this study with NCBI Genbank accession number (Accession), country of origin (Country), top level administration region (Admin 1), date of sample collection to highest known precision (Date), reference for the genome sequence (Genome Reference), and reference for case description were available (Case Reference). 263

Tableau 18 : NCBI Genbank accession number (Accession) for sequences generated during this study 265

Tableau 19 : Reconstructed Mutations in Outbreak Genomes..... 267

Tableau 20 : Demographic and clinical symptom data for mpox cases identified in Goma to date. Column percentages are presented in parentheses. 280

Tableau 21 : List of mutations in the 2023-2024 DRC mpox outbreak. 283

Tableau 22 : Cq values obtained by a PCR with MPXV-generic primers and genome coverage of MPXV genomes derived from samples of mpox cases, Democratic Republic of the Congo, July–August 2024 (n = 12 samples) [a] 296

Tableau 23 : Demographic characteristics of mpox patients with viruses sequenced 312

Tableau 24 : APOBEC3 and other mutations in monkeypox virus (MPXV) subclades Ia and Ib and in the different groups of subclade Ia. 318

Tableau 25 : Previously published mpxv genomes used in the phylogenetic analysis as contextual genomes with ncbi genbank accession number (accession) and related information 333

Tableau 26 : List of SNPs and AA changes within main clades and clusters..... 338

Tableau 27 : Summary of Epidemiological Links and Transmission Types from Patient-reported data and Case Report Forms 367

Tableau 28 : List of Equateur-specific EBOV amplicon-based NGS primers..... 381

Tableau 29 : Summary of Bayesian Model Fitting Estimates..... 384

Tableau 30 : Summary of Sequencing Results and Metadata..... 385

Résumé

Les maladies infectieuses émergentes en général et celles zoonotiques d'origine virale en particulier, connaissent une accélération dans la fréquence des épidémies et pandémies. Cette augmentation de la fréquence des épidémies est sans doute exacerbée par les activités anthropocéniques. Ainsi, entre 2005 et 2024, l'Organisation Mondiale de la Santé a été amenée à élever au niveau maximal son alerte en déclarant près 8 fois l'urgence de santé publique de portée internationale (USPPI). La dernière en cours a été déclaré pour le mpox le 14 août 2024. Par cette déclaration, le mpox a rejoint la maladie à virus Ebola, une autre zoonose à fort potentiel épidémique, dans le lot des émergences ayant conduit 2 fois à la déclaration d'USPPI.

Ces deux maladies partagent plusieurs points communs incluant leur origine virale, les premières détections humaines en République Démocratique du Congo (entre1970 – 1980), leur réservoir non élucidé à ce jour et les défis majeurs dans leur diagnostic et thérapeutique, surtout aux lieux d'émergence. Ces maladies imposent en tout lieu où ils émergent un contrôle rapide afin de sécuriser les communautés locales et épargner les systèmes globaux des crises multiformes à l'instar de celles occasionnées par la covid-19. Le contrôle efficace passe par la capacité à détecter et caractériser l'agent pathogène

Pour mpox, nous avons dans un premier temps mis au point un test sérologique multiplex et avons intégré la sérologie dans les investigations des épidémies à l'instar de celle de Masimanimba dans le Kwilu. En plus, l'enquête rétrospective nous a permis de démontrer que plusieurs épidémies passeraient probablement inaperçus. Ensuite, face au nombre de cas croissant de mpox, le séquençage à haut débit a été intégré en plus des investigations épidémiologiques. Ainsi, nous avons pu caractériser le clade Ia, circulant majoritairement dans

le pays. Nous avons décrit des cas associés à la transmission sexuelle dans la province du Kwango, une co-circulation avec le Swinepox à la Tshuapa, un contexte proprice à la transmission transfrontalière autour de la rivière Ubangi et des introductions dans les zones urbaines telles les villes de Kisangani ou Kinshasa. En outre, nous avons documenté l'émergence de l'épidémie liée au clade Ib dans la zone de santé de Kamituga à l'Est du pays, montrant plus de signaux moléculaires d'adaptation à l'homme, et qui a rapidement gagné les villes de Bukavu, Goma et Kinshasa. Ce double paradigme, d'une part le clade Ia lié aux transmissions zoonotiques (interespèces) de façon prédominante, et d'autre part le clade Ib caractérisé par une transmission interhumaine soutenue pourrait évoluer, surtout à cause des corcirculations clade Ia et clade Ib, tel qu'à Kinshasa.

Pour l'épidémie Ebola de l'Équateur en 2020, l'utilisation de la génomique a permis de détecter la cocirculation de 2 variants, à savoir celui responsable de la déclaration de l'épidémie de 2020 et celui ayant circulé en 2018 (9ème épidémie MVE, souche Tumba). Une vue plus globale de l'épidémie a pu être obtenue malgré que toutes les chaines de transmission n'aient pas été élucidées.

Ainsi, les lumières issues des réponses à quelques -unes des observations relatives aux épidémies de mpox et de la maladie à virus Ebola, révèlent d'autres mystères à explorer en vue d'anticiper les problèmes sanitaires que ces menaces pourraient engendrer à tout moment. Nos résultats de thèse démontrent encore combien cruciale est l'intégration de l'approche « Une Seule Santé » associant plusieurs disciplines pour aborder les défis sanitaires posés par les zoonoses plus difficiles à éradiquer.

Summary

Emerging infectious diseases in general, and zoonotic diseases of viral origin in particular, are experiencing an acceleration in the frequency of epidemics and pandemics. This increase in the frequency of epidemics is undoubtedly exacerbated by anthropocenic activities. Thus, between 2005 and 2024, the World Health Organization was led to raise its alert to the maximum level by declaring a Public Health Emergency of International Concern (PHEIC) nearly 8 times. The last one in progress was declared for mpox on August 14, 2024. With this declaration, mpox joined the Ebola virus disease, another zoonosis with high epidemic potential, in the batch of emergences that led to the declaration of PHEIC twice.

These two diseases share several common points including their viral origin, the first detections in humans in the Democratic Republic of Congo (between 1970 and 1980), their reservoir not yet elucidated and the major challenges in their diagnosis and treatment, especially at the places of emergence. They also require rapid control wherever they emerge in order to secure local communities and spare global systems from multifaceted crises such as those caused by covid-19. Effective control requires the ability to detect and characterize the pathogen

For mpox, we have developed a serological test and have integrated multiplex serology into the investigation of epidemics such as the one in Masimanimba. We also carried out a retrospective survey on serum samples, which allowed us to increase the positivity rate by 14.5%, when PCR and/or seropositivity are considered for the detection of positive mpox cases, demonstrating that several epidemics would probably go unnoticed. In addition, in the face of the growing number of mpox cases, high-throughput sequencing has been integrated in addition to epidemiological investigations. Thus, we were able to characterize clade Ia, which circulates

mainly in the country. We have described cases associated with sexual transmission in Kwango province, co-circulation with Swinepox in Tshuapa, a proprice context for cross-border transmission around the Ubangi River and introductions in urban areas such as the cities of Kisangani or Kinshasa. In addition, we documented the emergence of the Clade Ib-related outbreak in the Kamituga Health Zone in the east of the country, showing more molecular signals of adaptation to humans, and which quickly spread to the cities of Bukavu, Goma and Kinshasa. This dual paradigm, on the one hand clade Ia linked to zoonotic (interspecies) transmissions in a predominant way, and on the other hand clade Ib characterized by sustained human-to-human transmission could evolve, especially because of clade Ia and clade Ib corcirculations, as in Kinshasa.

For the Ebola epidemic in the Equateur Province in 2020, the use of genomics allowed to detect the co-circulation of two variants, namely the one responsible for the declaration of the 2020 epidemic and the one that circulated in 2018 (9th EVD epidemic, Tumba strain). Overall, a more global view of the epidemic has been obtained despite the fact that not all the transmission chains have been elucidated.

Thus, the insights from the responses to some observations relating to the epidemics of mpox and Ebola virus disease, reveal other mysteries to be explored in order to anticipate the health problems that these threats could cause at any time. Our thesis results further demonstrate how crucial it is to integrate the "one health" approach associating several disciplines to address the health challenges posed by zoonotic diseases that are difficult to eradicate.

Introduction Générale

Les maladies infectieuses émergentes (MIE) représentent une menace majeure pour la santé mondiale. Pire, elles se sont invitées dans l'histoire de l'humanité en influençant significativement les issus de crises telles de guerre ou conquêtes. A titre d'exemple, le cas de la guerre de Corée en 1957 ayant conduit à la découverte des Hantavirus, la première guerre mondiale avec la grippe espagnole passée sous silence, la guerre sous Napoléon, la conquête des Amériques ou celles d'Alexandre le Grand, illustrent le lien étroit et l'impact considérable des MIE avec l'humanité (Breman & Henderson, 1998; Jonsson et al., 2010; *Les zoonoses*, 2021). En outre, leur potentielle utilisation comme arme biologique renforce cette assertion justifiant de réguliers rapports de l'OMS sur les agents biologiques représentant une menace depuis 1970. Par ailleurs, la majorité de ces MIE sont d'origine zoonotique (Field, 2009; Jones et al., 2008).

Le mot « zoonose » provient étymologiquement de 2 mots grecs ζῷον (zôon, animal) et νόσος (nosos, maladie). Il fut proposé par Rudolph Virchow à l'issu de ses travaux sur la trichinellose. Les zoonoses ou maladies d'origine zoonotiques désignent selon l'OMS l'ensemble de maladies infectieuses ou causée par des agents non conventionnels pouvant se transmettre naturellement entre l'homme et les animaux vertébrés (WHO, 2020). A ce jour, plus de 200 sont répertoriés, intégrant une frange importante de maladies existantes et nouvelles détectées chez les humains.

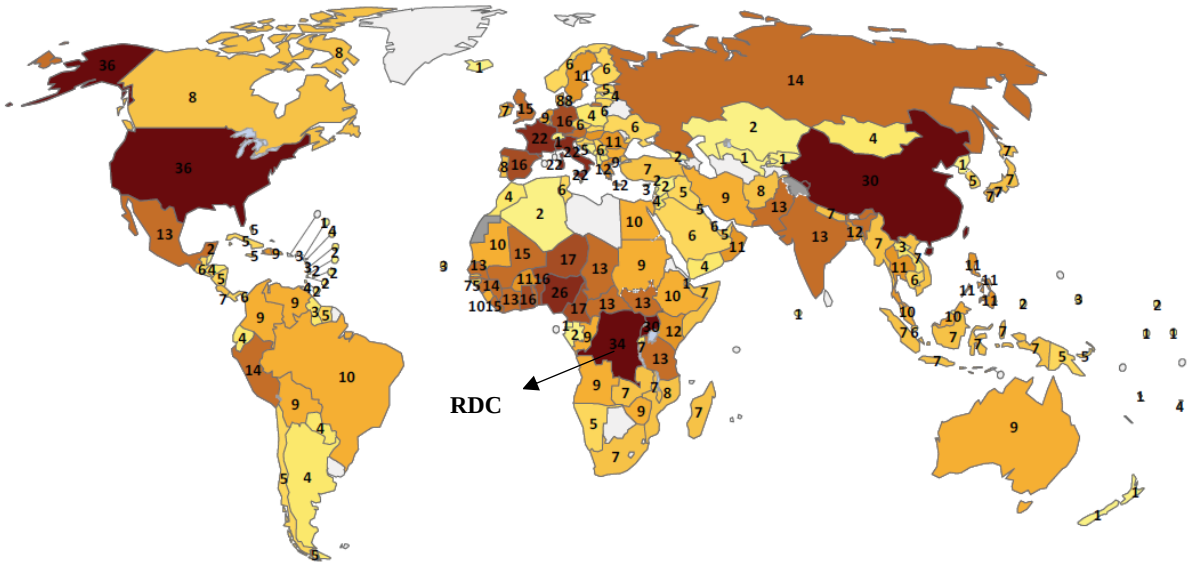
Ainsi, les zoonoses peuvent être classées par groupe taxonomique d'hôtes ou par la nature des agents pathogènes. Dans la première approche, les zoonoses sont classées selon qu'elles sont transmises à l'homme par des animaux proches sur un plan phylogénétique (primates) ou comportemental (animaux domestiques et commensaux), ou avec lesquels les interactions augmentent du fait de la destruction des habitats naturels (chauves-souris) (*Les*

zoonoses, 2021). Il est avéré à ce jour que plus de 75% des événements de MIE d'origine zoonotiques sont causés par des agents pathogènes venant des interactions avec la faune sauvage (Field, 2009; Jones et al., 2008). En considérant l'agent causal, les zoonoses peuvent être à prions, bactériennes, parasitaires ou virales (*Les zoonoses*, 2021). Les zoonoses virales illustrent le risque d'émergence et de diffusion rapide à l'échelle globale. En effet, presque toutes les récentes pandémies sont des infections virales avec une origine zoonotique (Carroll et al., 2018; Jones et al., 2008). Des travaux récents estiment que nous devrons nous préparer à assister à la propagation de plus de 500 000 virus inconnus étant donné que seuls environ 1% de menaces virales ont été identifiées à ce jour, et plusieurs manquent les moyens thérapeutiques et les vaccins (Daszak et al., 2016). En effet, des 111 familles virales connues, 25 possèdent des virus pathogènes pour l'homme ou susceptibles de l'être. Et dans ces 25 familles, 1.67 millions dont 38-50% peuvent infecter les humains restent inconnus malgré qu'ils existent dans les mammifères et oiseaux (Carroll et al., 2018; Lawrence et al., 2023). Au delà du fait que la majorité de nouvelles maladies récemment décrites sont des zoonoses virales, celles-ci ont également un fort potentiel épidémique, voire pandémique et sont dotés de capacité d'adaptation humaine faisant de l'homme qui pouvait être un hôte occasionnel, un réservoir à part entière.

De façon globale, le comportement humain et l'écologie jouent un rôle majeur dans l'émergence de zoonoses dont la fréquence des épidémies a augmenté au cours des dernières décennies. Les contacts entre les animaux sauvages et les humains se sont considérablement accrus en raison de l'empiètement continu des populations humaines dans les zones occupées par la faune sauvage, par le biais d'activités à l'instar de l'augmentation de la chasse et de la consommation de viande de brousse, ou du développement récent des industries forestières et minières dans les zones forestières reculées. Ces derniers pratiqués entraînent des changements environnementaux et climatiques, augmentant l'exposition des humains aux animaux et aux

vecteurs d'agents pathogènes tels que les rongeurs, les chauves-souris ou les moustiques qui migrent facilement entre les forêts et les habitations avoisinantes.

Les MIE en général et zoonoses virales en particulier, connaissent depuis la seconde moitié du siècle dernier, une accélération dans la fréquence des épidémies et pandémies qu'elles entraînent (***Figure 1***). Entre 2011 et 2017, l'OMS rapporte un total de 1307 épidémies dans 172 pays au travers le monde avec comme pays les plus touchés les Etats-Unis, La République démocratique du Congo (RDC) et la Chine (WHO, 2018b). Par ailleurs, des 8 urgences de santé publique de portéé internationale (USPPI), les 2 dernières sont causés par le mpox (***Tableau 1***). Ainsi, le virus du monkeypox a rejoint le virus Ebola (EBOV) dans la liste des pathogènes ayant été à la base de 2 déclarations d'USPPI. Et une fois sur deux, la maladie sévissait en RDC. Rapporté à la superficie et à la population, la RDC est indubitablement le pays qui paie le plus lourd tribut des émergences zoonotiques dont le mpox et la maladie à virus Ebola.



Un total de 1307 épidémies à travers 172 pays de 2011 à 2017 (les données de 2017 sont partielles) sur base des données rapportées à l'OMS et aux media ; Les maladies épidémiques et pandémiques suivantes ont été analysées : Influenza aviaire A(H5N1), A(H7N9), A(H7N6) A(H10N8), A(H3N2), A(H5N6), A(H9N2), Chikungunya, choléra, fièvre hémorragique de Crimée-Congo, maladie à virus Ebola, fièvre de Lassa, maladie à virus Marburg, méningite, MERS-CoV, mpox, syndrome de hochement de tête, infection à virus Nipah, peste, fièvre de la vallée du Rift, shigellose, fièvre typhoïde, fièvre hémorragique virale, fièvre West-Nile, fièvre jaune, maladie à virus Zika. Les données sur la poliomyélite n'ont pas été intégrées.

Figure 1 *: Illustration du poids épidémique à l'échelle globale de 2011-2017, adaptée de (WHO, 2018b)*

Tableau 1 *: Liste des déclarations d'urgence de santé publique de portée internationale (USPPI)*

Date de déclaration	Agent pathogène	Contexte	Géolocalisation à la déclaration	Nombre de cas à la déclaration	Date de levée d'urgence	Arguments en faveur de la déclaration
25 avril 2009	Virus de la grippe A (H1N1)	Pandémie de grippe A (H1N1) de 2009	USA et Mexique	42 cas confirmés (20 aux États-Unis et 22 au Mexique), 3 décès confirmés au Mexique. Aucun aux États-Unis	10 août 2010	Transmission inter-humaine de la nouvelle souche H1N1, avec difficulté (voire impossibilité en ce moment) de contrôler ou contenir le virus.
5 mai 2014	Poliovirus	Éradication de la poliomyélite	Afghanistan, Cameroun, Guinée équatoriale, Éthiopie, Israël, Nigéria, Pakistan, Somalie et République arabe de Syrie	74 cas (dont 59 rapportés soit en lien avec soit du le Pakistan)	Demeure une USPPI (tel que décidé à la 39ème réunion du comité d'urgence du Réglément sanitaire International (RSI) le 13 août 2024	1. Recrudescence de cas de poliovirus sauvages et vaccinaux dans des pays indemnes augmentant le risque de propagation internationale du virus sauvage avec des évidences de transmission par des voyageurs adultes 2. En 2014, 10 pays sont considérés comme ayant une transmission active du poliovirus sauvage et, contrairement aux années précédentes, il y a déjà eu une propagation à partir de trois de ces pays à l'échelle internationale. 3. Grand nombre d'États exempts de poliomyélite mais déchirés par des conflits et fragiles qui ont gravement compromis les services de vaccination systématique et sont particulièrement exposés au risque d'infection
8 août 2014	Virus Ebola	Épidémie de maladie à virus Ebola	Afrique de l'Ouest (Guinea, Liberia, Nigeria and Sierra Leone)	1711 cas (1070 confirmés, 436 probables, 205 suspects), dont 932 décès.	29 mars 2016	1. L'épidémie d'Ebola en Afrique de l'Ouest constitue un « événement extraordinaire » et un risque pour la santé publique d'autres États. 2. Les conséquences possibles d'une nouvelle propagation internationale sont particulièrement graves compte tenu de la virulence du virus, des modes de transmission intensifs dans les communautés et les établissements de santé et de la faiblesse des

Date de déclaration	Agent pathogène	Contexte	Géolocalisation à la déclaration	Nombre de cas à la déclaration	Date de levée d'urgence	Arguments en faveur de la déclaration
						systèmes de santé dans les pays actuellement touchés et les plus à risque. 3. Une réponse internationale coordonnée est jugée essentielle pour arrêter et inverser la propagation internationale d'Ebola.
1er février 2016	Virus Zika	Épidémie de maladie à virus Zika	Brésil, États-Unis d'Amérique, France, El Salvador	594 cas de microcéphalie potentiellement liés à une infection à virus Zika, 39 cas ont été confirmés (30 au Brésil, 9 en Polynésie française)	18 novembre 2016	1. Les inquiétudes internationales croissantes concernant les infections à Zika en Amérique du Sud, en particulier au Brésil. 2. Le lien hypothétique avec le nombre croissant de bébés nés avec l'anomalie congénitale connue sous le nom de microcéphalie
17 juillet 2019	Virus Ebola	Épidémie de maladie à virus Ebola	RDC (dans le Nord-Est, dans les provinces du Nord-Kivu et Ituri), Uganda (Kasese)	2522 cas confirmés, 1698 décès ont été signalés (taux de létalité globale 67%)	26 juin 2020	1. L'inquiétude concernant la propagation potentielle à partir de Goma (car la ville est une capitale provinciale avec un aéroport avec des vols internationaux.) 2. L'inquiétude suscitée par la réinfection et la transmission en cours à Beni, qui a déjà été associée à la détection du virus dans de multiples autres endroits. 3. Le meurtre de deux professionnels de la santé démontre le risque continu pour les intervenants en raison de la situation sécuritaire. 4. L'absence de contribution de la communauté mondiale à une assistance technique durable et adéquate, de ressources humaines ou financières pour la réponse à l'épidémie, malgré les recommandations précédentes en faveur d'une augmentation des ressources..
30 janvier 2020	SARS-CoV-2	Pandémie de Covid-19	Mondiale ; Chine, Japon, Corée, Vietnam, Singapour, Australie, Malaisie, Cambodge,	Total de 7794 cas confirmés. 7711 cas confirmés en Chine (dont 170 décès), 83 cas confirmés dans 18 pays (parmi	5 mai 2023	Propagation interhumaine hors de Chine. Le Comité a pris acte de l'augmentation significative du nombre de cas et du nombre de cas confirmés dans d'autres pays, du fait

Date de déclaration	Agent pathogène	Contexte	Géolocalisation à la déclaration	Nombre de cas à la déclaration	Date de levée d'urgence	Arguments en faveur de la déclaration
			Philippines, Thaïlande, Népal, Sri Lanka, Inde, États-Unis, Canada, France, Finlande, Allemagne et Émirats Arabes Unis.	ceux-ci, seuls sept n'avaient pas d'antécédents de voyage en Chine)		qu'il reste encore de nombreuses inconnues et qu'une transmission interhumaine s'est produite en dehors de Wuhan et en dehors de la Chine. Le Comité estime qu'il est encore possible d'interrompre la propagation du virus, à condition que les pays mettent en place des mesures énergiques pour détecter précocement la maladie, isoler et traiter les cas, rechercher les contacts et promouvoir des mesures de distanciation sociale proportionnelles au risque.
23 juillet 2022	Monkeypox virus (MPXV)	Épidémie mpox de 2022-2023	Pays non endémiques dans la région Europe et aux Etats-Unis	Au moment de la déclaration, 3040 cas de mpox avaient été rapportés à l'OMS, en provenance de 47 pays. Avec un cumul depuis début 2022 plus de 16 000 cas ont été signalés dans 75 pays et territoires, et cinq décès.	11 mai 2023	Malgré des avis partagés du comité d'urgence du RSI, la notification de plusieurs cas dans plusieurs pays non-endémiques. Il s'est propagé rapidement par contact sexuel dans une série de pays où le virus n'avait jamais été observé auparavant.
14 août 2024	Monkeypox virus (MPXV)	Épidémie mpox 2023-2024	Burundi, Kenya, Rwanda et Uganda Republique Centre Africaine, Republique du Congo Cameroon, Côte d'Ivoire, Liberia, Nigeria et Afrique du Sud	Plus de 100 cas confirmés de clade Ib	En cours	Recrudescence en RDC et dans un nombre croissant de pays d'Afrique ; La propagation rapide de l'épidémie du clade Ib est apparue dans l'est de la RDC, également signalée dans quatre pays voisins, en plus des cas de clade Ia et du clade II

Située en Afrique Centrale, la RDC est le deuxième pays d'Afrique après l'Algérie par la superficie : 2 345 409 km², et partage ses frontières avec 9 pays limitrophes. Les zones forestières représentent environ 48% du territoire national et baignent dans un réseau hydrographique riche, long de 4700km. Paradoxalement, sa biodiversité et ses potentiels contrastent avec un contexte chronique de ressources limitées et d'insécurité occasionnant des désastres humanitaires exacerbées par les évènements sanitaires. La RDC fait face à une multitude d'épidémies récurrentes avec des virus émergents et réémergents, dont le virus Ebola (EBOV, espèce *Orthoebolavirus zairense*), un virus à ARN, et le virus Monkeypox (MPXV, espèce *Orthopox monkeypox*), un virus à ADN, 2 maladies virales à fort potentiel épidémique et pandémique avec un taux élevé de létalité, et dont les agents étiologiques peuvent être utilisés comme armes biologiques. Le pays a notifié 8 épidémies de maladie à virus Ebola depuis 2017 tant à l'Est qu'à l'Ouest du pays. Pour le mpox, le nombre d'épidémies ne se compte plus, et au-delà de son endémisation dans certaines régions, le pays connaît une croissance constante de l'incidence des notifications de cas qui ont augmenté considérablement au cours des dernières décennies, voir années.

Sévissant et émergent souvent dans des zones rurales reculées avec des établissements de santé limités et sous-équipés, la détection de nouvelles flambées a souvent été un défi. Avec l'augmentation des voyages internationaux et l'évolution des environnements climatiques, ces nouveaux agents pathogènes peuvent maintenant se propager rapidement à travers le pays et aussi dans le monde. Ils entraînent ainsi des impacts économiques et psychosociales qui vont au-delà de la morbidité et de la mortalité dramatique dont ils sont responsables.

Les mesures de prise en charge et de lutte contre ces maladies passent par le contrôle et la prévention de ces maladies aux échelles individuelles et communautaires pour l'interruption des chaines de transmissions et l'acquisition d'une immunité pouvant conduire à l'élimination ou l'éradication ou encore diminuer de la vulnérabilité des populations. Cependant, la mise en place de ces mesures et la bonne connaissance des agents pathogènes qu'elle conditionne

imposent au préalable la détection et la caractérisation génétique de ces souches. En même temps, qu'elles améliorent notre compréhension de la transmission inter espèces ou intra-espèces des virus et leur évolution spatiotemporelle, elles permettent également le développement des moyens diagnostiques et thérapeutiques et nous prémunissent face aux épidémies à venir.

Pour les maladies d'origine zoonotique, la meilleure stratégie pour caractériser la diversité des agents pathogènes devrait se passer à l'interface entre les humains et les animaux, en intégrant l'approche « One Health » (« Une Seule Santé ») ou qui permet de documenter les sources animales, l'étendue du réservoir animal encore inconnu pour les virus Ebola (EBOV) et monkeypox (MPXV). Ensuite, la caractérisation de la diversité génétique ou des antécédents évolutifs des agents pathogènes dans la faune sauvage permettra de prédire le risque d'émergence ou de réapparition potentielle de la maladie. Les connaissances sur la présence d'une immunité préexistante ou d'une immunité croisée sont également importantes, car elles peuvent influer sur l'émergence et la propagation épidémique subséquente d'agents pathogènes. Une meilleure connaissance des facteurs mentionnés ci-dessus permettra d'affiner les modèles mathématiques qui prédisent l'émergence et identifient avec une plus grande précision les zones géographiques pour la mise en œuvre des efforts de contrôle.

Le présent travail permettra ainsi d'enrichir nos connaissances sur la circulation des virus d'origine zoonotique à potentiel épidémique à l'interface entre les humains et les animaux sauvages en caractérisant la diversité génétique des souches EBOV ayant circulé dans la province de l'Equateur durant les 2 dernières épidémies et celles du MPXV sévissant dans le pays depuis 2018. Dans cet exercice, sera mis en exergue l'apport de la génomique et de la sérologie dans la compréhension de la dynamique des épidémies liés à ces virus ayant déjà été exporté en dehors de l'Afrique à des amplitudes différentes.

Revue de la littérature

Chapitre 1 : Maladie à virus Ebola

De tous les agents pathogènes responsables de tableaux cliniques de fièvres hémorragiques, les filovirus figurent parmi les principaux et les plus redoutés. Le séquençage à haut débit ainsi que la recherche active a permis ces dernières années d'identifier des nouveaux genres appartenant à cette famille portant à un total de 9 genres. Néanmoins, les genres les plus connus et à la base de la majorité des épidémies restent orthoebolavirus et orthomarburgvirus. La recherche sur *https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/* du mot clé « Ebola » permet de générer à la date du 4 septembre 2024, 12248 résultats de publications de divers types (livres, articles, revues, …), avec un pic de 2072 en 2015, correspondant à la crise de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest. En parallèle, cette tendance est superposable à la publication dans d'autres bases de données telles que NCBI (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/*), EBI (*https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home*) ou NIG (*https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html*) (***Figure 2***).

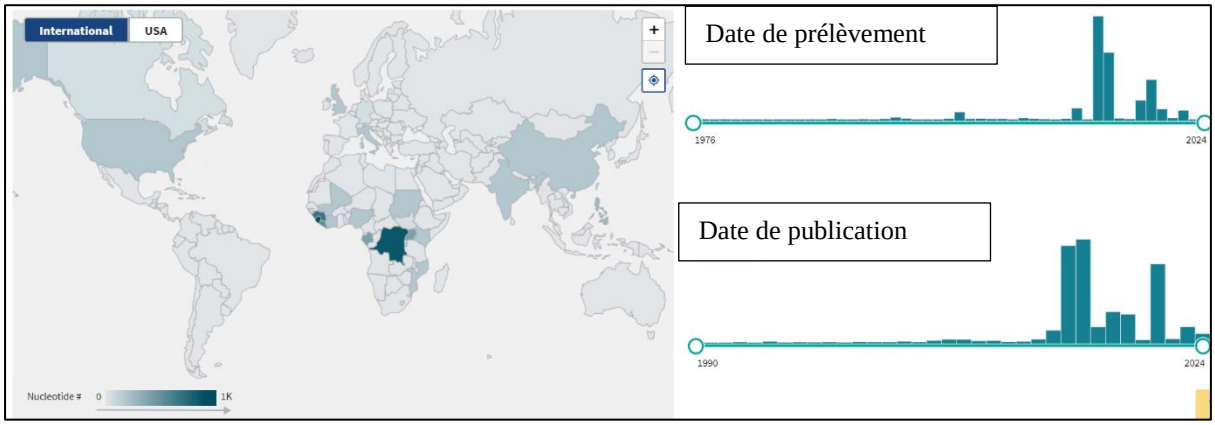


Figure 2 *: Distribution spatio-temporelle des séquences publiées dans Genbank (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/dashboard?SeqType_s=Nucleotide&VirusLineage_ss=Orthoebolavirus,%20taxid:3044781)*

Cette section parcourra ainsi les connaissances actuelles sur la maladie à virus Ebola en passant en révue les aspects virologiques, épidémio-cliniques et thérapeutiques.

1.1. Virologie

1.1.1. Taxonomie et nomenclature

Les Filoviridae sont une famille de virus à ARN de sens négatif avec des génomes d'environ 13,1 à 20,9 kilobases (kb) qui infectent les poissons, les mammifères et les reptiles. Le virus Ebola est le plus connu et le plus étudié de cette famille (É. Leroy & Maganga, 2018). Sa taxonomie a évolué depuis sa découverte en 1976 jusqu'à ce jour. A ce jour, le virus Ebola appartient au domaine des *Riboviria,* règne des *Orthornavirae,* phylum des *Negarnaviricota,* Subphylum : *Haploviricotina*, classe des *Monjiviricetes*, ordre des *Mononegavirales*, famille des *Filoviridae*, genre des *Orthoebolavirus.* Ce genre regroupe à ce jour 6 espèces à savoir *Orthoebolavirus bombaliense*, *Orthoebolavirus bundibugyoense*, *Orthoebolavirus restonense*, *Orthoebolavirus sudanense*, *Orthoebolavirus taiense* et *Orthoebolavirus zairense* (Biedenkopf et al., 2024)

Le domaine des *Riboviria* est actuellement le plus haut niveau de classification des virus introduit en 2018 par l'ICTV et comprend tous les virus qui utilisent une polymérase dépendant de l'ARN parmi lesquels les virus à ARN qui codent une ARN polymérase dépendant de l'ARN (RdRp) classés dans le règne des Orthornavirae. Ceux-ci correspondent aux groupes III, IV et V de la Classification Baltimore. Au groupe V correspond l'embranchement des *Negarnaviricota* établi en 2019 (Kuhn et al., 2020) et regroupant les virus à ARN à polarité négative. Les Negarnaviricota sont subdivisés en 2 sous embranchements : les *Haploviricotina* et les *Polyploviricotina* (plus complexes) selon que l'ARN code pour une large polymérase avec ou sans capside. Les Monjiviricetes sont une classe de virus parmi les *Haploviricotina* d'importance médicale et vétérinaire car ils infectent les champignons, les plantes et les animaux. Le taxon est construit à partir des deux ordres qui composent cette classe, les Mononegavirales et Jingchuvirales avec le suffixe *-viricetes* propre aux classes de virus. L'ordre des Mononegavirales, établi en 1991, est caractérisée par des virus ayant pour génome de l'ARN linéaire, de polarité négative et non-segmenté, cad monocaténaire. A côté

des familles des Rhabdoviridae (virus de la Rage), des Paramyxoviridae (virus Nipah et Hendra) et la famille des Bornaviridae, la famille des *Filoviridae* (***Tableau 2***) regroupe à ce jour 9 genres distincts dont le genre Orthoebolavirus avec 6 espèces ci-haut cités (Biedenkopf et al., 2023).

Tableau 2 : *Dernière mise à jour de la taxonomie des Filoviridae (Biedenkopf et al., 2023)*

Genre	Noms précédents	Nouvelle nomenclature	Nom du virus (abbréviation)
Curvavirus	Lloviu cuevavirus	*Cuevavirus lloviuense*	Lloviu virus(LLOV)
Dianlovirus	Mengla dianlovirus	*Dianlovirus menglaense*	Mengla virus (MLAV)
Loebvirus	-	*Loebvirus percae*	Lotshberg virus (LTBV)
Oblavirus	-	*Oblavirus percae*	Oberland virus (OBLV)
Orthoebolavirus	Bombali ebolavirus	*Orthoebolavirus bombaliense*	Bombali virus (BOMV)
	Bundibugyo ebolavirus	*Orthoebolavirus bundibugyoense*	Bundibugyo virus (BDBV)
	Reston ebolavirus	*Orthoebolavirus restonense*	Reston virus (RESTV)
	Sudan ebolavirus	*Orthoebolavirus sudanense*	Sudan virus (SUDV)
	Tai Forest ebolavirus	*Orthoebolavirus taiense*	Taï Forest virus (TAFV)
	Zaire ebolavirus	*Orthoebolavirus zairense*	Ebola virus (EBOV)
Orthomarburgvirus	Marburg marburgvirus	*Orthomarburgvirus marburgense*	Marburg virus (MARV)
			Ravn virus (RAVV)
Striavirus	Xilang striavirus	*Striavirus antennarii*	Xiliang virus (XILV)
Tapjovirus		*Tapjovirus bothropis*	Tapajos virus (TAPV)
Thamnovirus		*Thamnovirus kanderense*	Kander virus (KNDV)
		Thamnovirus percae	Fiwi virus (FIWIV)
	Huangjiao thamnovirus	*Thamnovirus thamnaconi*	Huangjiao virus (HUJV)

Dans la démarcation et l’attribution des espèces d'orthoebolavirus se basant sur la phylogénie (***Figure 3***), plusieurs critères sont pris en compte dont la différence génétique intra-espèces de ⩾23 %, le nombre et l'emplacement des chevauchements de gènes, l'hôte et la

distribution géographique du virus, ainsi que la pathogénicité du virus pour différents organismes (Biedenkopf et al., 2024).

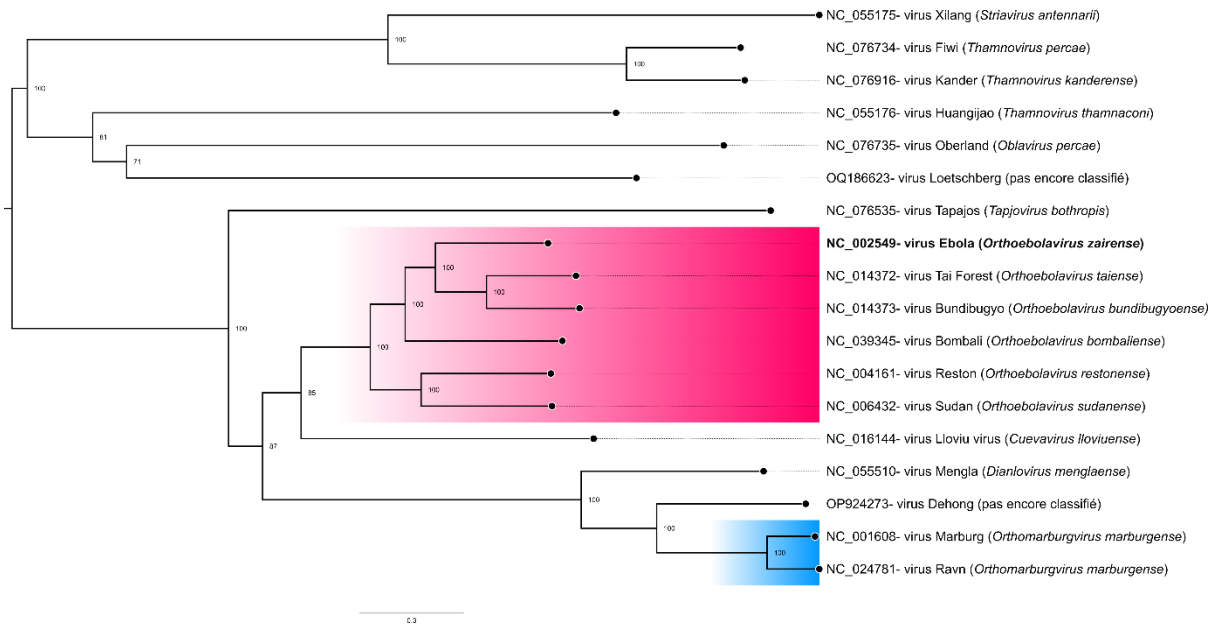


Figure *3* *: Phylogénie par maximum de vraisemblance (racine médiane) des filovirus construite à partir des génomes complets (ou quasi) des filovirus*

1.1.2. Morphologie du virus et organisation du génome des filovirus

1.1.2.1. Morphologie et Structure du virus

Les orthoebolavirus et orthomarburgvirus sont des virus pléomorphes. Ils ont été nommés « filovirus » à cause de la forme filamenteuse caractéristique observée à la microscopie électronique (***Figure 4***). Parfois sous forme bifurquée, ils peuvent aussi se présenter sous forme ramifiée ou branchée, en forme de « 6 », de « U » ou épingle, ou plus rarement sous forme circulaire. Les virions ont un diamètre de 80-98 nm, cependant, leur longueur est variable de 800nm à 1000nm, pouvant aller jusqu'à plus de 20000nm et avec un pic d'infectivité associé aux particules d'environ 805 nm de longueur (Biedenkopf et al., 2024; *Traité de virologie médicale*, 2019).

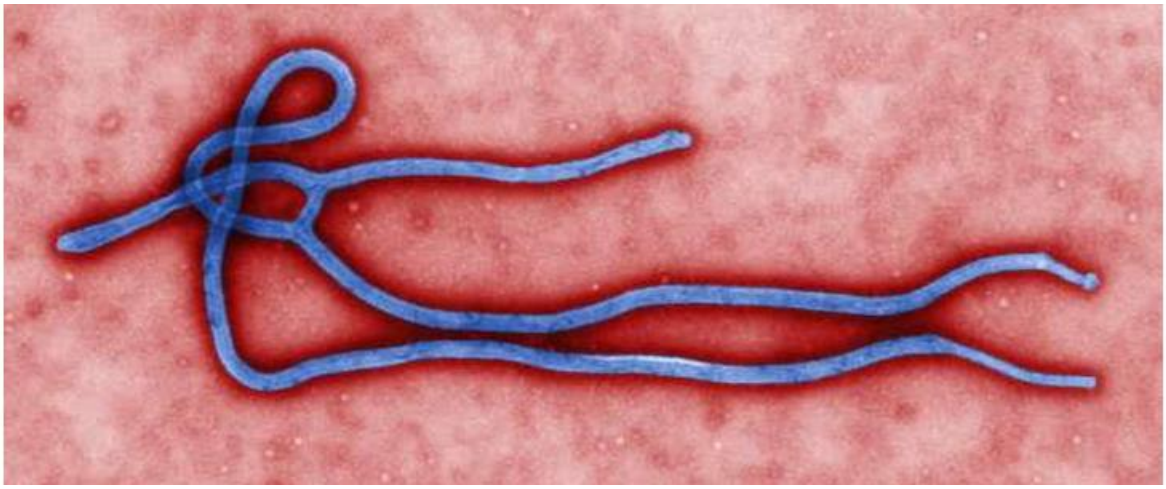


Figure 4 *: Forme filamenteuse caractéristique des filovirus visible sur cette photographie libre de droits de Cynthia Goldsmith et Pierre Rollin/CDC, Atlanta, USA*

Les filovirus sont composés de 2 éléments structuraux : l'enveloppe et le complexe ribonucléocapsidique, résultant de l'assemblage des 7 protéines virales (***Figure 5***). Le matériel génétique du virus est enveloppé dans une nucléocapside tubulaire à symétrie hélicoïdale de 20 à 30 nm de diamètre, elle-même enveloppée d'une matrice hélicoïdale de 40 à 50 nm de diamètre constituée de protéines protéine virale 24kDa (VP24) et protéine virale 40kDa (VP40) et comprenant des stries transversales de 5 nm. Cet ensemble est, à son tour, enveloppé d'une membrane lipidique dans laquelle sont nichées des spicules de glycoprotéine (GP). Celles -ci recouvrent l'enveloppe virale, en homotrimère sur la face externe et sont associée à 2 autres protéines structurales (VP24 et la VP40) sur la face interne de l'enveloppe. Le complexe ribonucléocapsidique est composé d'un brin d'ARN linéaire, de polarité négative, et des 4 protéines structurales impliquées dans la formation de la nucléocapside : la nucléoprotéine (NP), l'ARN polymérase (L), la protéine virale 35kDa (VP35) et la protéine virale 30kDa (VP30).

Comme propriétés physicochimiques décrites par Elliot et al., les particules d'EBOV ont une masse moléculaire d'environ 3.82×105 kDa, une densité flottante dans le tartrate de potassium d'environ 1.14 g/ml et un coefficient de sédimentation ($S_{20,w}$) de 1 300 à 1 400 S. La nucléocapside a une densité flottante dans le chlorure de césium (CsCl) d'environ 1.32 g cm^3 (Elliott et al., 1985; Kiley et al., 1980).

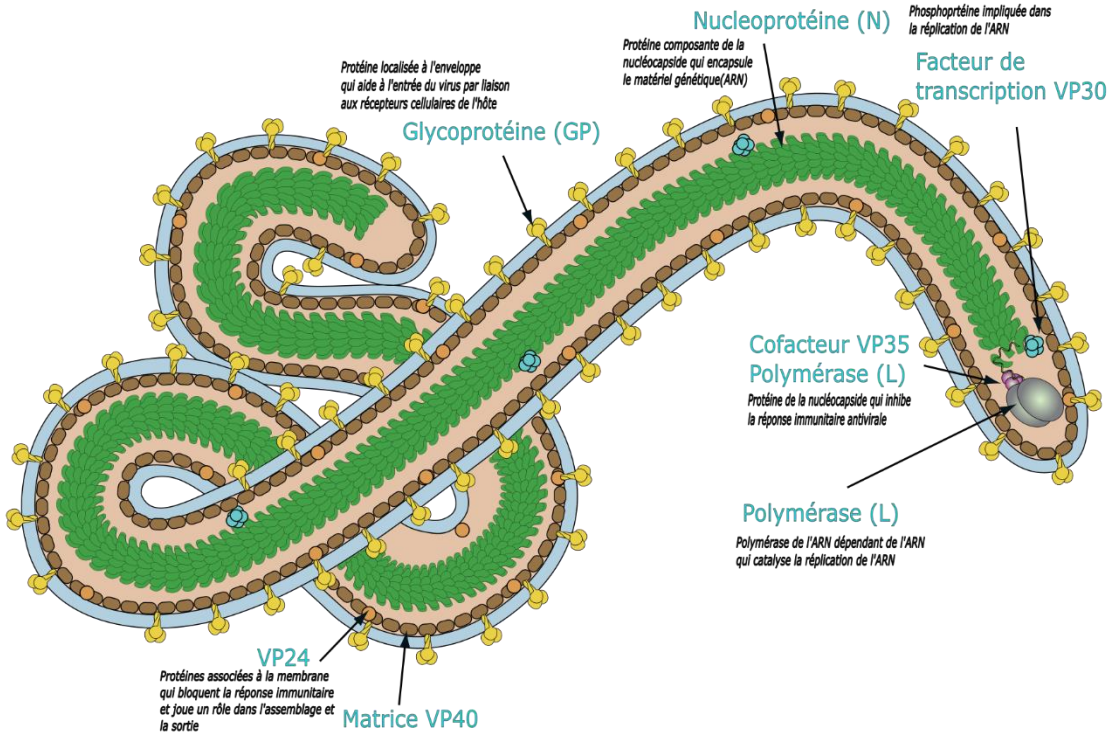


Figure 5 : *Représentation schématique du virus Ebola adaptée de viralzone.org*

1.1.2.2.Organisation du génome

L'architecture du génome des filovirus est constitué d'un brin d'ARN linéaire, non segmenté, à polarité négative et d'un génome de longueur variant de 13.1 kb (Thamnovirus) à environ 19 kb (Cuevavirus, Orthoebolavirus et Orthomarburgvirus) (***Figure 6***). Exceptionnellement, le genome du Déhóng virus (DEHV), d'un virus non classifié de chauves-souris peut atteindre 20.9 kb (Biedenkopf et al., 2024). Malgré des différences intraespèces et intragenres, les génomes des filoviridae ont en général une structure 3'-NP-VP35-(VP40)-(GP)-L-5'et sont organisés comme la plupart des mononégavirus, avec l'ossature 3'-N-P-M-(G)-L-5'. Certaines espèces peuvent donc contenir des gènes supplémentaires (***Figure 6***).

Tel qu'illustré sur la ***Figure 7*** Le génome des Orthoébolavirus comprend 7 gènes codant respectivement pour 7 protéines dans le sens 3'- Leader – NP - VP35 - VP40 – GP - VP30 - VP24 - L – 5' Trailer. Ces gènes sont séparés par des séquences de zones de chevauchement (Overlap) de longueur variable ou encore zone inter-génique. Ils sont encadrés par des signaux de transcription (Bodmer et al., 2024; Jain et al., 2021).

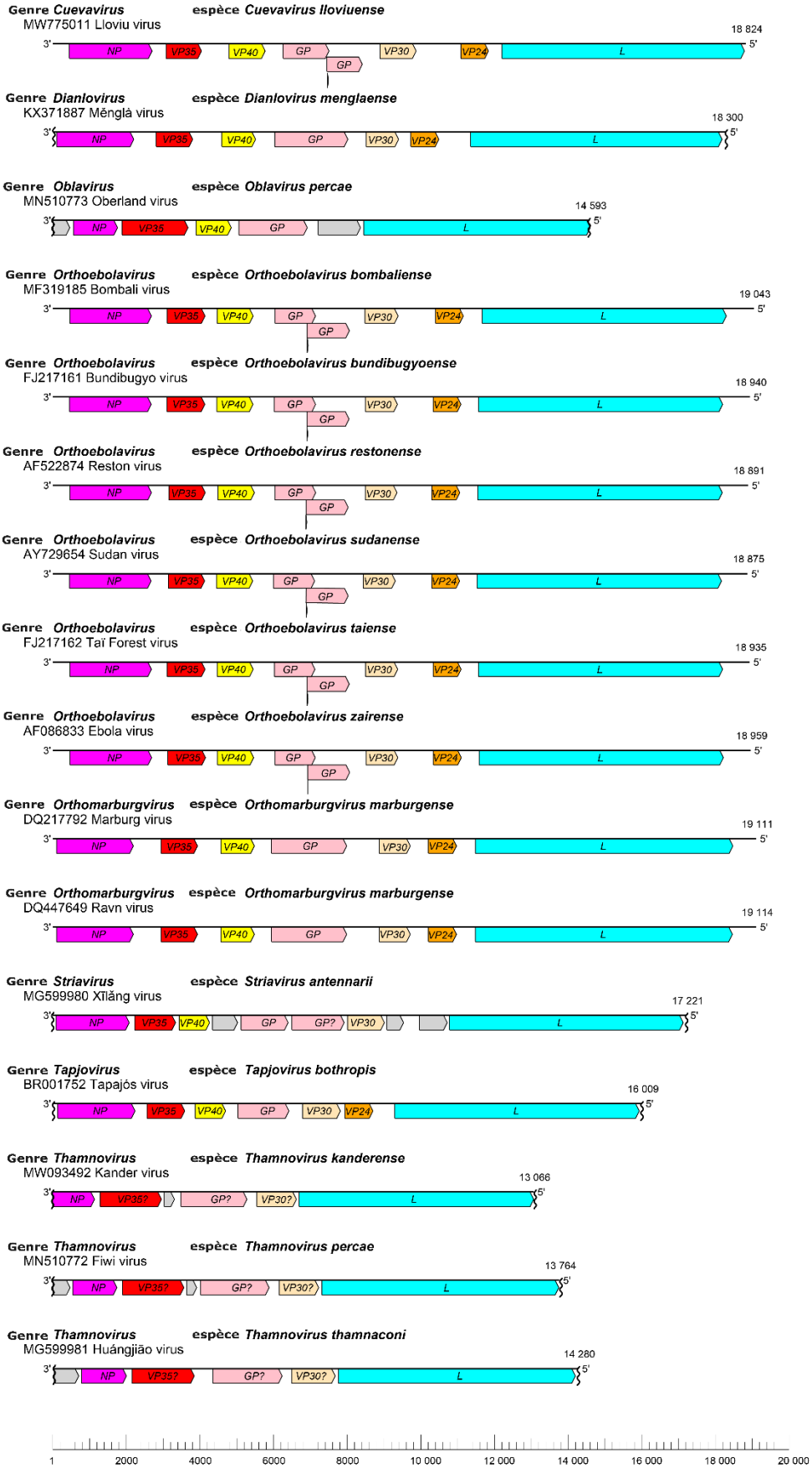


Figure 6 : *Architecture globale du génome des différents genres dans la famille des filoviridae adaptée de Biedenkopf et al. (Biedenkopf et al., 2024)*

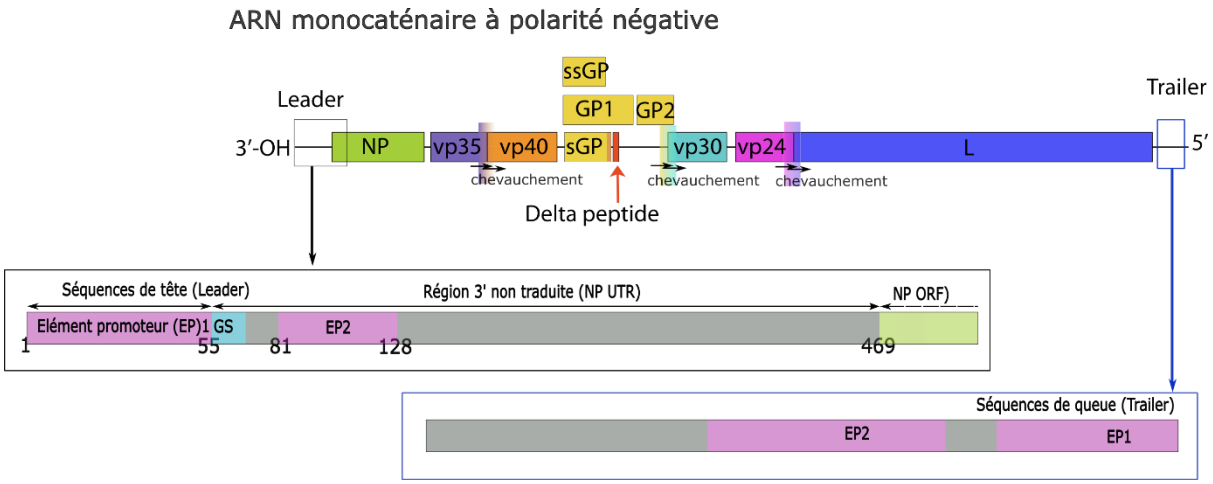


Figure 7 *: Représentation schématique du génome du virus Ebola montrant les différents gènes adaptée de Bodmer et al.(Bodmer et al., 2024) et viral zone (https://viralzone.expasy.org/23?outline=all_by_species)*

1.1.2.3.Structure et fonctions des protéines virales

Les filovirus expriment 6 à 10 protéines selon le genre (Hume & Mühlberger, 2019). Le génome viral des orthoebolavirus code pour 7 protéines, toutes homologues à celles des Cuevavirus, des Dianlovirus et des Orthomarburgvirus. Ces protéines sont en proportion différente : la VP40 est la plus abondante, dans les virions, suivie de la nucléoprotéine (NP), qui englobe le génome de l'orthoebolavirus ; alors que protéine la moins abondante est la grande protéine (L), qui intervient dans la réplication et la transcription du génome du virus orthoebolavirus(Kiley et al., 1980).

Le complexe ribonucléoprotéine (RNP) de l'orthoebolavirus se compose de NP, de la protéine associée au complexe RNP (VP24), du cofacteur de la polymérase (VP35), de l'activateur transcriptionnel (VP30) et de L. Les complexes RNP s'associent à la protéine matricielle (VP40), qui tapisse la face interne de la membrane du virion, et à la glycoprotéine (GP1 et GP2), qui forme des pointes globulaires à l'extérieur de la membrane du virion. À l'instar des cuevavirus, les orthoebolavirus expriment leur glycoprotéine structurelle (GP1 et GP2) via l'édition co-transcriptionnelle et expriment également trois glycoprotéines solubles du gène GP (sGP, ssGP et Δ-peptide) (***Figure 8***). En effet, L'édition transcriptionnelle du gène

GP par la protéine L permet d'obtenir trois transcrits d'ARN : pré-sGP, pré-GP et pressGP. La traduction de ces trois transcrits donne trois pré-protéines, à savoir, pré-sGP, pré-GP0 et pré-ssGP, respectivement. La pré-sGP est clivée post-traductionnellement par la furine en sGP et en Δ-peptide. La pré-GP0 et la pré-ssGP aboutissent à une glycoprotéine de pointe transmembranaire (GP) complète et à une glycoprotéine soluble à petite sécrétion (ssGP). La GP est clivée par la furine en sous-unités GP1 et GP2 maintenues ensemble par des liaisons disulfures. Shed-GP est libéré des cellules infectées en raison du clivage de la GP par le facteur de nécrose tumorale α enzyme de conversion (TACE).

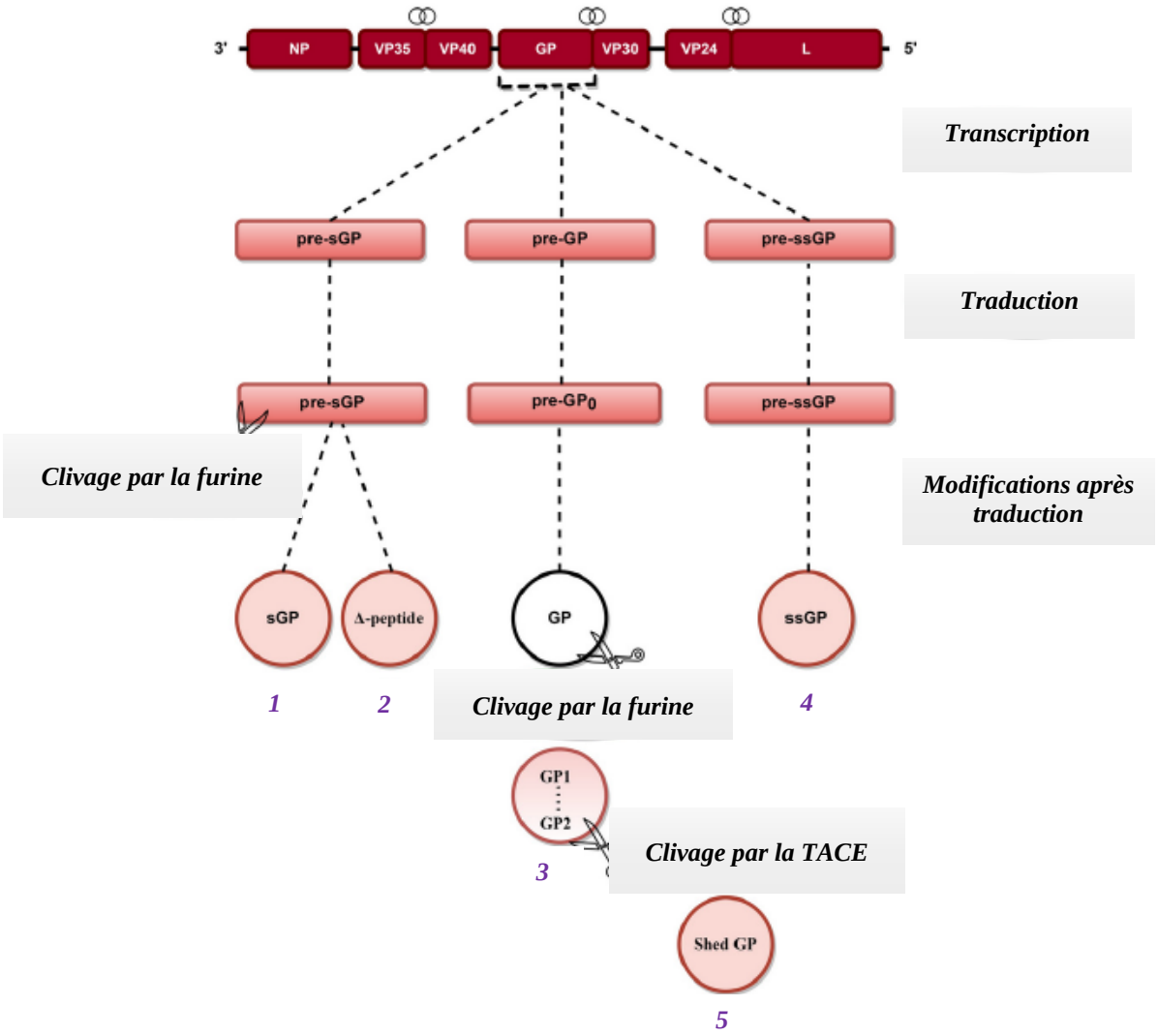


Figure 8 : *Expression de la glycoprotéine (GP) virale adaptée de (Jain et al., 2021).*

La nucléoprotéine (NP) se compose de deux modules fonctionnels distincts et forme avec les protéines virales VP35, VP30 et L, des composantes de la structure de la nucléocapside, et interviennent dans la transcription de l'ARN génomique viral, la réplication et la morphogénèse virale. La VP35, cofacteur de la polymérase L, a un potentiel d'inhibition des cellules immunitaires de l'hôte par un camoufflage, faisant de lui un facteur de virulence. La VP40 est située à la face intérieure de la membrane et se compose de deux modules fonctionnels distincts. Elle intervient dans le bourgeonnement et la sortie des particules virales hors des cellules infectées. Le 4ème gène, GP, code pour la glycoprotéine, seule protéine présente à la surface du virus. Il est le gène cible le développement des vaccins et thérapuetiques dont les anticorps monoclonaux. Notons derechef et comme mentionné plus haut, que trois différentes protéines non structurelles sont exprimées :

- la glycoprotéine de surface (GP) : la seule protéine transmembranaire exprimée à la surface des virions. Elle est synthétisée sous forme d'un précurseur clivé par l'endoprotéase furine en deux sous-unités, GP1, extracellulaire, et GP2, transmembranaire, reliées entre elles par des ponts disulfures. Elle intervient comme médiateur de la liaison, absorption et fusion des membranes virales et cellulaire, permettant au virion de pénétrer dans la cellule. Elle permet l'adsorption du virus sur les cellules sensibles à l'orthoebolavirus par l'intermédiaire de facteurs d'attachement cellulaire. En outre, elle détermine le tropisme cellulaire et tissulaire de l'orthoebolavirus ; induit la fusion de la membrane cellulaire du virus à la suite de la liaison endolysosomale à NPC1 ; inhibe la réponse immunitaire innée en interférant avec la BST2.
- GP1,2Δ : déclenchent une activation immunitaire et une augmentation de la perméabilité vasculaire.

- la glycoprotéine sécrétée (sGP) : intervient dans la modulation du système immunitaire et aussi comme facteur anti-inflammatoire en protégeant la fonction de barrière des cellules endothéliales pendant l'infection
- la glycoprotéine sécrétée secondaire (ssGP) : composée de 298aa dans sa structure primaire, elle est sécrété sous la forme d'un homodimère N-glycosylé formé par une liaison disulfure intermoléculaire en aa 53 et sa fonction reste encore inconnue

Alors que la VP30 est vue comme la seconde nucléoprotéine avec son rôle dans l'initiation de la transcription, la VP24 est considérée comme la seconde matrice, impliquée dans la formation et l'assemblage de la nucléocapside. La VP24 et la VP35 sont également impliquées dans l'inhibition de la réponse immunitaire de type Interféron I. L'ARN polymérase (L) ARN-dépendant est une enzyme qui catalyse la réplication et la transcription de l'ARN génomique viral (Biedenkopf et al., 2024; Jain et al., 2021; Mbala-Kingebeni, 2020). Les rôles des protéines sont synthétisés au ***Tableau 3***.

Tableau 3 *: Gènes des orthoebolavirus avec les caractéristiques et fonctions des protéines qu'elles expriment (Biedenkopf et al., 2024; Jain et al., 2021)*

Gène	Précurseurs	Protéines	Longueur	Poids moléculaire	Fonctions principales de la protéine
1. NP		Nucléoprotéine (NP)	739	83.31 kDa	Composant essentiel de nucléocapside, Encapsidation du génome et de l'antigénome/ attachement, formation de la nucléocapside et interactions avec VP35, VP40 et VP30, formation des inclusions des corps cellulaires ; active la protéine UPR (Unfolded Protein Response)
2.VP35		Protéine virale 35 (VP35)	340	37.37 kDa	Régulation de la synthèse de l'ARN viral, implication dans l'évasion immunitaire, cible de la réponse immunitaire innée et co-facteur de la polymérase replicase transcriptase
3.VP40		Protéine virale 40 (VP40)	326	40 kDa	Protéine virale la plus exprimée, essentielle dans l'assemblage (formation des filaments, …), dans le bourgeonnement pour la sortie des virions et dans l'entrée/désassemblage des virions dans les endosomes tardifs ; Composant matriciel, elle est aussi impliquée dans la régulation de la transcription, la réplication du génome et la morphogenèse
4.GP	pre-sGP	Glycoprotéine secrétée soluble (sGP)	364	50 kDa	Pas bien connue. Elle constitue probablement un leurre d'anticorps permettant à l'hôte d'échapper au système immunitaire et peut être un agent anti-inflammatoire. La sGP contribue à la propagation du virus et peut être utilisée comme biomarqueur pour le diagnostic précoce de la MVE.
		Δ-peptide	40	10–14 kDa	Il supprimerait la surinfection par les filovirus et/ou qu'elle agit comme une viroporine ; elle pourrait agir comme une entérotoxine.
	pre-GP0	Glycoprotéine transmembranaire ($GP_{1\ et\ 2}$)	676	150 kDa	GP, seule protéine à la surface du virus, est responsable de l'entrée du virus, c'est-à-dire de l'attachement aux cellules hôtes et de la fusion de la membrane virale et de la membrane de la cellule hôte. L'interaction GP-NPC1 est une étape

Gène	Précurseurs	Protéines	Longueur	Poids moléculaire	Fonctions principales de la protéine
					indispensable à l'infection virale. En outre, la GP contribue au bourgeonnement viral, tandis que la GP et la GP excrétée influent sur la tempête de cytokines.
	pre-ssGP	Soluble small secreted Glycoprotéine secrétée secondaire (GPss)	298	30 kDa	Inconnue
5.VP30		Protéine virale 30 (VP30)	288	30 kDa	Composant de la nucléocapside, elle intervient dans la régulation de la transcription surtout à la phase d'initiation au site de départ du gène NP (réinitialisation potentielle et antitermination) ; elle est aussi impliquée dans réplication du génome
6.VP24		Protéine virale 24 (VP24)	251	24 kDa	Régulation de la transcription et de la réplication du génome ; régulation de la morphogenèse et de la sortie des virions ; inhibition de la phosphorylation des MAPK (mitogen-activated protein kinase) et prévention du transfert de la caryophérine du cytoplasme vers le noyau ; inhibition de la signalisation des cellules hôtes en aval des interférons A1/B1/G ; Formation de la nucléocapside et réplication virale
7. L		ARN polymérase (L)	2212	253	Réplication du génome et transcription de l'ARNm ; coédition transcriptionnelle

1.1.3. Sensibilité aux agents physiques et chimiques

Sur le plan physico-chimique, le virus Ébola est fragile et ne survit pas dans le milieu extérieur. Il est détruit par la chaleur, par les ultra-violets (UV), les rayons gamma, les solvants des lipides (éther), la bêtapropiolactone. Les méthodes actuelles d'inactivation des filovirus se limitent à de fortes doses de lumière ultraviolette et d'irradiation gamma, le traitement au formol, les solvants lipidiques, la bêtapropiolactone, la sonde alkylante photo-induite 1,5-iodonaphylaxie et les désinfectants commerciaux à base d'hypochlorure (javel) et de phénol. Les connaissances de condition d'inactivation dictent les règles de biosécurité et manipulation au laboratoire. Différents protocoles d'inactivation ont été proposés en fonction des applications et associant une ou plusieurs de modalités mentionnées plus haut.

1.1.4. Réplication Virale

Au sein des filovirus, la stratégie de réplication des orthoebolavirus est proche de celle utilisée par d'autres genres tels les Cuevavirus, les Dianlovirus et les Orthomarburgvirus (Hume & Mühlberger, 2019). La réplication et la transcription des virus Ebola ont lieu dans le cytoplasme des cellules infectées. Les virus codent pour leur propre ARN polymérase dépendante de l'ARN (L), qui reconnaît l'ARN génomique viral comme matrice pour la réplication et la transcription. La ***Figure 9*** en reprend les principales étapes.

En bref, les orthoebolavirus infectent les cellules hôtes en pénétrant par macropinocytose. Grâce à sa glycoprotéine qui s'attache à la surface externe de la membrane plasmique de la cellule hôte par la médiation les récepteurs de lectine de type C et des glycosaminoglycanes. Il s'en suit la fusion dans les endosomes en fonction du pH faible. Le clivage des cathepsines L et/ou B par les cystéines-protéases endosomales est nécessaire pour la liaison des GP1 et GP2 au récepteur endosomal Niemann-Pick C1 (NPC1). La GP1 participe à l'attachement de la particule virale à la membrane cellulaire, tandis que la GP2 participe à la

fusion du virus avec la membrane la membrane cellulaire avec la membrane de la vésicule cellulaire pour permettre la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme.

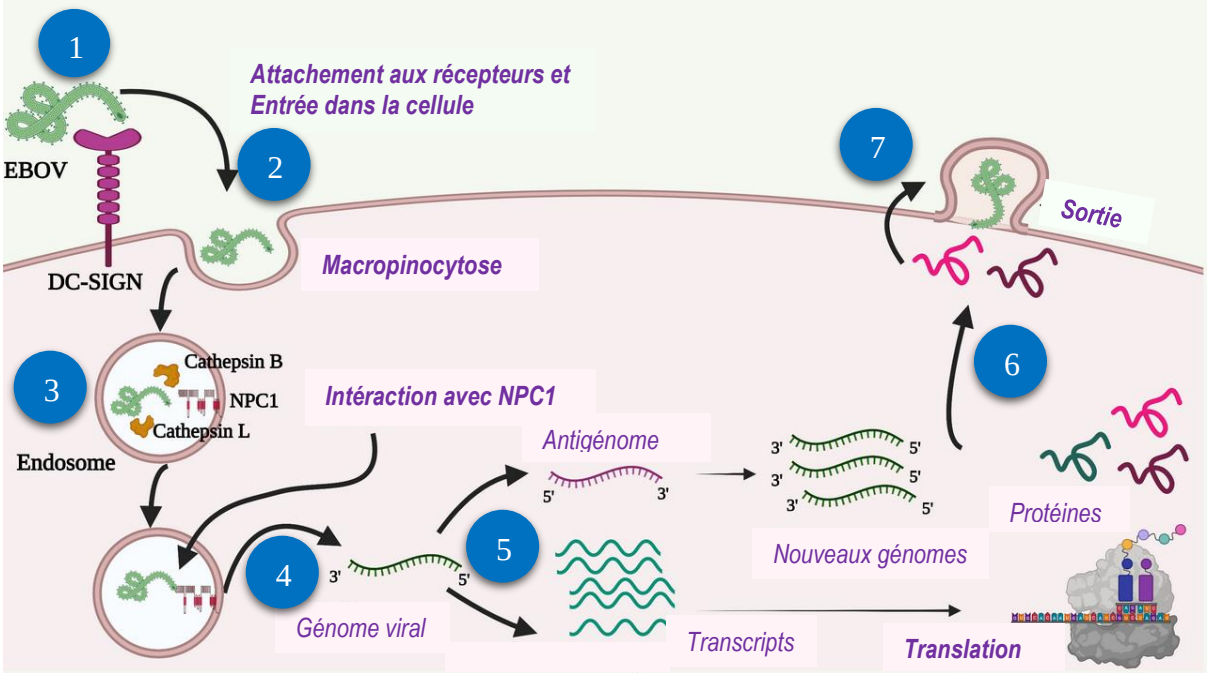


Figure 9 *: représentation schématique simple des différentes étapes du cycle de vie du EBOV adapté de (Jain et al., 2021)*

Après la désincrustation, le génome viral est libéré dans le cytoplasme où auront lieu la transcription et la réplication. La transcription est intimement liée au VP30, l'activateur transcriptionnel VP30. L'ARN polymérase (L) permettra la transcription des gènes viraux en ARNm, et aussi pour la synthèse et la réplication de l'antigénome viral (complément inverse de l'ARN génomique). Celui-ci servira de matrice à la production des nouveaux génomes viraux. Par ailleurs, la traduction des ARNm produit les protéines virales structurales, qui s'assemblent aux génomes répliqués pour former des ribonucléocapsides ou complexes RNP. D'importantes quantités de nucléocapsides s'accumulent dans la cellule avec le développement de l'infection pour former des corps d'inclusion intracytoplasmiques. Ceux-sont constituent les sites de prédilection de transcription, de réplication et d'assemblage des nucléocapsides. Enfin, les RNP vont acquérir de la matrice virale et des glycoprotéines avant la libération des virions

en dehors de la cellule infectée. Les nucléocapsides matures sont transportées par polymérisation de l'actine avant d'être enveloppées dans la membrane plasmique, où le bourgeonnement se produit selon un processus médié par VP40 (Biedenkopf et al., 2024; Bodmer et al., 2024; Feldmann et al., 2020; Jain et al., 2021; Kiley et al., 1980; É. Leroy & Maganga, 2018; Mbala-Kingebeni, 2020; *Traité de virologie médicale*, 2019).

1.2. Historique, épidémies et risque pandémique

Neuf ans après la découverte du virus MARV en 1967, le virus EBOV a été isolé et identifié pour la première fois en 1976 dans le Nord-Ouest de la République Démocratique du Congo (RDC) et le nom d'Ebola fut attribué en référence à la rivière du même nom qui coule près du village Yambuku, épicentre de cette épidémie. En réalité, cette découverte coïncide avec deux épidémies ayant sévi entre Juin et Novembre 1976 d'une part, dans les localités de Nzara, Maridi et Juba au sud du Soudan, et d'autre part dans les localités de Yambuku et Bumba dans l'actuelle province de la Mongala en RDC (CDC, 2024a; WHO Team, 1978; World Health Organization, 1978). Au vu des manifestations cliniques, les experts pensaient que ces épidémies étaient causées par le virus Marburg, aussi responsable de fièvres hémorragiques. Cependant, deux nouveaux virus morphologiquement similaires au virus Marburg mais différents sur le plan sérologique ont été isolées de ces épidémies, en RDC (ex-Zaïre) et au Soudan, dont ils étaient les causes respectives (Bowen et al., 1977; M. Johnson et al., 1977; Pattyn et al., 1977). Les 2 nouveaux virus ont été caractérisés comme 2 sous-types du virus Ebola (Kuhn, 2008). Le virus identifié au Zaïre était appelé « Zaïre ebolavirus (ZEBOV), actuellement **Ebola virus** (EBOV) » et celui du Soudan « Sudan ebolavirus (SEBOV), actuellement **Sudan virus** (SUDV) » (Kuhn et al., 2011). Les décennies suivantes, d'autres Orthoebolavirus, voire filovirus ont été découverts :

- **Reston virus** (RESTV) : découvert en 1989 dans une colonie des singes cynomolgus

(*Macaca fascicularis*) provenant des Philippines et maintenus dans une installation de quarantaine à Reston, en Virginie, aux Etats-Unis (Mary E. G. Miranda et al., 1991). Il s'agit de la seule espèce présente en Asie. Ce virus ne s'est montrée pathogène que pour le singe macaque et le porc (Barrette et al., 2009; Jahrling et al., 1990) et ne cause que des infections asymptomatiques chez l'homme (M. E. G. Miranda & Miranda, 2011).

- **Tai Forest virus** (TAFV) : détecté pour la première et seule fois chez une éthologue Suisse. L'autopsie d'un chimpanzé trouvé mort en Novembre 1994 au parc national de Taï, en République de Côte d'Ivoire aurait été le facteur d'exposition au virus (B. Le Guenno et al., 1995).
- **Bundibugyo virus** (BDBV) : mentionné pour la première fois lors d'une flambée de fièvre hémorragique virale qui s'est déclarée dans les cantons de Bundibugyo et de Kikyo du district de Bundibugyo, en Ouganda, en août 2007 (Wamala et al., 2010; MacNeil et al., 2010). Des échantillons de sang des cas suspects ont été envoyés au CDC Atlanta, où la présence d'un virus a été confirmée en novembre 2007 (Wamala et al., 2010; MacNeil et al., 2010).
- **Bombali virus** (BOMV): récemment décrit en 2018, et détecté chez des chauve-souris insectivores (*Chaerephon pumilus* et *Mops condylurus*) retrouvées à Bombali, district en Sierra Leone (Goldstein et al., 2018), mais jusqu'à ce jour, aucune infection humaine n'a encore été décrite.

Concomitamment à la découverte de ces nouvelles souches, d'autres émergences d'EBOV et de SUDV ont sévi, faisant des orthoebolavirus, le genre le plus important dans la santé globale et responsable du plus grand nombre d'épidémies en population humaine d'ampleurs et impacts notables (***Tableau 4***).

Entre 1995 et 2008, à la suite d'un silence d'environ 20 ans, le virus Ebola a causé des épidémies de petite taille circonscrites à trois pays d'Afrique Centrale, la RDC, la République du Congo (RC) et le Gabon. S'en suivra une importation de la maladie en Afrique du Sud en

provenance du Gabon, par le biais d'un professionnel de soins, qui y prenait en charge des patients, qui avait voyagé et a développé des signes ; elle a donné lieu à une transmission nosocomiale chez une infirmière qui soignait le patient et qui en est décédée. En 2014, surgit la grande épidémie d'Afrique de l'Ouest qui a émergé en Guinée, et qui s'est propagé dans plusieurs pays de la région, principalement dans les pays frontaliers comme la Sierra Leone et Libéria, mais il y a eu aussi des cas au Nigéria, au Mali et au Sénégal et quelques cas sporadiques exportés en dehors du continent. Hors d'Afrique, à de circonstances diverses, des cas ont été notés et confirmés en Italie, Espagne, Royaume-Uni, Etats -Unis durant l'épidémie de 2013-2016. En outre, les cas de MVE ont été rapportés en Russie à 2 reprises suite à des contaminations aux laboratoire. Enfin, il a été confirmé aux Etats - Unis, des cas asymptomatiques de Reston (CDC, 2024a; Dembek et al., 2024). En RDC, se sont également succédés des épidémies différentes alternant à Est et à Ouest du pays, avec l'épidémie de 2018-2020 qui est restée la plus importante de l'histoire du pays qui paie le plus lourd tribut (Barry et al., 2018; Kinganda-Lusamaki et al., 2021; Mbala-Kingebeni et al., 2019, 2021; Oloniniyi et al., 2017).

Cette historique de la succession d'épidémies à plusieurs milliers de kilomètres de sa niche ou de son lieu d'émergence et entrainer des cas sécondaires demontre ainsi le potentiel pandémique dans le contexte actuel d'un pathogène induisant une pathologie fatale le plus souvent. Par conséquent, le virus Ebola a été ajouté dans la liste des 10 pathogènes prioritaires de l'OMS pour lesquels la recherche doit être priorisée(WHO, 2024b).

L'orthoebolavirus le plus mortel demeure le virus Ebola (EBOV) puisqu'il est associée à un taux de mortalité de 50-80% (CDC, 2024a; É. Leroy & Maganga, 2018). Somme toute, la RDC a à son actif 15 épidémies de MVE déclarées dont 14 causées par le virus Ebola et 1 par le virus Bundibugyo.

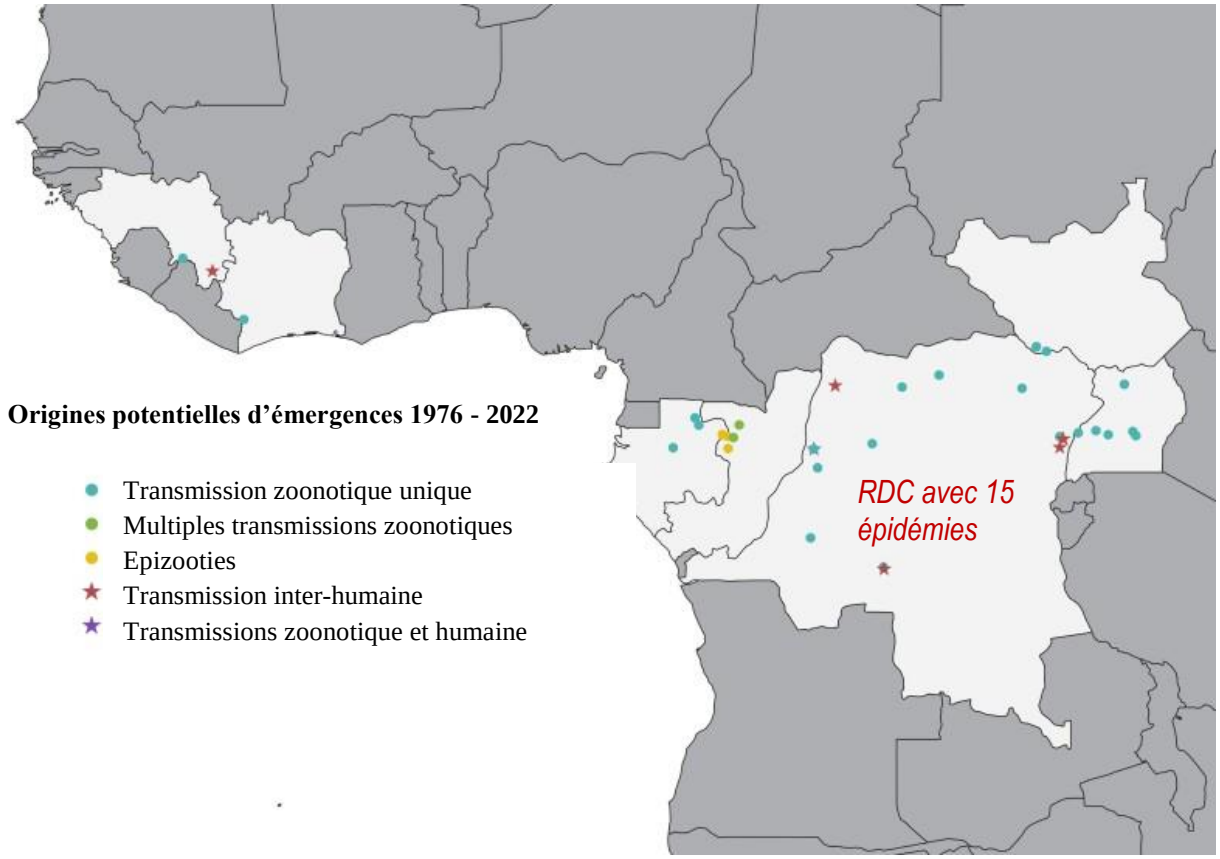


Figure 10 *: Lieux d'émergence du virus Ebola 1976-2022*

Les emplacements et les origines potentielles de chaque épidémie de maladie à virus Ebola sont indiqués. La résurgence potentielle de la transmission interhumaine s'est généralement produite à proximité des lieux des éclosions précédentes (Judson & Munster, 2023)

Tableau 4 *: Historique des épidémies importantes d'Ebola 1976-2023 adapté de (CDC, 2024a; Dembek et al., 2024; Judson & Munster, 2023)*

Année (Mois)	Pays (lieu d'émergence)	Origine présumée	Virus	Cas confirmés	Décès	(TL)(%)	Durée (jours)
1976	Sud-Soudan (Nzara)	Zoonotique	SUDV	284	151	53	151
1976	RDC(Zaïre) (Yambuku)	Zoonotique	EBOV	318	280	88	66
1977	RDC(Zaïre) (Bonduni, tandala)	Epidémie de Yambuku	EBOV	1	1	100	
1979	Sud-Soudan (Nzara)	Zoonotique	SUDV	34	22	64	65
1989	Etats-Unis d'Amérique (U.S.A) (Virginie, Reston).	Zoonotique (primates non humains)	RESTV	4 (asymptomatiques)	0	0	
1989	Philippines	Zoonotique (*Cynomolgus macaques*)	RESTV	3 (asymptomatiques)			
1992	Italie (Sienna)	Zoonotique	RESTV	0			
1994	Côte d'Ivoire (Forêt Taï)	Zoonotique (chimpanzée)	TAFV	1	0	0	
1994-1995	Gabon (Mékouka)	Zoonotique	EBOV	51(ou 52)	31	61	179
1995	DRC(Zaïre) (Kikwit)	Zoonotique	EBOV	315	254	81	191
1996-1997	Gabon (Mayibout et Booué)	Zoonotique	EBOV	91	66	73	64
1996	Afrique du Sud	Transmission humaine	EBOV	2	1	50	
1996	Etats-Unis d'Amérique	Primate non humain	RESTV	0	0		
1996	Philippines	Primate non humain		0	0		
1996	Russie	Laboratoire		1	1		
2000-2001	Ouganda (Rwot-Obillo, Gulu)	Zoonotique	SUDV	425	224	53	137
2001-2002	Gabon (Mendemba)	Zoonotique	EBOV	65	53	81	148
2001-2002	Republique du Congo (Olloba)	Zoonotique	EBOV	59	44	75	171

Année (Mois)	Pays (lieu d'émergence)	Origine présumée	Virus	Cas confirmés	Décès	(TL)(%)	Durée (jours)
2003 (Janvier – Juin)	Republique du Congo (Yembelangoye ; Mvoula et Mbandza)	Zoonotique	EBOV	178 (2 épidémies)	157	88	52, 49
2004 (Avril-Juin)	Soudan (Yambio)	Zoonotique	SUDV	17	7	41	72
2004	Russie	Laboratoire		1	1		
2005 (Avril-Mai)	Republique du Congo (Parc d'Odzala)	Zoonotique	EBOV	12	10	83	39
2007 (Août-Décembre)	Ouganda (Bundibugyo ; Kabango)	Zoonotique	BDBV	131	42	32	141
2007 (Septembre-Novembre)	DRC (Luebo et Mweka)	Zoonotique	EBOV	264	187	71	120
2008 – 2009	DRC (Mweka et Luebo)	Zoonotique	EBOV	32	15	47	34
2008	Philippines	Zoonotique(porcs)	RESTV	6 (asymptomatiques)	0	0	
2011	Ouganda (Nakisamata)	Zoonotique	SUDV	1	1		
2012	Ouganda (Kibaale, Jinja, Nakasongola et Luwero)	Zoonotique	SUDV	17	7	41	
2012	DRC (Isiro)	Zoonotique	BDBV	38	13	34	203
2014	DRC (Boende, Ikanamongo)	Zoonotique	EBOV	66	49	71	103
2013-2016	Guinée (Meliandou)	Zoonotique	EBOV	3814	2544	67	811 (total pour les 3 pays)
2014-2016	Liberia		EBOV	10678	4810	45	
2014-2016	Sierra Leone		EBOV	14124	3956	28	
2014	Mali		EBOV	8	6	75	78
2014	Nigeria		EBOV	20	8	40	90
2014	Etats-Unis		EBOV	4	1	25	
2017	DRC (Likati)	Zoonotique	EBOV	8	4	50	53
2018	Sierra Leone	Chauves-souris	BOMV	0	0	0	

Année (Mois)	Pays (lieu d'émergence)	Origine présumée	Virus	Cas confirmés	Décès	(TL)(%)	Durée (jours)
2018	DRC (Bikoro, Iboko – Impenge)	Zoonotique	EBOV	54	33	61	47
2018-2020	DRC**, Ouganda*** (Mangina)	Zoonotique	EBOV	3470	2287	66	695
2020	DRC (Mbandaka)	Zoonotique	EBOV	130	55	42	171
2021	DRC (Butembo)	Épidémie 2018-2020	EBOV	12	6	65	86 - 70
2021	Guinée (Gouéké)	Épidémie 2013-2016	EBOV	23	12	52	126
2021	DRC (Butsili)	Épidémie 2018-2020	EBOV	11	7		
2022	DRC (Mbandaka)	Zoonotique	EBOV	6	6	100	73 - 37
2022	DRC (Beni)	Épidémie 2018-2020	EBOV				
2022-2023 (Sep- Jan)	Ouganda (Mubende)	Zoonotique	SUDV	164	55	34	114
Total (N)/Moyenne(M)				T =34897	T=15334	M = 44%	

* Infections contractées en laboratoire et réinfections omises. ** L'épidémie s'est étendue dans 3 provinces en RDC : Le Nord-Kivu, l'Ituri et le Sud-Kivu

*** 4 cas confirmés en Ouganda suite aux mouvements transfrontaliers, mais tous décédés en RDC, ils ont donc été inclus dans le nombre des cas de la RDC.

BDBV = Bundibugyo virus (*espèce Orthoebolavirus bundibugyoense*), BOMV = Bombali virus (*espèce Orthoebolavirus bombaliense*), EBOV = Ebola virus (*espèce Orthoebolavirus zairense*), RDC = République Démocratique du Congo, RESTV = Reston virus (*espèce Orthoebolavirus restonense*), SUDV = Sudan virus (*espèce Orthoebolavirus sudanense*), TAFV = Taï Forest virus (*espèce Orthoebolavirus taiense*), TL = Taux de létalité

1.3. Evolution du virus Ebola

L'analyse phylogénétique des génomes des orthoebolavirus et orthomarburgvirus indiquerait une circulation datant de plusieurs siècles estimés à environ 10 000 ans (Suzuki & Gojobori, 1997). En 2014, la comparaison de séquences des cinq espèces du genre orthoebolavirus estimait l'âge de l'ancêtre commun à 1 257 ans (Y. H. Li & Chen, 2014).

1.3.1. Taux de mutation

La réplication virale entraine des erreurs qui sont incorporées dans le génome viral à travers les mutations. Le taux de mutation est donc typiquement exprimé en nombre de mutations par site, par événement de réplication. Le taux de mutation des virus à ARN tels que l'EBOV est largement déterminé par l'ARN polymérase virale dépendante de l'ARN, qui manque d'activité de relecture. Les taux de mutation pour le virus Ebola seraient comparable à celui d'autres virus à ARN monocaténaires et seraient susceptible d'être similaire pour tous les variants de l'épidémie d'EBOV. Les mutations permettent également de définir les lignées circulantes ainsi qu'il a par exemple été observé durant l'épidémie de 2013-2016, 3 lignées : A (Guinée), SL2 (la plus répandue dans les 3 pays) et SL3 (Sierra Leone et Libéria) (Holmes et al., 2016).

1.3.2. Taux d'évolution

Le taux d'évolution d'un virus est la vitesse à laquelle les nouveaux variants apparaissent et se propagent dans la population virale. Il est important de noter que les taux d'évolution des virus à ARN peuvent dépendre pour un même virus de plusieurs facteurs à savoir (i) l'échelle de temps sur laquelle ils sont mesurés (plus élevés à court terme, par exemple lors d'épidémies), (ii) la sélection naturelle probablement relâchée chez l'homme à la suite d'une transmission interspécifique et/ou (iii) le fait que le virus Ebola peut subir plus de réplications par unité de temps pendant les épidémies humaines que chez les espèces réservoirs. A titre d'exemple, les estimations du taux d'évolution du virus Ebola pour l'épidémie de 2013-2016 convergent vers une valeur moyenne d'environ 1.2×10^{-3} [1.13×10^{-3}- 1.27×10^{-3}] ; alors

qu’ils sont plus ralentis dans l’épidémie de Boende (RDC) de 2014, indiquant une histoire évolutive dans un réservoir différent (Holmes et al., 2016). Toujours au cours de la grande épidémie de l’Afrique de l’Ouest et plus tard en RDC, des taux d'évolution plus faibles ont également été observés dans les cas suspects de transmission par des survivants humains de la MVE (Holmes et al., 2016; Kinganda-Lusamaki et al., 2021). Ainsi, les taux d'évolution faible seraient indicateurs des transmissions probables de survivants de la MVE pour certaines chaines de transmissions pendant une épidémie.

1.3.3. Taux de substitution de nucléotide

Holmes et al (Holmes et al., 2016) ont décrit le taux de substitution comme le taux à long terme auquel les variants génétiques se fixent dans une lignée virale sur des échelles de temps évolutives. Ce taux décrit la fréquence à laquelle les mutations se fixent dans les populations au fil du temps et, pour le virus Ebola, la meilleure approximation est le taux observé entre les épidémies. Ce taux sera également généralement inférieur au taux d'évolution à court terme, car de nombreux variants circulant dans les épidémies seront finalement éliminés. De plus, la saturation – changements répétés au même site – réduira davantage le taux de substitution mesuré. Ce taux reflète les processus évolutifs à long terme, y compris les contraintes sélectives sur le génome, l'adaptation spécifique à l'espèce hôte et les résultats cumulatifs de la dérive génétique

1.3.4. Taux de fixation

Une complexité supplémentaire dans l'estimation des taux chez les virus à ARN est que le concept de « fixation » de la génétique des populations, qui est au cœur de la définition de la substitution, est mal défini (Holmes et al., 2016). Les mêmes auteurs renchérissent en expliquant que chez les organismes à évolution lente, les événements de fixation peuvent généralement être distingués des polymorphismes en analysant les sites nucléotidiques individuels au sein des espèces et entre elles. Cependant, dans les virus à ARN à évolution rapide, la fixation peut être décrite comme se produisant (i) au niveau des hôtes individuels au

cours de l'infection, (ii) dans des variants ou lignées virales au sein de réseaux épidémiologiques ou de lieux géographiques spécifiques (tels que les différentes lignées d'EBOV générées pendant l'épidémie de MVE de 2013-2016), (iii) dans des méta-populations mondiales et (iv) entre différents virus(Holmes et al., 2016).

Bien que peu probable, l'accumulation de mutations et la sélection naturelle, pourraient conduire à une transmission aéroportée du virus Ebola. Il reste important de surveiller l'évolution virale et les mutations avec sélection positive d'épitopes cruciaux afin d'évaluer la transmission ou la perte possible d'efficacité des traitements expérimentaux et des tests diagnostiques basés sur le séquençage du génome viral (De La Vega et al., 2015).

1.4.Réservoir animal

Bien que le paradigme incluant la notion de réservoir humain soit à considérer au vu de la problématique de la persistance du virus chez les survivants de la MVE, la grande majorité des émergences/épidémies est le résultat d'une transmission zoonotique. Au vu de la distribution des lieux d'émergences virales (***Figure 10***), le réservoir animal pourrait certainement se trouver dans la forêt tropicale en Afrique Centrale et/ou en Afrique de l'Ouest. Les perturbations démographiques et de la biodiversité consécutive à l'agriculture, la déforestation, la chasse, les conflits tribaux ou militaires, dérèglement climatique et d'autres changements affectant les écosystèmes (installation de barrages, augmentation du niveau des eaux, rivières, conduisant aux inondations, etc.), sont associées à l'augmentation de la fréquence des épidémies observées ces dernières décennies. A ce jour, bien que les réservoirs naturels des virus Ebola demeurent encore inconnus dans leur exhaustivité, plusieurs évidences placeraient les chauves-souris comme probable réservoir.

1.4.1. Role de chiroptères

Les chauves–souris sont très diversifiées et constituent après les rongeurs, le deuxième

groupe de mammifères avec le plus d'espèces (Wong et al., 2019). Elles sont classées en 2 sous-ordres : *Yinpteochiroptera* (ou Pteropodiformes) *et Yangochiroptera* (Vespertilioniformes) (Arthur & Lemaire, 2009). Les Pteropodiformes regroupent 4 familles des chauves–souris : *Pteropodidae* (frugivores), *Hipposideridae, Rhinolophidae* et *Megadermatidae*. Les Vespertilioniformes comprennent les autres familles (Monadjem, 2010). Cette diversification élevée conduit à une variété des types cellulaires et de récepteurs qui font des chauves – souris de potentiels hôtes d'une large variété de virus et réservoirs avérés d' agents pathogènes tels *Marburgvirus, Henipahvirus, Lyssavirus* (Daszak et al., 2011; E. M. Leroy et al., 2005a; Pourrut et al., 2009; Shipley et al., 2019). Ainsi elles sont soupçonnées réservoir des virus Ebola et font l'objet de recherches extensives(Amman et al., 2012; Kuhn, 2008a; Swanepoel et al., 2007; Towner et al., 2009) pour plusieurs raisons dont certaines sont listées ci-dessous :

1. Lors de la première épidémie causée par le virus Sudan en 1976, le cas index dans la région de Maridi travaillait dans une usine de cotons infestée de chauve-souris (WHO/International Study Team, 1978).
2. En 1996, des inoculations expérimentales du virus Ebola isolé à Kikwit sur 24 différentes espèces de plantes et 19 espèces d'animaux, seules les chiroptères (*Mops condylurus, Chaerephon pumila* et *Epomophorus wahlbergi*), ont maintenu la réplication et la circulation du virus à des titres élevés sans nécessairement développer la maladie (Robert Swanepoel et al., 1996). Le virus Ebola avait également été isolé dans les fèces d'une chauve-souris frugivore 21 jours après l'inoculation (Robert Swanepoel et al., 1996). Par rapport à la même épidémie, des migrations de chauves-souris auraient été signalées à l'issue des investigations réalisées.
3. En 2005, des anticorps IgG et fragments d'ARN viral Ebola ont été détecté dans des organes (foie et rate) des trois espèces de chauve-souris frugivores

(*Epomops franqueti*, *Hypsignathus monstrosus* et *Myonycteris torquata*) capturées au Gabon (E. M. Leroy et al., 2005b).

4. En 2007 et 2008, les épidémies successives à Mweka et Luebo, en RD Congo, seraient liées à la migration des chauves-souris (E. M. Leroy et al., 2009).
5. Entre 2014 et 2016, lors de l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest, il a été rapporté que le cas index était un enfant qui aurait manipulé une chauve-souris probablement infectée (Mari Saez et al., 2015). Cependant, le virus EBOV n'a jamais été isolé des échantillons de chauves-souris de la guinée, mais le virus Bombali, a été nouvellement détecté chez des *Yangochiroptera* (*Chaerephon pumilus* et *Mops condylurus*) retrouvées dans certaines habitations dans le district de Bombali, en Sierra Leone (Goldstein et al., 2018).
6. Plusieurs travaux réalisés en Afrique Centrale et de l'Ouest, niche géographique probable du réservoir du virus Ebola, ont permis de mettre en évidence des niveaux élevés de séroprévalence des orthoebolavirus dans des échantillons de chauves-souris essentiellement chez les frugivores (Lacroix et al., 2021a; Peeters et al., 2023).

Cependant, le rôle des chauves-souris dans la transmission du virus Ebola reste à élucider et préciser par des études qui permettront d'isoler la forme infectieuse et prouver la persistante de l'infection chez les chauves-souris en l'absence de maladie.

1.4.2. Rôle des Primates non-humains

Les primates non-humains ont été impliquées dans l'émergence de certaines des épidémies. En effet, comme dit plus haut, le Reston virus a été importé aux États-Unis, et en Italie en 1989-1990 et 1992, respectivement, à partir des macaques infectés en provenance des Philippines en Asie (Hayes et al., 1992; Jahrling et al., 1990; World Health Organization, 1990).

Ensuite, la seule infection à Taï Forest virus connue à ce jour s'est produite en 1994 en Côte d'Ivoire à la suite d'une nécropsie d'un chimpanzé mort (B. Le Guenno et al., 1995; Formenty et al., 1999). En outre, le contact avec des primates probablement infectés ou la forte mortalité des primates dans la forêt de Minkébé au Gabon ayant conduit à la diminution des populations des chimpanzés et gorilles, aurait été associée aux trois épidémies de virus Ebola survenues entre 1994 et 1996 au Gabon (Huijbregts et al., 2003;Georges et al., 1999; Georges-Courbot, 1997). Ces différentes épidémies survenues au Gabon et au Congo (Brazzaville) entre 1994 et 2003 ont été associées à une diminution importante de la population des gorilles et des chimpanzés dans les régions affectées (Bermejo et al., 2006; Lahm et al., 2007; E. M. Leroy et al., 2004; Rouquet et al., 2005). Le cas index de l'épidémie du virus Sudan en 2004 à Yambio au Soudan, a probablement été infecté au cours de la manipulation d'un babouin infecté (World Health Organization., 2005). Enfin, le cas index de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de 2014 à Boende, en RD Congo, aurait été infectés par un primate non humain (Maganga et al., 2014). Cependant, il est admis que les primates ne supportent pas la réplication du virus sans développer des manifestations cliniques graves du virus qui a un taux de morbidité et de létalité élevés (Bermejo et al., 2006; Geisbert et al., 2003; Lahm et al., 2007; E. M. Leroy et al., 2004), ce qui restreint leur rôle dans la transmission et non comme réservoir, commen en temoigne aussi la faible seroprevalence observe chez les singes aux Cameorun et RDC (Ayouba et al, 2019).

1.4.3. Rôle des céphalophes et autres viandes de brousse

En plus de la manipulation des carcasses de primates non-humains, celle des céphalophes et autres viandes de brousses a été également mentionnée, comme durant les épidémies du virus Ebola survenues dans les zones forestières du Gabon et du Congo (Brazzaville) entre Octobre 2001 et Juillet 2002 (Rouquet et al., 2005; The international outbreak response team, 2003). Une carcasse de céphalophe a été testée positive au virus Ebola (Rouquet et al., 2005). Enfin, le cas index de l'épidémie de la maladie à virus Ebola de

2017 à Likati en RD Congo, auraient été infectés par la faune sauvage, à savoir un Potamochère roux (*Potamochoerus porcus*) (Gryseels et al., 2020).

Certes, ces observations suggèrent l'implication des viandes de brousse dans les émergences d'épidémies passées et la transmission du virus, mais elles ne suffisent pas à confirmer l'hypothèse selon laquelle elles seraient des réservoirs des virus Ebola.

1.4.4. Rôle d'autres espèces

Depuis les premières épidémies en 1976, plusieurs autres espèces ont été également été testées à la recherche du réservoir du virus Ebola, tels que : des rongeurs, des oiseaux, des reptiles et arthropodes (Germain M, 1978; Kuhn, 2008a; Leirs et al., 1999; Reiter et al., 1999). Notons également que, sur base de la similitude entre la glycoprotéine du virus EBOV et celle des reptarénavirus connus infectant les serpents, des travaux récents ont suggéré que le virus EBOV peut infecter certaines cellules de boas et pythons, et se répliquer sans induire des effets cytopathogènes (Fedewa et al., 2018).

En bref, le réservoir des virus Ebola demeure encore inconnu malgré les différentes études réalisées incluant plusieurs espèces de vertébrés, invertébrées et des plantes, principalement dans les régions touchées par les épidémies à virus Ebola. Cependant, la somme de ces recherches ont également permis d'établir les modèles sur plusieurs animaux dont les rongeurs, le porc et les primates non-humains (PNH), qui apportent des connaissances sur la pathogénèse.

1.5.Transmission

Les filovirus sont des pathogènes zoonotiques maintenus dans des réservoirs animaux, avec des introductions dans les populations d'autres espèces animales mammifères ou humaines qui seraient des hôtes intermédiaires ou amplificateurs (Feldmann et al., 2020). Ainsi,

chez l'homme, nous assistons premièrement à une transmission zoonotique après contact avec un animal infecté par exemple, qui sera à la base des épidémies qui occasionneront des transmissions interhumaines, pouvant affecter plusieurs personnes et créer une épidémie majeure si le contexte le favorise (population très dense, détection et contre-mesures inefficaces). La transmission interhumaine se fait généralement par contact direct à travers une solution de continuité cutanéomuqueuse et orifices naturels (yeux, nez ou bouche) avec fluides organiques d'une personne infectée (sang, urines, salive, sueur, matières fécales, vomissures, lait maternel et sperme). Ainsi, est considéré hautement infectieux tout produit biologique comme le sang, l'écoulement nasal, le mucus d'expectoration, le liquide diarrhéique, les vomissures ou les écoulements génitaux. Les matériels souillés par ces produits biologiques sont susceptibles d'entraîner une contamination au travers des muqueuses, des peaux abrasées, voire des peaux saines. Les larmes, la salive et la sueur présentent un risque relativement faible (Formenty et al., 2006). La transmission verticale du virus de la mère à l'enfant par l'intermédiaire du lait a été également observée au cours des dernières épidémies (Sissoko et al., 2017). En revanche, malgré la présence de particules virales dans le tractus respiratoire des patients, la possibilité d'une transmission par voie aérienne reste très peu probable (Mekibib & Ariën, 2016).

La contamination peut survenir à partir soit d'une personne malade ou le corps d'une personne infectée décédée. Les rites funéraires ont constitué des évènements d'amplification d'épidémies et de dissémination du virus du fait d'une part de fortes concentrations virales sur les dépouilles mortelles et longtemps après le décès (Prescott et al., 2015), et d'autre part de multiples expositions au corps et comportements à haut risque tels les toilettes et attouchements des morts par leurs proches.

Du fait de la persistance possible du virus dans certains fluides corporels dont le sperme d'un patient guéri plusieurs mois après l'épisode infectieux, la transmission peut se faire

également d'un survivant Ebola, essentiellement par voie sexuelle, via le sperme (CDC, 2024a; Keita et al., 2019; Malvy et al., 2019a).

La transmission indirecte se fait par du matériel contaminé occasionnant par exemple des infections nosocomiales ou en laboratoire, survenant le plus souvent en début d'épidémie par l'utilisation de matériel médical ou chirurgical contaminé (CDC, 2024a) ainsi qu'en l'absence de moyens de protection et de désinfection (gants, masques, blouses, alcool…). En effet, les mesures de Prévention et Contrôle de l'Infection (PCI) sont faibles en début d'épidémie, avant l'identification virale, la confirmation de l'épidémie et la mise en place de la riposte. Les autres patients hospitalisés pour un autre motif, sont hautement exposés et à risque, et se contaminent dans les mêmes circonstances que le personnel de santé, faisant des formations sanitaires et des laboratoires sous-équipés et sans moyens de protection, des zones d'amplification d'épidémies. Dans un contexte quasi similaire, il faudrait également intégrer certaines professions à savoir :

- tradipraticiens quand ils pratiquent des thérapies de groupes, ou ont recours à des injections et/ou des scarifications avec du matériel non stérile, et sur plusieurs patients (A. Georges et al., 1999).
- Les pasteurs ou chefs spirituels qui comme les tradipraticiens sont souvent les premiers à entrer en contact avec les patients avant qu'ils ne soient transférer à l'hôpital (Kinganda-Lusamaki et al., 2021) ;
- les conducteurs de taxi-moto qui transportent les patients malades aux formations sanitaires et peuvent transmettre à plusieurs autres (Kinganda-Lusamaki et al., 2021)

La ***Figure 11*** résume la transmission et différentes étapes dans l'évolution des émergences de la MVE et sa persistance dans la population humaine.

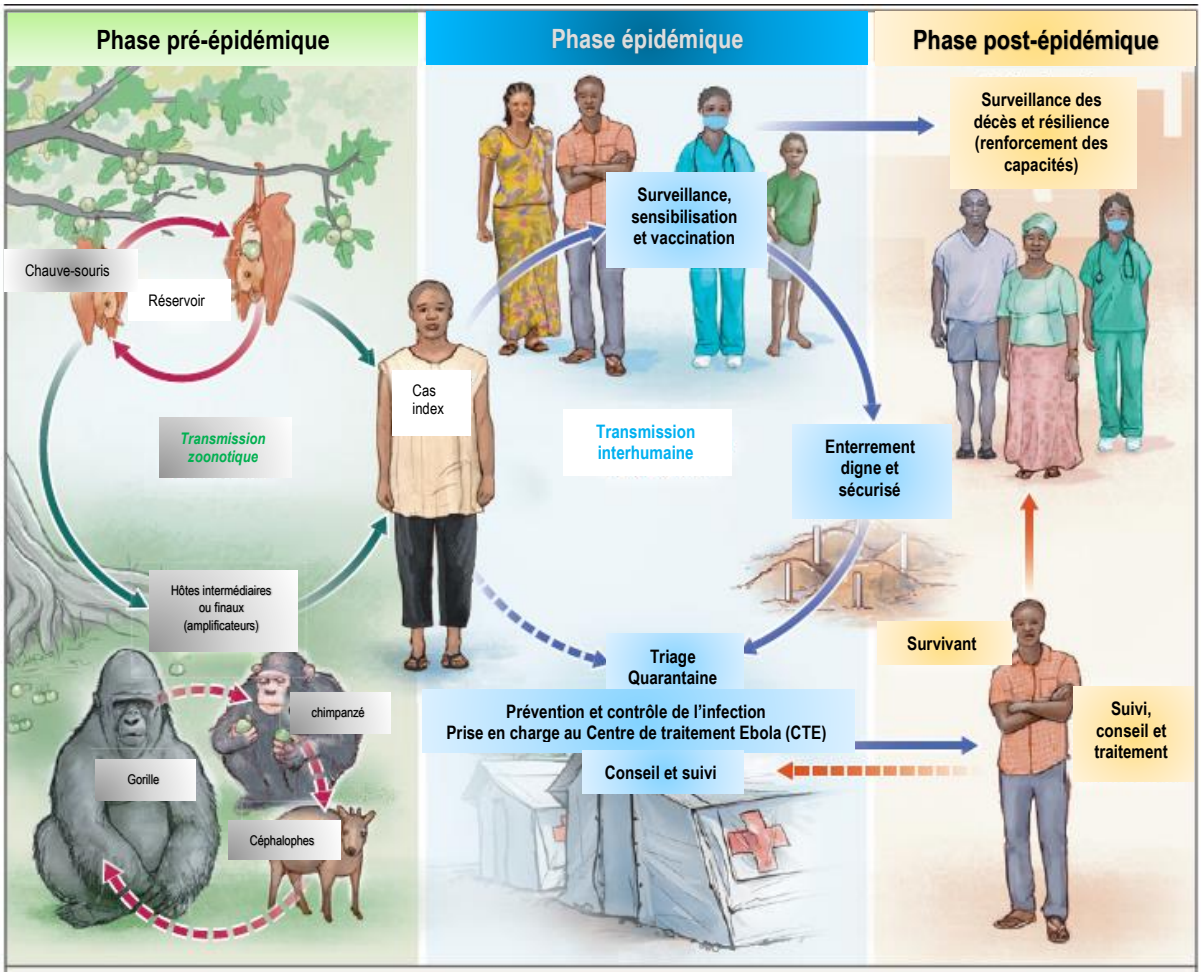


Figure 11 : *Transmission et étapes d'évolution vers une épidémie de la maladie à virus Ebola adaptée de (Feldmann et al., 2020)*

1.6. Pouvoir pathogène des virus Ebola et pathogénèse de la MVE

Les virus Ebola sont à l'origine d'une maladie systémique, liée à la virémie qui entraîne une immunosuppression, des réponses inflammatoires anormales avec extravasation importante, une rupture des barrières muqueuses et une défaillance multiviscérale, et d'importantes pertes de fluides et d'électrolytes, débouchant souvent vers la mort (Malvy et al., 2019a). Par ailleurs, les survivants développent une immunité adaptative spécifique au virus, celle-ci pouvant persister dans les sites immunitaires privilégiés, tels que les chambres de l'œil, les gonades masculines et les glandes mammaires.

Le virus pénètre dans l'organisme par voie parentérale, à travers la peau et les muqueuses il présente un large tropisme pour différentes cellules. Ce manque apparent de spécificité est probablement dû à la large distribution des lectines de surface cellulaire impliquées dans la fixation de la surface virale dans la liaison des GPs de la surface virale. Les macrophages, les monocytes et les cellules dendritiques sont les premières cibles de l'infection virale en raison de leur forte activité migratoire ces cellules jouent un rôle clé dans la propagation du virus depuis le site initial de l'infection vers les ganglions lymphatiques régionaux, le foie, la rate et les glandes surrénales les virus utilisent de multiples mécanismes pour échapper à la détection et affaiblir les réponses immunitaires innées.

Les protéines structurales, VP24 et VP35, sont cruciales pour échapper à l'immunité innée de l'hôte et inhiber les réponses de l'interféron de type I. La protéine sGP inhibe la migration des leucocytes. L'infection virale s'accompagne d'une libération massive de médiateurs pro-inflammatoires et de substances vasoactives, qui favorisent l'inflammation et la coagulation, mais qui rendent en même temps le système immunitaire incapable d'empêcher efficacement la propagation du virus.

Des études réalisées sur les PNH ont permis de constater un tropisme important du virus pour les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) dans les tissus lymphoïdes, les hépatocytes, les cellules endothéliales, les tissus des glandes surrénales et les cellules épithéliales (Malvy et al., 2019a). L'infection de ces différents types de cellules induit la stimulation des cascades de cytokines et de chimiokines dans les CPA, l'apoptose des lymphocytes, la nécrose des hépatocytes et l'activation des cellules endothéliales. Les phases initiales de réplication ont lieu dans les macrophages qui disséminent le virus par 2 moyens : (i) par la circulation lymphatique menant le virus aux ganglions lymphatiques et (ii) par la circulation sanguine permettant l'atteinte rapide du foie et de la rate, et l'infection des cellules de Kupffer et des cellules dendritiques. Les macrophages atteints et cellules infectées vont produire des chimiokines pro-inflammatoires et des cytokines (Interleukines -1,6,8 et 10, MCP-1, MIP-1α,

MIP-1β et TNFα) dont certaines amplifieront la boucle en recrutant d'autres macrophages dans les zones d'infection, demeurant des cellules cibles susceptibles d'être infectées. L'expression des protéines virales bloque en amont les voies de signalisation de l'immunité innée, et par conséquent, inhibe la maturation des cellules dendritiques et l'induction de l'immunité acquise par le blocage de la présentation de l'antigène aux lymphocytes T-CD4 et T-CD8 (Falasca et al., 2015). Les populations de cellules tueuses seraient également impactées négativement au cours de l'infection en se basant sur données issus des modèles animaux (Geisbert et al., 2003; Lüdtke et al., 2017a). La lymphopénie aux cellules TCD4 pourrait expliquer l'absence observée d'anticorps IgM et IgG spécifiques du virus Ebola chez les patients décédés. Cette dépression immunitaire facilite la dissémination du virus et l'infection des hépatocytes, les cellules corticales surrénaliennes et les cellules endothéliales du tissu conjonctif. La nécrose hépato-cellulaire pourrait diminuer la synthèse des protéines impliquées dans la coagulation qui constitue un des mécanismes expliquant les hémorragies en plus de la nécrose cortico-surrénalienne induisant les troubles de pression artérielle et les fuites vasculaires. On a émis l'hypothèse que les virus Ebolavirus VP40, GP1 et GP2 de l'Ebolavirus étaient capables d'activer les cellules endothéliales et d'altérer de manière significative la fonction de barrière. La coagulopathie serait donc multifactorielle et causée par une combinaison de l'activation de plusieurs facteurs, tels que : le système phagocytaire mononucléaire, l'agrégation et la consommation des plaquettes, l'activation de la cascade de coagulation, le déficit en facteurs de coagulation dû aux lésions hépatiques et endothéliales.

Le rôle des comorbités dans la pathogenèse devrait également être investigué davantage pour des conditions sanitaires (carences nutritionnelles, avitaminoses, …) ou des pathologies fréquentes (paludisme, salmonelloses…) dans les lieux d'émergence de la maladie.

Plusieurs travaux ont démontré la persistance du virus dans les sanctuaires immunitaires tels que le cerveau, l'œil et les testicules impliquant entre autres le role des monocytes/macrophages CD68+ dans la persistance virale dans les organes précités (œil, le

cerveau et l'épididyme) avec un risque de transmission sexuelle (Lüdtke et al., 2017b; McElroy et al., 2018b).

1.7. Lésions histopathologiques et rôle des macrophages

Les lésions histopathologiques rencontrées dans les tissus sont consécutives à l'effet cytopathogène du virus sur les cellules et explique les symptômes observés au cours de la maladie, voire certaines séquelles. La plupart des lésions étudiées et décrites découlent des macrophages (lignées résidente ou dérivée des monocytes) qui jouent un rôle clés dans la pathogénèse de la MVE telle que mentionné plus haut. La polarisation des macrophages contribue également à la susceptibilité à l'infection au virus Ebola, car les macrophages M1 seraient protégés de l'infection contrairement aux M2 qui accroissent la susceptibilité à l'infection (Wanninger et al., 2022). Les macrophages réagissent à l'infection par une production de cytokines dérégulée, contrairement aux cellules dendritiques, qui présentent une activation altérée après l'infection (Bodmer et al., 2024). Le type et intensité des lésions varient d'un organe à un autre.

Au niveau du foie, l'infection est associée à l'hyperplasie des cellules de Kupffer et au dépôt de fibrine. De plus, les descriptions histologiques des macrophages abondants dans le foie au cours de la MVE, comprennent la notation d'un changement vers la dégénérescence des macrophages à mesure que la maladie progresse. Les macrophages spléniques contiennent des débris nécrotiques de cellules. Des cellules géantes multinuclées ont été observées chez les souris (Spengler et al., 2018).

Au niveau pulmonaire, ont été notées soit des macrophages nécrotiques dans les ganglions lymphatiques et les follicules lymphoïdes des voies respiratoires, soit des accumulations de macrophages ont été signalées dans les alvéoles ainsi que leurs parois chez les PNH (Wanninger et al., 2022). De même, l'accumulation des macrophages infectés dans le système nerveux, les articulations, les glandes surrénaliennes, les glandes thyroidiennes, le

tractus urinaire et les tissus lymphoïdes, serait corrélée à certains signes cliniques aux dépens des localisations ci-haut mentionés.

Dans la sphère oropharyngée, une inflammation histiocytaire a été observée chez des cobayes Hartley consanguins exposés au virus EBOV (microscopie optique uniquement) dans quelques macrophages avec des inclusions intracytoplasmiques dans les glandes salivaires et autour des foyers de cellules acineuses nécrotiques dans la glande parotide, dont les foyers étaient positifs pour l'antigène du virus ou l'acide nucléique dans certains cas (Cooper et al., 2018). Sur le tractus gastro-intestinal, sont observés des macrophages nécrotiques dans les ganglions lymphatiques et les follicules lymphoïdes du tractus gastro-intestinal chez les PNH (Ryabchikova et al., 1999).

Au niveau des yeux, 3 formes d'uvéites ont été décrites : l'uvéite antérieure, l'uvéite postérieure et la panuvéite avec infiltrat riche en macrophages/monocytes au niveau des cellules du tissu sous-épithélial conjonctival, corps ciliaire, l'iris, la sclérotique près des angles iridocornéens chez les PNH (Jacob et al., 2020; Rosenbaum & Dick, 2018; Wanninger et al., 2022).

Les macrophages peuvent également jouer un rôle important dans la transmission sexuelle et des dysfonctionnements chez les survivants de la MVE de type orchite ou aménorrhée. Chez le sexe masculin, les travaux sur le *Macacus rhesus* survivant au 43e jour post-infection ont révélé la présence des monocytes/macrophages CD68+ dans le tissu conjonctif interstitiel de l'épididyme font partie des cellules de l'épididyme, dont certaines étaient positives pour l'antigène EBOV. Les débris cellulaires nécrotiques dans la lumière tubulaire de l'épididyme comprenaient des macrophages dégénérés (Zeng et al., 2017). Des macrophages positifs à l'antigène EBOV ont également été signalés dans l'interstitium épididymaire et dans la lamina propria du pénis. Des infiltrats de macrophages dans l'hypoderme du pénis et la sous-muqueuse de l'urètre après une infection par le virus Ebov ont également été signalés chez des macaques rhésus (D. X. Liu et al., 2022). Dans les tissus

reproducteurs féminins, dans un cas humain de BDBV, des macrophages circulants positifs à l'antigène viral ont été signalés dans le placenta, ainsi que des macrophages atypiques, qui avaient des noyaux d'apparence dégénérée, des bulles cytoplasmiques et des inclusions virales potentielles (aucun virion n'a été observé dans le tissu par microscopie électronique à transmission) (Muehlenbachs et al., 2017). Des macrophages positifs à l'antigène ou à l'acide nucléique d'EBOV ont été détectés dans le col utérin, la lamina propria ou la sous-muqueuse du vagin et les ovaires chez les PNH (D. X. Liu et al., 2022). Des inclusions de virus dans les macrophages stromaux ovariens ont également été signalées dans un modèle de macaque rhésus (Jaax et al., 1996). La présence de macrophages positifs pour le matériel viral ou de macrophages contenant des inclusions virales peut faire de ces cellules une source virale de transmission sexuelle ou verticale ou indiquer qu'elles contribuent à la réponse à l'infection dans ces tissus, ce qui pourrait moduler le développement de lésions aiguës ou chroniques des tissus reproducteurs causées par la MVE (Wanninger et al., 2022).

1.8. Profil clinique et biologique

1.8.1. Présentation clinique

Même si des patients pauci-symptomatiques ou asymptomatiques sont de plus en plus évoqués et détectés à la suite d'investigations des cas d'exposition à haut risque (ex. contacts directs avec des personnes infectées) (M. S. K. Diallo et al., 2019; Glynn et al., 2017), la maladie à virus Ebola se présente souvent sous un tableau clinique marqué de signes graves pouvant conduire au décès. Il semble évoluer habituellement en trois phases : une phase fébrile ou bénigne, une phase avec des manifestations gastro-intestinales et une phase des complications (Hunt et al., 2015; Kuhn, 2008a; Malvy et al., 2019a). En général, les infections humaines à filovirus se caractérisent par une maladie similaire, dont la gravité et le taux de létalité dépendent de l'espèce virale.

Les symptômes de la maladie apparaissent après une période d'incubation de 4 à 10 jours (entre 2 et 21 jours, en fonction de la dose infectieuse) (*Traité de virologie médicale*, 2019). La maladie se manifeste d'abord par de symptômes pseudo-grippaux (fièvre, céphalées, asthénie, myalgies, arthralgies, anorexie, nausées). D'apparition brutale, ces signes peu spécifiques font généralement diagnostique différentiel avec les maladies endémiques tel le paludisme ou la fièvre typhoïde. Il s'en suit un tableau clinique de gastro-entérite faits de vomissements et diarrhées, associée aux douleurs abdominales. Ces manifestations gastro-intestinales sont soit bénignes, se corrigeant après une réhydratation orale, soit sévères avec une perte hydro-électrolytique importante pouvant atteindre 10 litres par jour et nécessitant une réhydratation intraveineuse en urgence. Au cours de cette phase, la toux, la dyspnée, l'injection conjonctivale, le hoquet ou une douleur localisée (thorax, abdomen, muscles ou articulations) peuvent également être observés. La dysphagie, la douleur à la gorge et les ulcères buccaux sont d'autres symptômes tardifs observés au cours de la maladie à virus Ebola (WHO Ebola Response Team, 2014). Des éruptions cutanées non spécifiques et d'aspect maculo-papuleux ont été également rapportées (Blattner, Collin M Mortazie, Michael B. Murase, 2015; WHO Ebola Response Team, 2014).

Après ce stade, certains patients peuvent évoluer vers la guérison avec amélioration clinique du patient et l'apparition d'anticorps spécifiques ; tandis que d'autres vont évoluer vers la phase des complications avec des manifestations gastro-intestinales plus sévères associées aux signes hémorragiques, à une défaillance multi-viscérale, aux complications neurologiques (confusion, délire et convulsions) et à un état de choc (Kuhn, 2008a; Malvy et al., 2019a; Rojek et al., 2017). Des cas de méningites, d'encéphalite ou de méningo-encéphalites liée à la maladie à virus Ebola ont également été rapportés (de Greslan et al., 2016; Jacobs et al., 2016; Mukadi-Bamuleka et al., 2024; Sagui et al., 2015). Les patients totalement symptomatiques meurent généralement entre 6 et 16 jours après l'apparition des symptômes. La ***Figure 12*** synthétise l'évolution clinique et les complications.

Cependant, les conséquences à long terme (plusieurs mois) de l'infection peuvent persister sous la forme d'une infection récurrente, hépatite récurrente, lésions de la moelle épinière, uvéite, psychose ou perte de cheveux. Les données existantes sur le mécanisme pathologique de la maladie ont été obtenues par l'infection expérimentale d'animaux non humains et de rongeurs, ainsi que par des observations cliniques et de laboratoire recueilli lors des épidémies chez l'homme. Les données recueillies sur les épidémies précédentes montrent que les femmes enceintes semblent plus à risque de développer une maladie sévère et avec un taux de mortalité élevé (Mupapa et al., 1999; WHO Team, 1978). Elles sont également confrontées à un risque élevé de fausse couche et de mort-né (Bebell et al., 2018; Mupapa et al., 1999; WHO Team, 1978).

1.8.2. Evolution des tableaux cliniques au fil des épidémies

A sa découverte lors des premières épidémies en 1976, la maladie à virus Ebola a été décrite comme fièvre hémorragique virale à cause de la fréquence élevée des saignements de divers types : gastro-intestinaux, gingivaux, muqueux ou aux sites d'injection après ponction veineuse chez les patients infectés (World Health Organization, 1978). Le portrait des patients qui pouvaient saigner de tous les orifices naturels n'a pas été la caractéristique prédominante de la symptomatologie durant toutes les épidémies ; les signes hémorragiques étaient plus fréquents à Yambuku 1976 (78%), qu'à Kikwit 1995 (37%) et Boende 2014 (environ 40%) (Khan et al., 1999; Maganga et al., 2014; World Health Organization, 1978). Par contre, les manifestations gastro-intestinales étaient plus fréquentes avec parfois une absence de fièvre chez environ 10 % des patients suivis en Guinée durant l'épidémie de l'Afrique de l'Ouest entre 2014 et 2016 (Fitzpatrick et al., 2015; Kang et al., 2015; WHO Ebola Response Team, 2014). Durant l'épidémie de 2018-2020 en RDC, le profil était dominé par l'asthénie (63,9%), les maux de tête (61,3%), l'anorexie (57%), la fièvre (53,7%), les douleurs abdominales (50,2%) et l'arthralgie (34%) (Nkuba-Ndaye et al., 2022).

1.8.3. Profil biologique

Sur le plan biologique, les patients présentent une anémie de degré varié, une thrombocytopénie, une perturbation de la fonction rénale, une augmentation de l'Aspartate aminotransférase, une augmentation des concentrations de la créatine phosphokinase et d'amylase. Subséquemment à la pathogénèse et à la symptomatologie, l'hypokaliémie, l'hyponatrémie et l'hypocalcémie sont les troubles électrolytiques les plus fréquents (***Figure 12***) (Hunt et al., 2015; Jacob et al., 2020; Trial et al., 2017). Une acidose métabolique peut survenir, notamment en cas de choc et d'insuffisance rénale. Les tests de coagulation peuvent révéler un degré variable de coagulation intravasculaire disséminée. Une hypoglycémie potentiellement mortelle a été observée.

1.8.4. Surveillance et facteurs de gravité

Lors des épidémies précédentes, la majorité des cas graves avec un pronostic vital engagé ont présenté : des charges virales élevées, de la fièvre, une fatigue intense due à une atteinte musculaire sévère, une désorientation temporo-spatiale, des signes hémorragiques, de la diarrhée et des perturbations importantes de la fonction rénale et hépatique (Hartley et al., 2017; Schieffelin et al., 2014). L'état du patient, atteint de la maladie à virus Ebola, peut également être aggravé par la présence des comorbidités (hypertension artérielle, diabète, cancer, etc.) ou des infections concomitantes (paludisme, septicémie bactérienne, etc.). La prise en charge tardive, le niveau élevé de créatinine et enzymes hépatiques, ainsi que la charge virale élevée (Ct<22) seraient associées à une mortalité dans les 28 jours (Mulangu et al., 2019). Les paramètres cliniques qui peuvent être surveillés comprennent la natrémie, kaliémie, calcémie, le taux de chlorure, la glycémie, la créatinémie, les marqueurs de lésions hépatiques (ASAT et ALT), la créatine phosphokinase, la protéine C-réactive, les paramètres hématologiques (globules blancs, hématocrite et numération plaquettaire) et les analyses d'urine (glucose, cétones, acide ascorbique, protéines, sang, leucocytes, nitrite, pH, bilirubine

et urobilinogène), et les traitements peuvent être déterminés sur la base de les valeurs quotidiennes. Dans le contexte du syndrome de dysfonction multiviscérale et de la maladie grave, une surveillance fréquente en laboratoire devient la pierre angulaire de l'orientation du traitement de soutien. De plus, la surveillance de la charge virale (ou l'indicateur de la valeur seuil du cycle) est également utile en tant que substitut de la réplication virale, du confinement immunitaire et (dans les études rétrospectives) de la létalité, et elle peut aider à la stratification du risque chez les patients atteints de MVE.

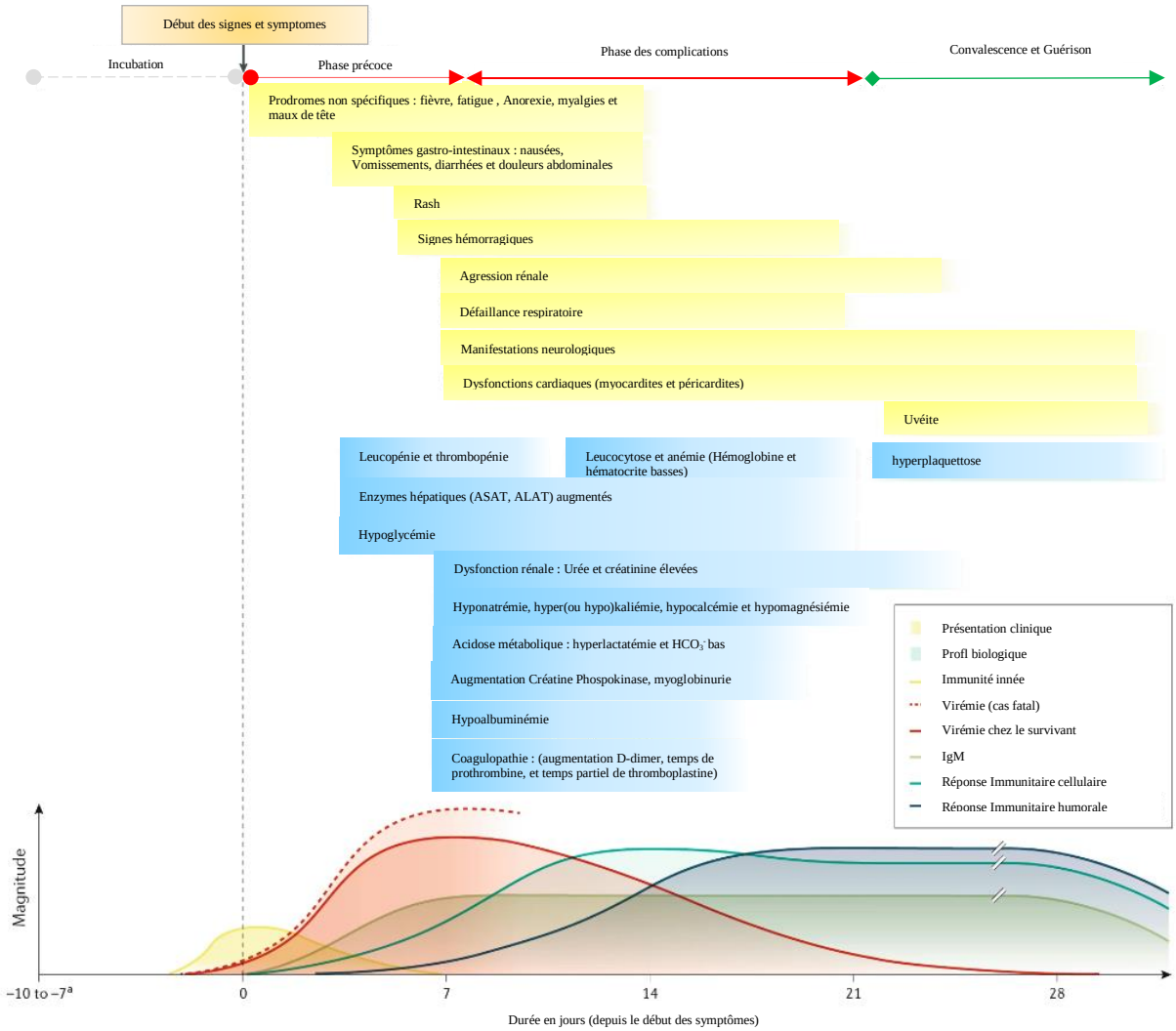


Figure 12 : *Phases cliniques, cinétique des marqueurs et apparition des complications adapté de (Jacob et al., 2020)*

1.8.5. Persistance du virus chez les personnes guéries

Généralement, les personnes qui guérissent de la maladie à virus Ebola sont celles qui parviennent à développer une réponse immunitaire efficace capable d'éliminer le virus pendant la phase aiguë de la maladie (Baize et al., 1999; Ksiazek et al., 1999; E. M. Leroy et al., 2000). Cependant, le virus peut persister pendant des semaines, mois, voire années dans des sites immunologiques privilégiés dits sanctuaire, tel que les testicules, les chambres de l'œil (B. Diallo et al., 2016; Etard et al., 2017; Green et al., 2016; Rowe et al., 1999; Sissoko et al., 2017). Des études ont indiqué la détection de l'ARN viral dans des échantillons de sperme ayant des valeurs Ct comprises entre 18 et 30, jusqu'à 118 jours après la sortie du CTE *(*Uyeki, 2016; Whitmer, 2018*).* La probabilité de détection de l'ARN d'Ebola dans le sperme d'un survivant a été estimée à 93.02 % et 60.12 % après 3 et 6 mois, respectivement, diminuant à 27.68 % et 10.32 % après 9 et 12 mois, respectivement, atteignant 0.96 % après 18 mois et devenant proche de zéro (0.06 %) après 24 mois (Keita et al., 2019). La plus longue durée de détection dans les fluides vaginaux des femmes guéries de la MVE est de 36 jours après le début de la maladie(W. J. Liu et al., 2019). Aucune transmission par exposition aux fluides vaginaux n'a été rapportée.

La plus longue durée de détection rapportée dans le lait maternel est de 58 jours après le début de la maladie (Keita et al., 2019). Cette meme étude rapporte aussi la détection de l'ARN de l'EBOV chez une femme guérie de la MVE tombée enceinte sept mois après la sortie du CTE (Keita et al., 2019). La transmission par le lait maternel à des enfants allaités a été suspectée par Arias en 2016 et Sissoko en 2017(Arias et al., 2016; Sissoko et al., 2016), même si certaines études mettent plus en exergue les contacts étroits et fréquents entre la mère et l'enfant au lieu du lait maternel (Bower et al., 2016).

L'OMS recommande pour les hommes guéris de la MVE et leur(s) partenaire(s) sexuel(s), un accompagnement avec des conseils (lavage des mains, usage de préservatifs, …) (WHO, 2018a) et des mesures d'hygiène pendant 12 mois au minimum. Pour les femmes

allaitantes au moment de la MVE et ayant guéri de la MVE, l'OMS recommande l'arrêt de l'allaitement (World Health Organization, 2020) jusqu'à l'obtention de deux tests consécutifs négatifs sur le lait maternel par RT-PCR avec un intervalle d'au moins 24 heures.

La persistance du virus pose trois risques (B. Diallo et al., 2016; Keita et al., 2021; Mbala-Kingebeni et al., 2021; Mukadi-Bamuleka et al., 2024) :

- la transmission de la maladie aux autres personnes non malades dans la communauté (exemple, par transmission sexuelle) entrainant ainsi une résurgence de l'épidémie ;
- La réactivation de la maladie due à une réplication importante du virus dans l'un des sites immunologiques privilégiés (risque pour la personne guérie) ;
- et la réinfection des personnes autrefois symptomatiques mais qui n'ont pas pu développer une immunité efficace après leur guérison

1.9. Détection et confirmation de laboratoire

La confirmation de la maladie à virus Ebola passe par le laboratoire. Les méthodes de diagnostic ont varié au fil des épidémies. A partir de 1996, l'isolement du virus par culture cellulaire et la sérologie ont peu à peu laissé la place aux méthodes de biologie moléculaire (RT-PCR et séquençage) . L'ensemble des stratégies diagnostiques tiennent comptent de la cinétique des marqueurs viraux pour garantir de meilleures performances et leur efficacité en temps d'épidémie.

1.9.1. Culture virale

Cette méthode utilise généralement des cellules de type Vero E6 (M. Johnson et al., 1977; Pattyn et al., 1977). Le virus peut être visualisé directement par microscopie électronique ou indirectement par microscopie à immunofluorescence dans les 5 jours suivant l'inoculation. Cette méthode n'est réservée qu'aux laboratoires possédant un niveau de confinement maximal (niveau de biosécurité 4).

1.9.2. Immunochromatographie et tests rapides

L'immunochromatographie est approprié pour le diagnostic de la phase aiguë de la maladie à virus Ebola chez les patients symptomatiques. Au cours des récentes épidémies, les tests de diagnostic rapide par immunochromatographie à flux latéral ont été développé et leur principe est basé sur la capture des antigènes. Plusieurs marques sont disponibles à ce jour tel OraSure Ebola Rapide Antigen test (OraSure technologies, USA), SD Q Line Ebola Zaire Antigen (SD Biosensor, Corée du Sud), ReEBOV RDT (Corgenix, USA) ou QuickNavi-Ebola (Denka Seiken, Japon) . L'avantage de ces tests réside premièrement en la rapidité de l'obtention des résultats (15-30 minutes) et en la facilité de déploiement et utilisation dans les sites réculés. Ils permettent une détection précoce et fournissent ainsi un premier résultat présomptif qui pourrait orienter la suite des investigations, cependant, ils ne suffisent pas à eux seuls. D'après une étude comparative menée par Mukadi et al., intégrant 4 tests de diagnostic rapide, aucun des TDR évalués n'approchait les « niveaux de sensibilité souhaités ou acceptables » définis par l'OMS, tandis que tous les tests ont atteint le « niveau souhaité » de spécificité. En effet, le QuickNavi-Ebola™ a montré une sensibilité de 56.8 % (IC à 95 % 53.6-60.0) et une spécificité de 97.5 % (IC à 95 % 96.2-98.4), le test antigénique rapide OraQuick® Ebola a montré une sensibilité de 61.6 % (IC à 95 % 57.0-65.9) et une spécificité de 98.1 % (IC à 95 % 96.2-99.1), le Coris® EBOLA Ag K-SeT a montré une sensibilité de 25.0 % (IC à 95 % 22.3-27.9) et une spécificité de 95.9 % (IC à 95 % 94.2-97.1), et le test standard® Q Ebola Zaïre Ag a montré une sensibilité de 21.6 % (IC à 95 % : 18.1-25.7) et une spécificité de 99.1 % (IC à 95 % : 97.4-99.7). Néanmoins, certains (QuickNavi-Ebola™ et OraQuick® Ebola) peuvent être utilisé comme test de première ligne pour le triage des cas suspects en attendant le test de confirmation RT-qPCR (Mukadi-Bamuleka et al., 2023).

1.9.3. Sérologie

Par ailleurs, la détection des anticorps par immunofluorescence (IFAT), ELISA, radioimmunoprécipitation (RIPA), Western Blot sont utilisés depuis les premières épidémies en 1976 pour détecter soit une infection actuelle (IgM) et antérieure (IgG) par le virus Ebola (D. L. Heymann, J. S. Weisfeld, P. A. Webb, K. M. Johnson, T. Cairns, 1980; M. Johnson et al., 1977a; WHO/International Study Team, 1978). Etant donné le besoin de typer les souches et la probable circulation concomitante de plusieurs souches, des stratégies multiplex sont de plus en plus développés avec les antigènes viraux de différentes souches pour rechercher les traces de la circulation du virus tant chez les hommes que dans la faune, et ont aussi permis de détecter des cas probables passés inaperçus dans la surveillance (Lacroix et al., 2021b; Nkuba-Ndaye et al., 2022; Peeters et al., 2023). Cependant, les réactions croisées rendent toujours difficiles l'interprétation des résultats en sérologie, et ce dans un contexte d'immunité collective en zones avec histoires d'épidémies ou par vaccination.

1.9.4. Immunohistochimie

Elle a été utilisée en 1995 pour confirmer l'épidémie de la maladie à virus Ebola à Kikwit, en RDC s'applique sur des échantillons de biopsie fixés au formol (Zaki et al., 1999). Elle est laborieuse, demande un personnel très qualifié et difficile à implémenter en situation d'épidémie.

1.9.5. Réaction en chaîne par polymérase à transcription inverse (RT-PCR)

Il s'agit de la méthode de détection de référence actuellement utilisée dans les laboratoires pour la confirmation et le diagnostic par la détection du matériel génétique viral dans les produits biologiques. Elle est fiable, rapide et sensible, et facile à mettre en place (*Traité de virologie médicale,* 2019).

La RT-PCR conventionnelle avec révélation sur gel est de moins en moins utilisée pour

le diagnostic en période d'épidémie. Elle sert souvent soit pour des enquêtes précises ou pour amplifier le virus durant le séquençage. A la place, la PCR en temps réel est la plus utilisée. Elle est appropriée en phase aiguë car les ARN viraux sont détectables dès les premiers symptômes.

La grande épidémie de l'Afrique de l'Ouest et les suivantes en RDC ont connu l'avénèment des plate-formes automatisées ayant rendu facile la mise en place de la biologie moléculaire, notamment : la RT-PCR avec la plateforme GeneXpert approuvée par l'OMS et le FDA pour une utilisation en cas d'urgence (Cepheid, 2015; Mbala-Kingebeni et al., 2019; Semper et al., 2016). D'autres techniques ont également été développées dont la Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) et la recombinase polymerase amplification (RPA) réduisant le temps d'analyse à environ 15 minutes et 30 minutes respectivement (Carter et al., 2017; James et al., 2018; Kurosaki, Magassouba, Bah, et al., 2016; Kurosaki, Magassouba, Oloniniyi, et al., 2016; Oloniniyi et al., 2017).

1.10. Prise en charge

Jusqu'en 2018, la maladie à virus Ebola était considérée comme une maladie incurable avec un taux de létalité très élevé. Les efforts de recherche à l'issue des 2 USPPI déclarées avec les grandes épidémies de l'Afrique de l'Ouest et de l'Est de la RDC, ont permis l'évaluation des vaccins et thérapies antivirales spécifiques au virus Ebola (espèce *Orthoebolavirus zairense*). La particularité de la grande épidémie de l'Est de la RDC réside entre autres dans le fait qu'elle soit la première durant laquelle les contremesures incluant traitement et vaccins ont été administrés à très large échelle. Cependant, les mesures générales prévention et celles standard de soins gardent une place de choix dans la prise en charge des patients et communautés affectées par la maladie.

1.10.1. Mesures générales de prévention

En période d'épidémie, des mesures de prévention sont systématiquement communiqués et encouragent les communautés à éviter tout contact avec :

- avec le sang et les fluides corporels d'une personne infectée ;
- les objets souillés d'une personne infectée (tels que les vêtements, la literie, les aiguilles et le matériel médical) ;
- le corps d'une personne décédée des suites de la maladie à virus Ebola ;
- les animaux morts trouvés en forêt (les chauves-souris, cephalophes ou les primates non-humains, …) ;

A ces mesures, s'ajoutent la sensibilisation des survivants, leurs familles et la communauté sur une sexualité responsable et protégée.

1.10.2. Vaccination

Un large éventail de vaccins a été mis au point au cours des décennies précédentes, en cours de développement dans le cadre d'essais précliniques et d'essais cliniques sur l'homme. Le groupe de vaccins comprend les vaccins à base de particules pseudovirales, les vaccins à base d'ADN, les vaccins recombinants à virus entier, les vaccins à réplication incompétente et les vaccins à réplication compétente. Les vaccins à vecteur ont été utilisés en essai durant les dernières épidémies, et certains testés à l'issu de la grande épidémie de l'Afrique de l'Ouest ou celle de l'Est de la RDC (Choi et al., 2024; Henao-Restrepo et al., 2017; Mulangu et al., 2019).

1.10.2.1. Vaccins à particules virales

Dans cette approche, la protéine matricielle VP40 et la glycoprotéine (GP) du virus Ebola constituent des particules pseudo-virales (PPV) avec la présence occasionnelle de nucléoprotéines (NP). Il en découle des particules de type EBOV et l'expression de la VP40 dans les cellules conduit à leur bourgeonnement cellulaire. Les tests d'efficacité sur des modèles animaux (souris et des cobayes, PNH) des PPV contenant de la glycoprotéine, de la

nucléoprotéine, du VP40 ont entraîné dans des études une protection contre la forme mortelle d'EBOV (Warfield et al., 2007; Warfield & Aman, 2011). L'immunisation immunogène basée sur les PPV déclenche des réponses immunitaires innées, humorales (IH) et immunitaires cellulaires (IC). Des pistes sur un système d'expression basé sur un baculovirus utilisant des cellules d'insectes pour pouvoir augmenter la production de PPV, ou une combinaison croisée des particules EBOV et MARV, restent en exploration sur des modèles animaux de cobaye(Malik et al., 2023).

1.10.2.2. Vaccins à ADN

Les vaccins à ADN ont l'avantage d'être rapidement adaptables à mesure que les agents pathogènes changent, et le fait que les plasmides soient non infectieux et simples à créer en grande quantité les rend particulièrement avantageux en ce qui concerne les infections nouvelles et réémergentes. La première méthode efficace de vaccination par ADN contre le virus a été rendue publique en 1998, démontrant une protection de 100 % contre l'EBOV dans les modèles de souris vaccinées. Elle contenait contenant quatre doses de glycoprotéine ou nucléoprotéine du virus Ebola. L'essai clinique de phase I a démontré une immunogénicité réussie développée à partir de trois doses d'un vaccin à ADN codant pour EBOV (GP ou NP) et le SUDV (GP) dans des populations humaines sans effet secondaire après la vaccination, et avec la production d'anticorps spécifiques, de réponses des lymphocytes T CD4+ contre chaque composant du vaccin, et de lymphocytes T CD8+ produits spécifiquement par le vaccin chez 40%(Malik et al., 2023). Cependant, malgré des améliorations notables, des recherches supplémentaires et d'autres études cliniques sont encore nécessaires pour mettre en œuvre le vaccin à ADN EBOV dans des applications cliniques.

1.10.2.3. Vaccins recombinants et à virus entier

Avec ces vaccins, le système immunitaire de l'hôte peut réagir plus largement et plus vigoureusement par rapport aux vaccins ciblés, car ils présentent au système immunitaire de l'hôte de nombreuses protéines virales ainsi que du matériel génétique viral. Cependant, les

premières tentatives de création d'un vaccin contre le virus Ebola irradié aux rayons gamma et rendu inactif n'ont pas réussi à protéger efficacement les primates non humains contre une dose mortelle de provocation contre le virus EBOV. Ainsi, un virus défectueux incompétent sans activateur de transcription virale crucial de type sauvage VP30 (souche Mayinga d'EBOV, EBOVΔVP30), a été créé par Marzi et ses collègues et testés sur des modèles de rongeurs. Cependant, cette méthode pose le problème de la stabilité génomique de la souche, de recombinaison ou de mutation du site de délétion VP30 à contrôler. Une inactivation virale à l'aide de peroxyde d'hydrogène a été proposée pour garantir l'inocuité du vaccin(Marzi & Feldmann, 2014).

1.10.2.4. Vaccins incompétents en matière de réplication

Il est théoriquement envisageable de développer une immunité protectrice croisée contre de nombreuses espèces de filovirus. A titre d'exemple, la protection croisée contre BDBV a été réalisée à l'aide de GPs des virus EBOV et SUDV exprimées par rAd5 à travers une stratégie de vaccination complexe ou mixte (Malik et al., 2023). Dans le cadre d'un essai clinique de phase I, la GP d'EBOV exprimée le vaccin rAd5 a été évalué et s'est avéré immunogène et sûr. Les réponses des lymphocytes T dépendantes du dosage contre les molécules spécifiques de l'antigène ont montré que les réponses immunitaires étaient insuffisamment déclenchées, de sorte que le niveau de protection inférieur qu'elles fournissaient était insuffisant (Sullivan et al., 2000).

1.10.2.5. Vaccins compétents pour la réplication

Dans cette famille, plusieurs virus ont été utilisés comme support pour le développement des vaccins. De prime abord, le virus de la vaccine (VV), qui fut l'une des premières plateformes utilisées pour créer un vaccin contre le virus EBOV, la recombinaison de l'ADN homologue a été utilisée pour créer des vaccins à base de VV, et dans le cas d'EBOV, plusieurs gènes ont été sélectionnés comme antigènes uniques : GP, GP soluble (sGP), NP, le cofacteur polymérase VP35 et VP40 (Malik et al., 2023). Les vaccins à base de VV administrés

chez les rongeurs (cobayes) n'ont pas causé de virémie contrairement aux PNH (Geisbert et al., 2002). Ensuite, le cytomégalovirus murin recombinant (CMV) génétiquement modifié pour exprimer un épitope présent sur la nucléoprotéine. Les résultats des tests chez les souris suggèrent un rôle protecteur contre l'infection mortelle par ZEBOV, et devront être confirmés dans d'autres modèles animaux utilisant des CMV spécifiques à l'espèce (Tsuda et al., 2011).

Les vecteurs viraux à ARN négatif ont été utilisés dans un certain nombre de stratégies en plus des vaccinations à base de virus à ADN. Une protection a été obtenue chez les PNH testé par le vaccin HPIV3/ΔHNF/EbovZ GP vaccine développé par le NIAID. Il est obtenu par une approche à base de rHPIV3 recombiné par ajout de glycoprotéine et/ou nucléoprotéine d'EBOV, et administré par les voies respiratoires (Bukreyev et al., 2006).

L'approche de génétique inverse a donné des résultats prometteurs à savoir celle ayant créée pour le virus de la stomatite vésiculeuse (VSV), le rVSV-ZEBOV, une forme recombinante atténuée du virus de la stomatite vésiculaire, un rhabdovirus utilisé comme vecteur, exprimant la glycoprotéine GP du virus Ebola responsable de l'induction de la protection.

1.10.2.6. Principaux vaccins dotés d'approbation

Evalué lors de la dernière épidémie en Guinée entre Mars 2015 et Janvier 2016, le rVSV-ZEBOV (ERVEBO) a été utilisé en RDC pour la première fois lors de l'épidémie de Bikoro (9ème épidémie MVE en RDC) dans la province de l'Equateur en 2018 avec la stratégie en ceinture ayant servi à son évaluation (Henao-Restrepo et al., 2017). La vaccination en ceinture consiste à vacciner les contacts directs (contacts à haut risque) de patients confirmés infectés par le virus Ebola et les contacts des contacts à haut risque.

Le vaccin chAd3-EBO-Z / cAd3-EBO, est composé d'un vecteur adénovirus de type-3 du chimpanzé recombinant monovalent exprimant la glycoprotéine (GP) de type sauvage du virus Ebola (ChAd3-EBO-Z). Une autre forme utilise comme vecteur un adénovirus bivalent recombinant de type-3 exprimant la glycoprotéine (GP) de type sauvage du virus Ebola et / ou

du virus Sudan (cAd3-EBO). Les deux premiers vaccins, ChAd3-EBO-Z et rVSV-ZEBOV, peuvent s'administrer en dose unique et ont été évalués en parallèle dans le cadre du projet PREVAIL I au Libéria (PREVAIL I). Les données obtenues ont confirmé que les deux vaccins étaient immunogènes jusqu'à 12 mois et ne présentaient aucun effet indésirable majeur (Kennedy et al., 2017).

Le vaccin Ad26.ZEBOV + MVA-BN-Filo est un vaccin qui utilise comme vecteur un adénovirus humain de type 26 administré en 2 doses et exprimant la glycoprotéine du virus Ebola, du virus Soudan et du virus Marburg, et la nucléoprotéine du virus Tai Forest (Tapia et al., 2016). Il a été utilisé à large échelle pour la première fois en RDC à Goma au cours de la grande épidémie de l'Est de la RDC.

D'autres vaccins ont été développé sur base de la souche Ebola variant « Makona ». L'un, Ad5-ZEBOV, utilise comme vecteurs le rVSV et l'Ad5 tandis que l'autre, GamEvac-Combi, est lyophilisé et utilise le vecteur Ad5 (J. X. Li et al., 2017; Zhu et al., 2017). D'autres candidats vaccins utilisant d'autres types de vecteurs sont certainement en étude ou en évaluation au cours des essais cliniques, mais dont les résultats ne sont pas encore disponible (Malvy et al., 2019b; Wang et al., 2017). Le ***Tableau 5*** reprend les principaux vaccins dont le développement est avancé et dont certains ont une licence.

Les limites et les défis rencontrés dans la mise au point des vaccins contre le virus Ebola sont la sélection de vaccins immunogènes, réactifs, à réponse rapide, basés sur l'immunité croisée avec des garanties de protection prolongée. Un autre problème pour la fabrication et la distribution des vaccins concerne la post-autorisation, l'homologation et la surveillance pour garantir l'efficacité d'un vaccin dans la lutte contre l'épidémie d'Ebola.

Tableau 5 *: Vue d'ensemble de principaux vaccins avec approbations*

Vaccin	Firme(s) (Pays)	Type	Vecteur/composition	Administration (voie d'administration)	Dose	Souche de la glycoprotéine	Année	Licence
Recombinant VSV-ZEBOV-GP (ERVEBO®)	Merck (USA)	Live, attenuated vaccine, Recombinant with vesicular stomatitis virus (rVSV). replication-competent	VSV	Dose unique (Intramusculaire)	2×107 PFU	virus Ebola, souche Kikwit	1995	Approuvé par la FDA des États-Unis pour les personnes de 18 ans et plus
ChAd3-EBO-Z avec ou sans MVA-BN-Filo	GlaxoSmithKline (UK) et, pour MVA-BN-Filo, Bavarian Nordic (Danemark)		Adénovirus de chimpanzé sérotype-3 ou MVA	Dose unique ou hétérologue avec dose de rappel (Intramusculaire)	2×1011 unités de particules	virus Ebola, souche Mayinga	1976	Pas encore homologué par la FDA américaine ou les essais EMAPhase II terminés en Europe, aux États-Unis et en Afrique
Ad26.ZEBOV avec MVA-BN-Filo	Johnson & Johnson (USA), et MVA-BN-Filo de Bavarian Nordic (Danemark)	Multivalent, EBOV GP, TAFV NP, SUDV GP, and MARV GP	Adénovirus humain sérotype 26 ou MVA	Hétérologue avec dose de rappel (Intramusculaire)		virus Ebola, souche Mayinga	1976	Agréé par l'EMA (circonstances exceptionnelles)
Ad5-ZEBOV	Académie militaire des sciences médicales et CanSino Biologics (Chine)		Adénovirus humain sérotype 5	Dose unique ou homologue avec dose de rappel		virus Ebola, souche Makona	2014	Approuvé par la China Food and Drug Administration
GamEvac-Combi	Gamalei Scientific Research Institute of Epidemiology and Microbiology (Russie)		VSV et Ad5-	Hétérologue avec dose de rappel		virus Ebola, souche Makona	2014	Agréé par le ministère de la Santé de la Fédération de Russie

1.10.3. Traitement

A ce jour, la FDA a approuvé deux traitements spécifiques de la maladie à virus Ebola, Inmazeb™ et Ansuvimab à la suite des résultats de l'essai clinique PALM réalisé durant la grande épidémie de l'Est de la RDC de 2018 à 2020. Elles ont montré une efficacité supérieure comparé au Remdesivir, un antiviral et au Zmapp un autre anticorps monoclonal (Mulangu et al., 2019). Inmazeb™ (Inmazeb), approuvé en octobre, est une combinaison de trois anticorps monoclonaux tandis que le deuxième médicament, Ebanga™ (Ansuvimab), approuvé deux mois plus tard, est un anticorps monoclonal unique. Bien que ces molécules aient été approuvées, d'autres investigations post-marketing et de pharmacovigilance se poursuivent pour évaluer les effets indésirables tardifs et la pression de sélection exercées sur le virus. Le traitement est aussi symptomatique en fonction des signes cliniques que présente le patient. La prise en charge clinique repose sur l'administration des antipyrétiques, des antalgiques, des antiémétiques, de l'oxygénothérapie, de la réhydratation orale ou intraveineuse, des anti-malaria et autres médicaments pour le traitement d'autres infections concomitantes possibles (Malvy et al., 2019b).

Plusieurs autres thérapies avaient été expérimentées pendant l'épidémie de 2014-2016 en Afrique de l'Ouest, telles que : le Favipiravir, le TKM-130803, le plasma ou le sang des convalescents, et les anticorps monoclonaux comme ZMapp (Malvy et al., 2019b; The PREVAIL II Writing Group, 2015). Les résultats des essais cliniques des différentes thérapies sont synthétisés dans le ***Tableau 6***.

Le plus important dans la prise en charge des patients atteints de la maladie à virus Ebola devrait néanmoins se focaliser sur les soins de soutien et, si nécessaire et dans la mesure du possible, des soins critiques, sur la base des similitudes physiopathologiques entre, d'une part, la maladie à virus Ebola et d'autre part, choc septique et hypovolémique possible. En outre, un traitement symptomatique et empirique des infections concurrentes est proposé, adapté aux besoins de chaque patient (WHO, 2019).

Une prévention ou une correction adéquate des pertes de liquide, en fournissant des fluides oraux ou parentéraux, est une pratique courante chez les personnes gravement malades, même si peu de preuves étayent son utilité clinique dans le cas de la maladie à virus Ebola. Des liquides intraveineux sont nécessaires lorsque la consommation de liquide oral n'est pas possible, par exemple si le patient est trop faible ou en cas d'iléus, de somnolence ou de coma. L'administration de liquides cristalloïdes en quantités suffisantes pour atteindre la stabilité hémodynamique est la norme de diligence recommandée lorsque des liquides intraveineux sont nécessaires. Le degré d'agressivité de cette correction de fluide doit encore être déterminé. Quel que soit le cas, une prudence dans laquelle une fuite vasculaire ou une insuffisance rénale peut survenir peut-être exigée, en particulier dans les situations où survient une épidémie de maladie à virus Ebola, où les ressources nécessaires pour suivre la réanimation liquidienne et faire face aux complications possibles, telles que du personnel qualifié, une supplémentation en oxygène, une ventilation mécanique ou une thérapie de remplacement du rein pourraient être insuffisantes. Étant donné que l'insuffisance rénale est associée à une augmentation des conséquences fatales de la maladie à virus Ebola, il est pertinent de remédier à l'insuffisance rénale. Idéalement, la fonction rénale, les valeurs d'hémoglobine ou d'hématocrite, les concentrations d'électrolytes, le trou anionique, la glycémie et le lactate devraient être systématiquement déterminés au chevet du patient. Les patients traités en soins intensifs semblent avoir une mortalité plus basse que ceux traités en conditions réelles, bien que très peu de cas aient confirmé cette observation, grâce à l’hémodialyse, ventilation artificielle ou soutien hémodynamique.

Tableau 6 : *Résultats des études d'essai clinique des thérapies anti-Ebola*

Traitement (type d'étude/pays)	Epidémie	Dose	Administration	Résultats
Plasma des convalescents (Étude comparative non randomisée)	Afrique de l'Ouest (2014-2016)	Inconnu	Deux transfusions IV consécutives de 200 à 250 ml chacune	Aucun avantage significatif en matière de survie
Sang de convalescence (Étude comparative non randomisée)	Afrique de l'Ouest (2014-2016)	Inconnu	Une transfusion IV de 450 ml administrée sur une période de 1 à 4 heures	Aucun avantage significatif en matière de survie
ZMapp ; (essai de phase 2-3/Libéria, Sierra Leone, Guinée, États-Unis et Essai PALM/RDC)	Afrique de l'Ouest (2014-2016) et Est de la RDC (Kivu) (2018-2020)	50 mg/kg	Une dose tous les 3 jours (IV) pour un total de trois doses	taux de survie de 49,5% - 77,8%)
MAb114 (Essai PALM/RDC)	Est de la RDC (Kivu) (2018-2020)	50 mg/kg	Une dose (IV)	taux de survie de 64,9%
REGN-EB3 (Essai PALM/RDC)	Est de la RDC (Kivu) (2018-2020)	150 mg/kg	Une dose (IV)	taux de survie de 66,5%
Remdesivir (GS-5734); (Essai PALM/RDC)	Est de la RDC (Kivu) (2018-2020)	Dose de charge de 200 mg; 100 mg d'entretien	Une fois par jour pendant 9 à 13 jours (IV)	175 inscrits, 82 survivants (46,9% de taux de survie)
le favipiravir (T-705) ; essai en un seul groupe avec témoins historiques (Guinée)	Afrique de l'Ouest (2014-2016)	dose de charge de 6000 mg; 2400 mg d'entretien	Deux doses de 1200 mg par jour les jours 1 à 9 (par voie orale)	aucun avantage significatif en matière de survie
TKM-130803 ; essai de phase 2 à groupe unique avec témoins historiques (Sierra Leone)	Afrique de l'Ouest (2014-2016)	0,3 mg/kg	Une fois par jour pendant un maximum de 7 jours (IV)	aucun avantage significatif en matière de survie

Chapitre 2 : De l'Emergence du Mpox aux urgences de santé publique de portée internationale (USPPI)

Dans ce chapitre seront développées les connaissances sur la maladie mpox ainsi que de son agent causal le virus monkeypox (MPXV). Ce virus est connu de la communauté internationale après la déclaration de l'USPPI de 2022, consécutive à l'épidémie mpox dans plus de 100 pays dans le monde. Après un bref aperçu historique focalisé sur sa découverte et la détection du premier cas chez l'homme, cette section développera l'état de la connaissance actuelle sur le MPXV, (à savoir la taxonomie, la structure du génome, la réplication virale, la transmission et le réservoir) à partir de la revue de la littérature qui s'est sensiblement accru après les années 2022. Enfin, nous décrirons le mpox, en tant que maladie humaine en retraçant son profil épidémique dans le temps, les lésions anatomo-pathologiques, les formes cliniques, les diagnostics différentiels, les complications, le diagnostic biologique, les stratégies de séquençage du génome entier et la prise en charge. Pour rester dans le contexte, une emphase sera mise sur la surveillance épidémiologique en RDC.

Notons toutefois que les publications sur le mpox, appelé précedemment « monkeypox » ou « variole du singe » en français, se sont considérablement accrues à l'avènement de l'épidémie à l'échelle globale en 2022 simultanée dans plusieurs pays non-endémiques. La recherche sur *https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/* du mot clé « monkeypox » permet de générer à la date du 28 septembre 2024, 4892 résultats de publications de divers types (livres, articles, revues, …) avec ce mot mentionné, avec un pic de 2075 mentions dans des publications en 2023, certainement consécutive à la première déclaration d'urgence de santé publique de portée internationale (USPPI). Comme pour le virus Ebola, cette tendance est aussi superposable à la publication sur bases de données telles que NCBI

(*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/*), EBI (*https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home*) ou NIG (*https://www.ddbj.nig.ac.jp/index-e.html*), telle qu'illustrée dans la ***Figure 13***.

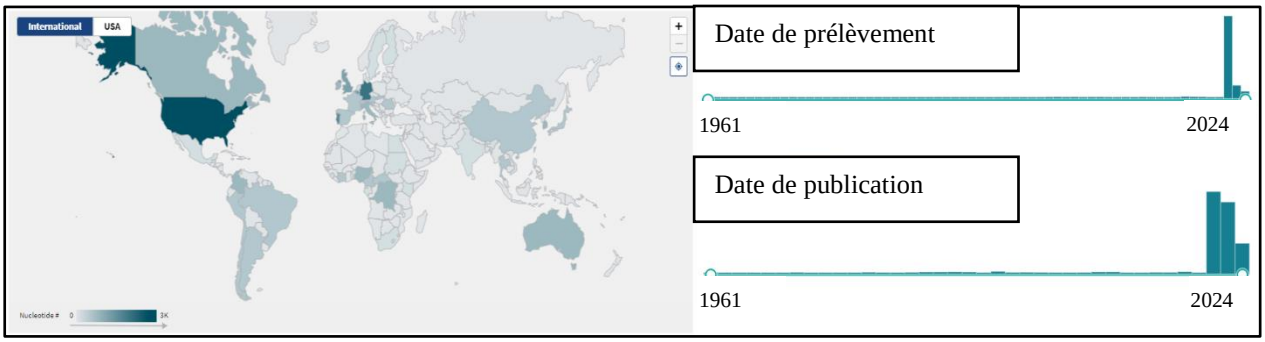


Figure 13 : *Distribution spatio-temporelle des séquences publiées sur la Genbank*

https://www.ncbi.nlm.nih.gov/labs/virus/vssi/#/dashboard?SeqType_s=Nucleotide&VirusLineage_ss=Monkeypox%20virus,%20taxid:10244

Le virus responsable du mpox appartient à une famille de virusfigurant parmi les virus les plus connus et les plus redoutés, celle des poxvirus, à l'instar de la VACV utilisé dans le développement des vaccins.

2.1. De la découverte au premier cas humain

Le virus a été découvert pour la première fois en 1958 dans un laboratoire danois, à l'issue de 2 épidémies ressemblant à la variole apparue chez des singes élevés à des fins de recherche. En ce moment, l'on a cru que la maladie était une variante de la variole chez les singes ou primates non humain (PNH), d'où le nom « monkeypox », « orthopoxvirose simienne », « variole du singe » ou « variole simienne ». Les deux foyers épidémiques se sont produits tardivement après l'arrivée des singes, c'est-à-dire après 51 et 62 jours, respectivement, et seulement 20 à 30 % des animaux ont développé des signes cliniques de la maladie (Magnus et al., 1959). Les manifestations cliniques étaient caractérisées par des éruptions cutanées ; une éruption maculo-papuleuse et de pustules varioleuses sans atteinte grave de la santé des animaux ni leur mort. Des lésions pustuleuses, un agent viral s'etant multiplié sur les

membranes chorio-allantoïdiennes et ayant produit des changements cytopathiques dans des cultures tissulaires de cellules de rein de singe, a été isolé. Ce virus était sérologiquement apparenté au virus de la vaccine et avait l'aspect en forme de brique typique des virus de la variole tel que décrit par (Magnus et al., 1959). Pour répondre au postulat de Koch, ce virus a été inoculé sur les tissus de lapins et a provoqué des lésions semblables à celles de la variole. Cependant, contrairement à la variole, il a pu être maintenu en série chez la souris par la voie intracérébrale provoquant une encéphalite et dans la peau du lapin où il a produit de graves lésions hémorragiques.

Cette découverte survient dans le contexte d'éradication de la variole. Notons qu'avant la description faite par Magnus et al., l'observation d'infections à poxvirus chez les primates, avait été enregistrée avant le XXieme siècle en France (1767 et 1842), au Panama (1841) et au Brésil (1858). Dans la première moitié du XXieme siècle, 3 notifications ont été faites sans recherches d'identification d'un virus spécifique : au Brésil (1922), en Inde (1936) et en Indonésie (1949). Cette dernière a été faite chez des orangs-outans (Arita & Henderson, 1968). Durant les 10 années ayant suivies la description de Magnus, 9 épizooties liées au MPXV ont été détectées dont une au Danemark, 2 aux Pays-Bas (dont celle de Rotterdam ayant frappé plusieurs espèces à savoir Orangs-outans, gorilles, chimpanzés, gibbons, ouistitis, cercopithèques et sagouins) et 6 aux États-Unis d'Amérique (USA). Pour 5 des 9 épizooties, l'isolement du virus MPXV a permis de confirmer le diagnostic. La voie de transmission usuelle n'était pas les aérosols, contrairement à la variole humaine. Les espèces de singes les plus affectés étaient *Macaca irus, Macaca rhésus, Macaca philippinensis* originaires de l'Inde, des Philippines et de la Malaisie. Aucune infection humaine n'a été signalée (Arita & Henderson, 1968; Heymann et al., 1998).

Le mpox était donc considéré comme une maladie affectant essentiellement les primates jusqu'à la première description chez l'homme en 1970. La découverte quasi fortuite survint

dans le cadre du programme national de surveillance et d'éradication de la variole alors en cours en Afrique. Il s'agissait d'un garçon de 9 mois, chez qui de la fièvre s'est développée, suivie 2 jours plus tard d'une éruption cutanée centrifuge (c'est-à-dire une éruption cutanée avec la majorité des lésions sur les bras et les jambes). Le 1er septembre 1970, il est admis à l'hôpital de Basankusu, dans la province de l'Equateur, en République démocratique du Congo (RDC). L'enfant présentait une otite, une mastoïdite et des ganglions lymphatiques cervicaux douloureux, et le virus de la variole du singe a été isolé de ses lésions cutanées. Malgré la guérison de la maladie, il trépassa de la rougeole qu'il avait contracté avant sa sortie de l'hôpital (Gessain et al., 2022). Cet évènement marquera un tournant décisif qui verra le spectre d'hôte de la maladie être étendu, rendant les PNH des hôtes accidentels comparés à d'autres. Les études sur les poxvirus ont été essentielles pour l'avancement de plusieurs domaines de connaissances, en particulier la biologie cellulaire, la vaccinologie et la virothérapie.

2.2. Virologie

2.2.1 Taxonomie des Orthopoxvirus

Le virus monkeypox appartient au Domaine des *Varidnaviria*, Règne des *Bamfordvirae*, Embranchement des *Nucleocytoviricota*, Classe des *Pokkesviricetes*, Ordre des *Chitovirales*, Famille des *Poxviridae*, Sous-famille des *Chordopoxvirinae*, Genre des *Orthopoxvirus*. D'après la dernière mise à jour du comité international de la taxonomie des virus (ICTV), le virus a été assignée à l'espèce *Orthopoxvirus monkeypox* (McInnes et al., 2023).

Les Varidnaviria (Various DNA viruses) constituent l'un des 6 domaines taxonomiques viraux et regroupent des virus à ADN qui codent pour les principales protéines de la capside contenant un pli vertical en forme de rouleau de gelée ou pli "jelly roll" (JR)(Woo et al., 2021). Ce regroupement taxonomique comprend des virus de taille variable allant de très petits aux plus gigantesques parmi les virus.

Selon le nombre et la structure des protéines principales de la capside, les *Varidnaviria* se subdivisent en règne des *Helvetiavirae* caractérisé par deux protéines principales de la capside, chacune avec un simple pli "jelly roll"(SJR) et règne des *Bamfordvirae*, caractérisé par une seule protéine principale de la capside avec un double pli "jelly roll" (DJR) (Koonin et al., 2020). Le nom de *Bamfordvirae* a été donné en reconnaissance à Dennis Bamford qui a été le premier à proposer et promouvoir l'unité évolutionnaire de tous les virus encodant pour les protéines principales de la capside avec DJR. Dans ce règne, la classification comprend 2 embranchements dont les *Preplasmiviricota* (précurseurs de certains plasmides) et les *Nucleocytoviricota* également connus sous le nom de grands virus à ADN nucléocytoplasmiques (NCLDV) qui sont souvent capables de se répliquer à la fois dans le noyau et le cytoplasme de la cellule hôte(Koonin et al., 2019). Dans cet embranchement, se distingue premièrement la classe des *Megaviricetes* comptant les virus avec les plus larges génomes avec des dimensions de virion pouvant atteindre 1.5 μm dépassant certaines bactéries (les mycoplasmes par exemple), et des tailles de génomes allant jusqu'à 2.5 Mégabases, comparables aux bactéries. En second lieu, la classe des *Pokkesviricetes*, de l'anglais ancien pokkes, pox en anglais courant, signifiant « pustule », en référence à la manifestation de la maladie associée à certains virus, est la classe qui nous intéresse. Elle comprend 2 ordres : les *Asfuvirales* (donnant une grippe porcine) et les *Chitovirales*. Le nom de *Chitovirales* a été proposé pour honorer le nom proposé par Lwoff et Tournier en 1966 pour un taxon de rang supérieur pour les poxvirus ("Chitovirales" ; du grec χιτών, [khitōn], un revêtement spécifique et une référence à la structure morphologique des poxvirus) pour le système "Lwoff, Horne et Tournier (LHT)". Ceux-ci intègrent les virus identifiés dans la famille des *poxviridae*. Les virus composant cette famille se composent de grands virus à ADN double brins, qui se répliquent entièrement dans le cytoplasme des cellules hôtes. Les poxvirus ont une structure complexe et

un génome linéaire étendu allant de 127 à 365 kbp, voire 456 kbp (genres *Parapoxvirus*, *Avipoxvirus* et *Carp edema virus*, respectivement), qui codent pour près ou plus de 200 gènes.

Dans le passé, la taxonomie des poxvirus reposait principalement sur la gamme d'hôtes viraux et les caractéristiques pathologiques. Toutefois, le développement des techniques de séquençage de l'ADN a permis de révéler la caractérisation génomique des poxvirus, fournissant ainsi un critère plus précis pour la classification phylogénétique. La famille des *Poxviridae* comprend 2 sous-familles, 22 genres et un total de 83 espèces de poxvirus (McInnes et al., 2023). La phylogénie des *Poxviridae* basée sur les gènes conservés met en évidence deux branches distinctes, correspondant aux sous-familles des *Chordopoxvirinae* et des *Entomopoxvirinae*(Fenner, 2000). Les *Entomopoxvirinae* sont composés de 31 espèces dont 30 se regroupent en 4 genres qui infectent les insectes : *Alphaentomopoxvirus, Betaentomopoxvirus, Deltaentomopoxvirus* et *Gammaentomopoxvirus*).

Par ailleurs, les *Chordopoxvirinae* sont connus infectieux pour les vertébrés avec 18 genres (*Avipoxvirus, Capripoxvirus, Centapoxvirus, Cervidpoxvirus, Crocodylidpoxvirus, Leporipoxvirus, Macropopoxvirus, Molluscipoxvirus, Mustelpoxvirus, Orthopoxvirus, Oryzopoxvirus, Parapoxvirus, Pteropopoxvirus, Salmonpoxvirus, Sciuripoxvirus, Suipoxvirus, Vespertilionpoxvirus* et *Yatapoxvirus*), se distinguant par leurs réactions sérologiques, 6 virus non assignés à un genre(***Figure 14***). Certains genres n'ont qu'une seule espèce identifiée à ce jour, tel le virus de la variole du porc (Swinepox ou SWPV), seul membre du genre *Suipoxvirus*, et responsable de la variole porcine, une maladie sévissant dans le monde entier et qui est associée à de mauvaises conditions d'hygiène.

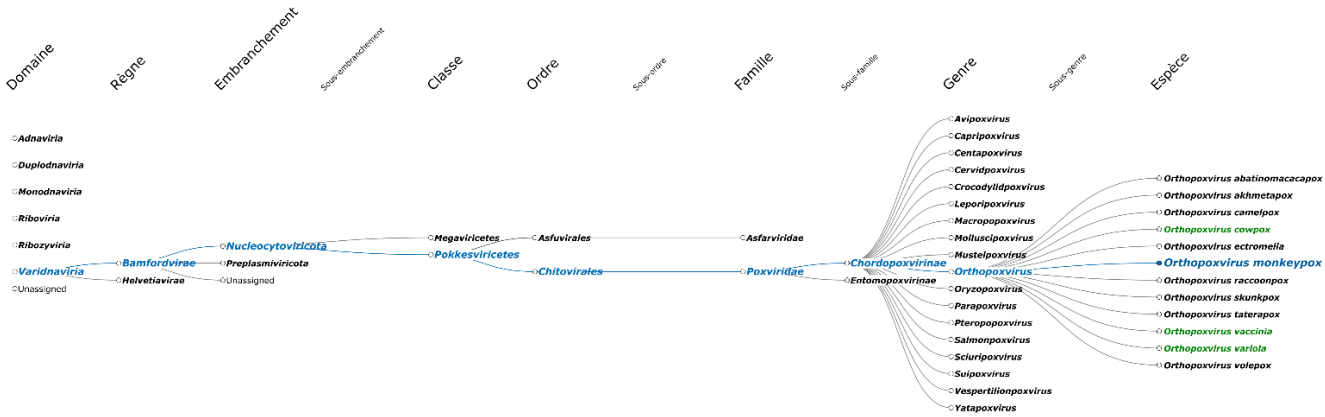


Figure 14 *: Taxonomie des chordopovirinae et orthopoxvirus adaptée de https://ictv.global/taxonomy/visual-browser*

L'un des genres les plus importants est celui des *Orthopoxvirus* qui contient 13 espèces avec génomes complets. Alors que l'Alaskapox (AKPV) n'est pas encore assignée, 3 virus ont été décrits comme orthopoxvirus du nouveau monde, à savoir le virus Raccoonpox (RCNV), le virus Skunkpox (SKPV) et le virus Volepox (VPXV). Les 9 virus restants, considérés comme *Orthopoxvirus* de l'ancien monde (ou clade eurasiatique/africain) sont le virus Abatino macacapox (AMPV), le virus Akhmeta (AKMV), le virus Camelpox (CMLV), le virus Ectromelia (ECTV), le virus Taterapox (TATV), le virus de la variole (VARV), le virus de la vaccine (VACV), le virus de la variole bovine (CPXV) et le virus de mpox (MPXV) (***Figure 14*** et ***Figure 15***)(McInnes et al., 2023; Yang et al., 2024). Les 4 derniers sont responsables de plusieurs épidémies de maladies éruptives dans le monde, tant chez les humains que chez d'autres animaux (bovidés et équidés), véritables maladies virales zoonotiques émergentes (Haller et al., 2014; Oliveira et al., 2017).

Tel que nous le constatons, les *Orthopoxvirus* ont été nommées en fonction de l'animal hôte à partir duquel elles ont été isolées et identifiées. La plupart des *Orthopoxvirus* zoonotiques ont été initialement isolés chez des animaux certes, immédiatement proches de l'homme, mais surtout hôtes accidentels du virus, alors que leurs porteurs naturels sont, en règle

générale, des animaux sauvages. En conséquence, le nom d'espèce d'*Orthopoxvirus* ne reflète pas toujours l'animal réel qui est son réservoir naturel, le cas échéant du MPXV dont le singe n'est pas le réservoir principal, mais plutôt un hôte accidentel.

Pour revenir à la taxonomie à l'échelle d'espèces, l'identité de séquences nucléotidique est le critère de base pour la démarcation inter-espèces. Cependant, l'identité nucléotidique seule ne suffit pas à séparer les espèces étant donné qu'il s'agit des virus fortement conservés. En effet, dans la région centrale conservée du génome, une identité de séquence nucléotidique de >96 % est observée entre les souches des *Orthopoxvirus* de l'ancien monde. En outre, les isolats d'une espèce présentent une identité nucléotidique >98 %. C'est ainsi que 4 critères supplémentaires suivants sont pris en compte (McInnes et al., 2023) :

- Identité de séquence d'acides aminés ou de nucléotides entre des gènes spécifiques et couramment partagés (exemple : hémagglutinine ou la protéine d'inclusion de type A) ;
- Caractéristiques de croissance et gamme d'hôtes en culture cellulaire
- Caractéristiques de la maladie telle la morbidité ou la mortalité
- Des critères sérologiques, y compris les tests de neutralisation et la protection croisée chez les animaux.

Aussi, l'émergence du mpox dans un contexte d'éradication de la variole a conduit en diverses études comparatives et analyses phylogénétiques ayant mis en évidence que le MPXV et le VARV sont deux espèces qui ont évolué de façon indépendante ; la structure de leur génome était très différente dans les parties distales, ce qui exclut l'idée d'une mutation de la variole en MPVX (S. N. Shchelkunov, 2013).



Figure 15 *: Relations phylogénétiques dans le genre Orthopoxvirus, avec des virus représentatifs appartenant à des espèces du genre Orthopoxvirus, adaptée de https://ictv.global/report/chapter/poxviridae/poxviridae*.

2.2.2. Structure et morphologie des orthopoxvirus et du MPXV

Comme décrit dans le point précédent, le MPXV est doté d'une enveloppe et d'une morphologie complexe, il mesure 140 à 260 nm de diamètre et 220 à 450 nm de longueur (Jahrling et al., 2009), suffisant pour être perçu au microscope optique, même si la haute résolution du microscope électronique permet l'étude approfondie de son ultrastructure (Sklenovská, 2020). Ce virus pléomorphe peut se présenter en forme ovale, arrondie ou en forme de brique. Le virion du MPXV se compose de 5 éléments principaux(***Figure 16***) : (i) le noyau se présentant en forme d'haltère biconcave, formé de l'ADN génomique viral double brin (ADNdb) enrobé dans la nucléoprotéine, des fibrilles nucléaires et inclus dans une membrane (la membrane nucléaire) ; le tout constitue le nucléoïde (ou core) et est entourée (ii) d'une couche palissadique, couche étroitement disposée de structures en forme de bâtonnets ; l'ensemble ci-haut décrit avec (iii) les corps latéraux constitués de matériau hétérogène, se retrouvent dans une (iv) membrane lipoprotéique (5-6 nm d'épaisseur), d'où émergent des (v) tubules de surface (H. Li et al., 2023; Sklenovská, 2020; *Traité de virologie médicale*, 2019).

Cette structure est typique pour tous les *Orthopoxvirus* qui en cryotomographie ont en moyenne une dimension de 360x270x250nm (*Traité de virologie médicale*, 2019).

Les virions libérés spontanément ont souvent l'enveloppe externe des lipoprotéines, tandis que les virions libérés par la perturbation cellulaire n'ont pas cette enveloppe. Un virion mature contient au moins 80 protéines virales (Sklenovská, 2020). Les virions encapsulent de nombreuses enzymes qui sont essentielles à la transcription primaire des gènes viraux et structurels tel que nous le verrons dans le point suivant.

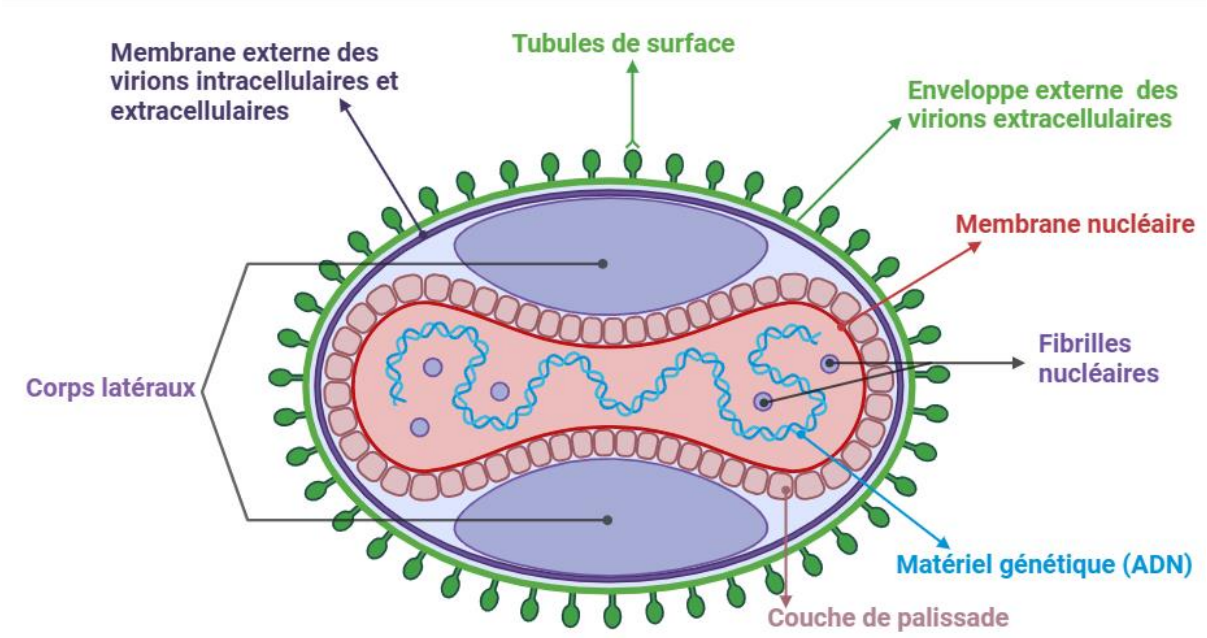


Figure 16 *: Représentation schématique d'une particule de poxvirus (créée avec Biorender.com)*

2.2.3. Structure génomique des poxvirus, des orthopoxvirus et du MPXV

Les connaissances sur la structure génomique du MPXV et sur les poxvirus en général, y compris celles comparatives entre différents orthopoxvirus, en particulier les virus VACV, VARV et CPXV, ont demontré par exemple une ressemblance génomique entre le VARV et le MPXV à 93.6 % (Arita & Henderson, 1968; Haller et al., 2014; Jahrling et al., 2009; S. Shchelkunov et al., 2001).

Tel que mentionné plus haut, les poxvirus ont des génomes d'ADN double brin linéaires complexes dont la taille varie de 127 à 456 kbp selon les espèces (***Figure 17***).

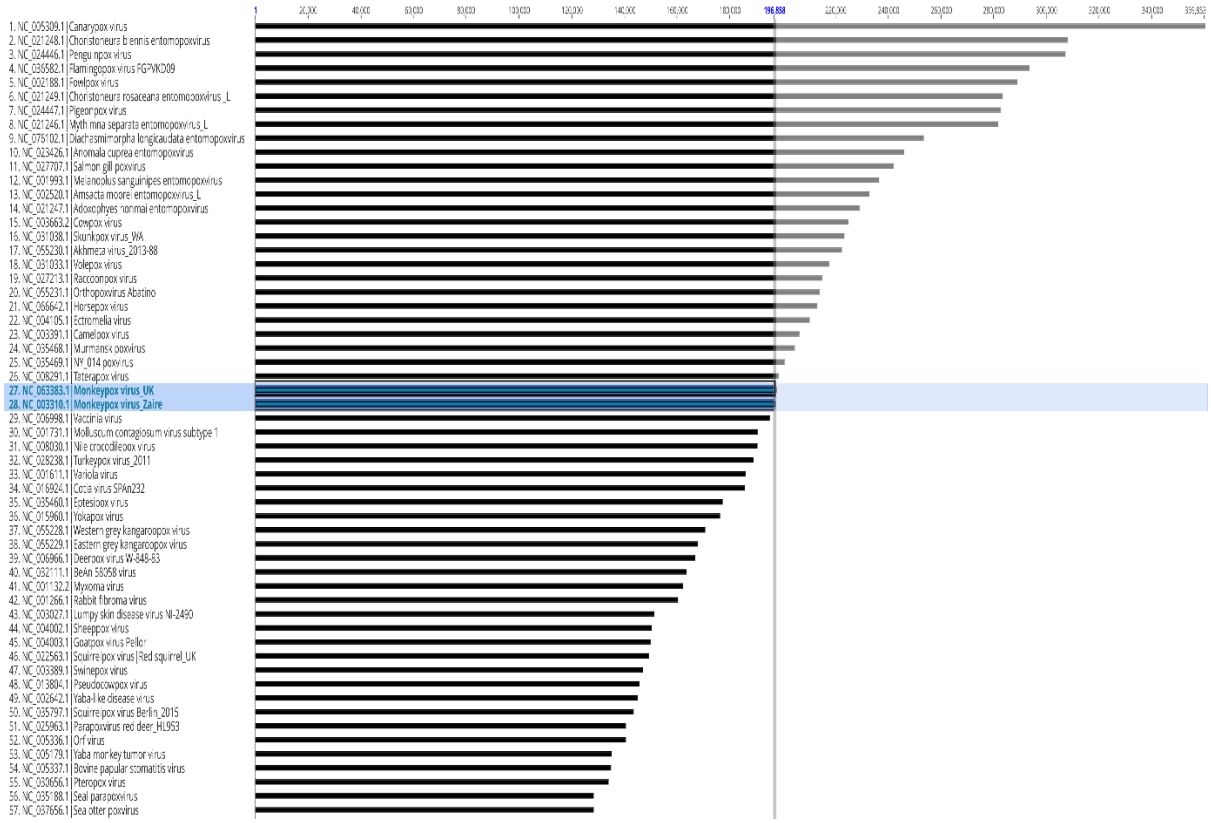


Figure 17 *: Taille des génomes de référence de 57 poxvirus avec séquences complètes disponibles sur Genbank (NCBI), figure créée avec geneious.*

Ces génomes codent pour des centaines de protéines, posant des défis importants dans l'étude de l'histoire naturelle de l'infection, de la transmission et de la pathogénicité. L'analyse génomique de poxvirus permet de mettre en évidence les gènes liés au spectre d'hôtes, à l'instar de C7L, K1L, E3L ou B5R chez VACV (Yang et al., 2024). En considérant les *Chordopoxvirinae*, ils sont caractérisés par un génome linéaire variant de 128 à 360 kbp avec une teneur en GC allant d'environ 25 % (Yokapoxvirus) à 67 % (Scuiripoxvirus) ; et dans ce groupe, le génome des 13 espèces virales du genre *Orthopoxvirus* varie entre 186 et 228 kbp avec teneur en GC d'environ 36%, et coderait entre 174-233 protéines. Les 102 kbp centraux des génomes codent environ 100 protéines impliquées dans la réplication, la morphogenèse et la dissémination du virus, et sont largement conservés parmi les membres de toutes les espèces, à la fois en termes de contenu génique et de synténie. Les régions situées aux deux extrémités des génomes codent des protéines qui, dans de nombreux cas, diffèrent selon les espèces d'*Orthopoxvirus*, et sont impliquées dans les interactions avec la réponse immunitaire de l'hôte (McInnes et al., 2023).

De nombreux gènes terminaux contribuent à l'évasion immunitaire en interférant avec la signalisation, la présentation et la reconnaissance des antigènes et l'apoptose (Seet et al., 2003). D'autres chordopoxvirus (ChPV) restent prochent des *Orthopoxvirus*, tel que le SWPV doté d'une région codante centrale de 139 023 pb délimitée par deux régions de répétitions terminales inversées (ITR) identiques de 3,7 kbp, avec une taille totale estimée de148 à 150 pb et une composition des nucléotides riche en AT (72.5 %) uniformément répartie (Afonso et al., 2002).

Pour ce qui concerne le MPXV, le génome est constitué de 196 858 paires de base (pb), soit environ ~197kbp (kilobases paires) avec ~190 cadres de lecture ouverts ORFs tel qu'illustré sur la ***Figure 18***, plus que le VARV, le plus petit *Orthopoxvirus* connu infectieux pour l'homme avec environ 186 kbp avec187 ORFs et moins que le CPXV qui est l'*Orthopoxvirus* ayant le plus long génome connu à ce jour, avec environ ~220 kbp et ~220 cadres ORFs (Kugelman et al., 2014; Okwor et al., 2023; S. Shchelkunov et al., 2001).

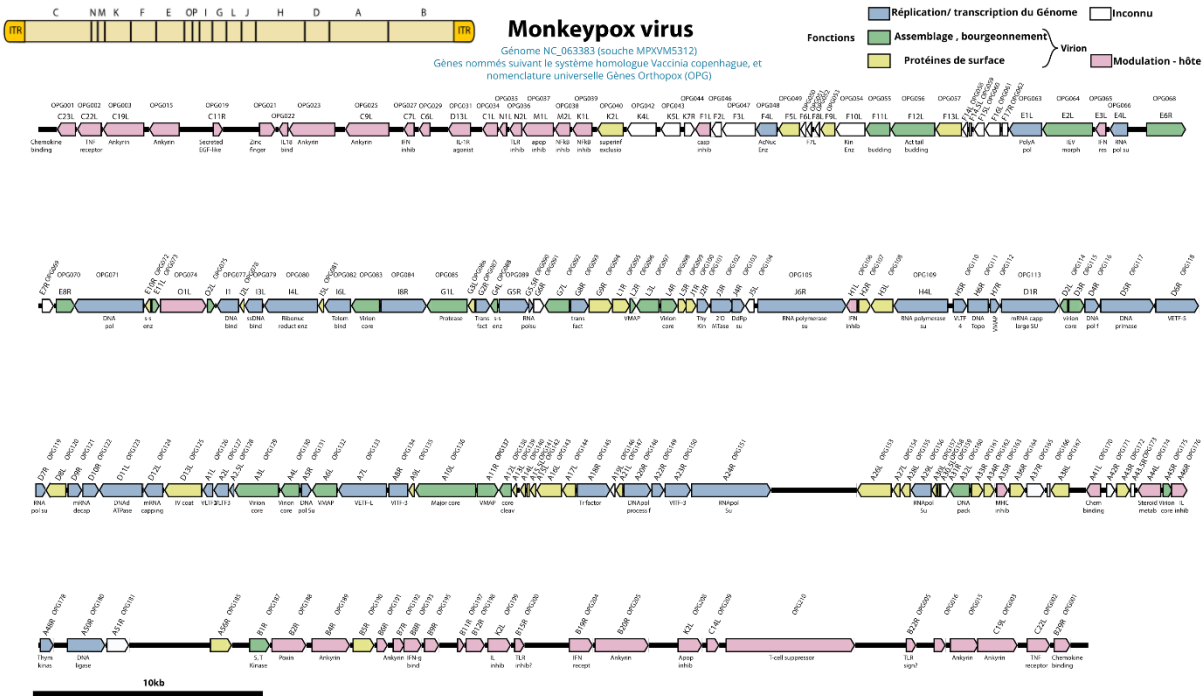
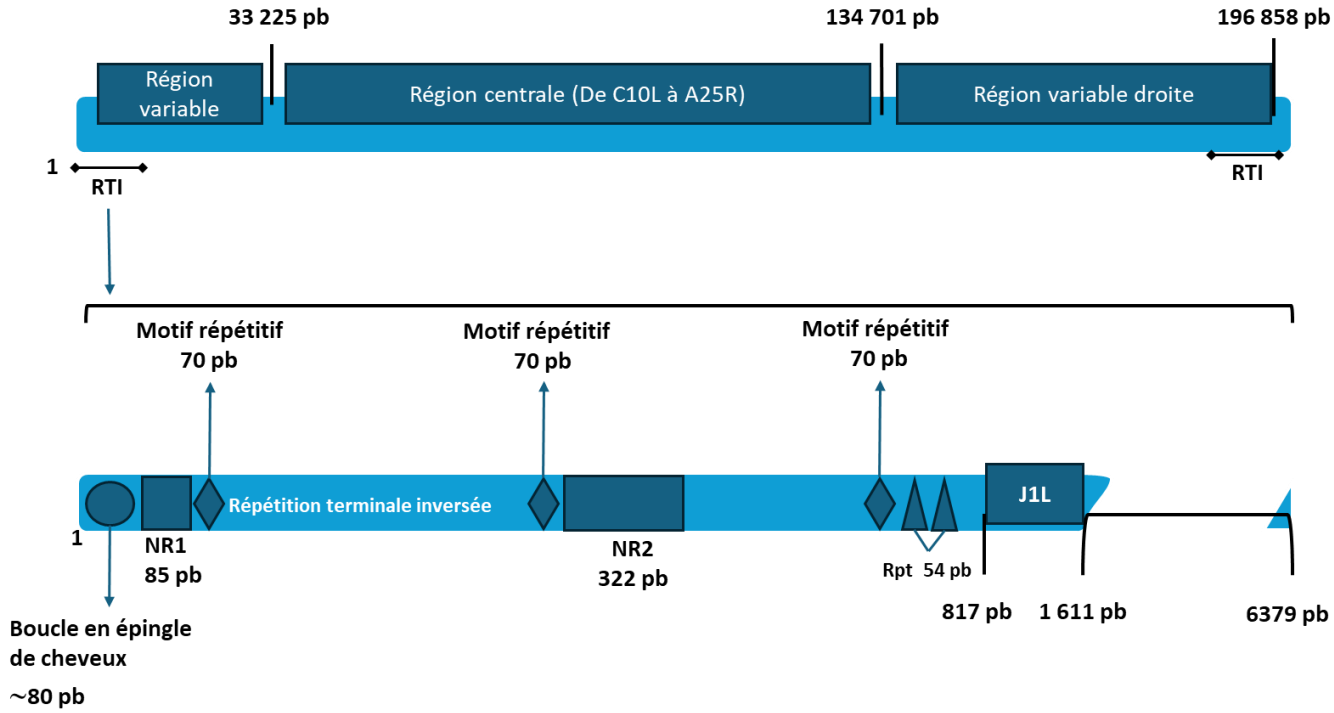


Figure 18 *: Représentation schématique de la souche NC_063383 (clade II) adapté de https://viralzone.expasy.org/9959*

La séquence hautement conservée de la région codante centrale (CRS) est située aux positions nucléotidiques 56 000-120 000 et juxtaposée d'extrémités variables contenant les répétitions terminales inversées (ITR) (Kugelman et al., 2014; S. Shchelkunov et al., 2001). En d'autres termes, chaque extrémité du génome contient des portions terminales identiques, mais orientées de manière opposée, d'une taille d'environ 6379 pb (S. Shchelkunov et al., 2001),

avec un ensemble de courtes répétitions en tandem et des boucles terminales en épingle à cheveux (Sklenovská, 2020) (***Figure 19***). Il existe au moins quatre ORF connus dans la région ITR du génome hMPXV (S. Shchelkunov et al., 2001).



- ***NR : Non répétitives, pb : paires de bases, Rpt : répétitives, RTI :répétition terminale inversée***
- ***NR1 et NR2 sont les 2 régions uniques non répétitives dans les Régions répétitives terminales inversées (RTI)***

Figure 19 *: Représentation schématique de la souche Zaire-96-I-16 (MPXV-ZAI) NC_003310 (clade I) isolée durant l'épidémie de 1996 en RDC obtenue par courtoisie de Lebeni Liège et adaptée de (Sklenovská, 2020)*

Le génome se compose d'environ 190 cadres de lecture ouverts non chevauchants (>180 pb de long) contenant 60 résidus d'acides aminés ou plus. Parmi ceux-ci, quatre sont présents dans la répétition terminale inversée. La teneur en guanine et en cytosine (GC) de l'ADN du MPXV est faible, soit environ 33.1 % (Shchelkunov et al., 2001). Certaines régions reprises dans le ***Tableau 7*** ont été identifiées comme potentiels facteurs de croissance ou impliqués dans l'évasion immunitaire(S. N. Shchelkunov et al., 2002).

***Tableau 7** : Facteur de croissance d'orthopoxvirus et gènes d'évasion immunitaire adapté de (S. N. Shchelkunov et al., 2002)*

Facteurs ou gènes	VAR-IND		MPV-ZAI		CPV-GRI	
	ORF	**taille**	**ORF**	**Taille**	**ORF**	**taille**
Facteur de croissance virale	D2R	140aa	D3R	142aa	C5R	138aa
Protéine de liaison à l'IL-18	D5L	126aa	D6L	126aa	C8L	124aa
Protéine de liaison du complément	D12L	263aa	D14L†	216aa	C17L	259aa
Facteur de résistance à l'interféron, homologue de eIF-2	C3L	88aa	—†	—	M3L	88aa
Facteur de résistance à l'interféron, protéine de liaison à l'ARNdb	E3L	190aa	F3L†	153aa	F3L	190aa
3--Hydroxy-delta 5-stéroïde déshydrogénase	A50L†	61aa	A45L	346aa	A47L	346aa
Protéine de liaison à l'interféron	B9R	266aa	B9R	267aa	B7R	271aa
Homologue de l'inhibiteur de la sérine protéase, SPI-2, inhibition de l'enzyme de conversion de l'IL-1, inhibition de l'apoptose	B13R	344aa	B12R	344aa	B12R	345aa
Protéine de liaison à l'interleukine-1	B15R†	63aa	B14R	326aa	B14R	326aa
Protéine de liaison à l'interféron	B20R	354aa	B16R	352aa	B17R	351aa
Homologue de l'inhibiteur de la sérine protéase, SPI-1, inhibition de l'apoptose	B25R	357aa	B19R	357aa	B20R	375aa
Protéine de liaison au facteur de nécrose tumorale, CrmB	—	—	J2L*	348aa	D2L*	351aa
	G2R	349aa	J2R*	348aa	H4R*	351aa
Protéine de liaison au facteur de nécrose tumorale, CrmC	—†	—	—†	—	A56R	186aa
Protéine de liaison au facteur de nécrose tumorale, CrmD	—†	—	—†	—	K2R	322aa
Protéine de liaison au facteur de nécrose tumorale, CrmE	—†	—	K1R†	70aa	K3R	167aa
Protéine de liaison aux chimiokines	—	—	J1L*	246aa	D1L*	255aa
	G3R	253aa	J3R*	246aa	H5R*	255aa
Semblable à la sémaphorine	A42R†	74aa	—†	—	A41R	402aa

* les ORF sont dupliqués dans les régions de répétition terminale inversées gauche et droite (ITR). †Les ORF présentent des différences fonctionnellement importantes par rapport aux ORF correspondants de CPV-GRI

A partir de 2021, une nomenclature unifiée pour les gènes des Orhtopoxvirus a été établie avec des gènes nommés « OrthoPoxvirus Gene XXX (OPGXXX) ». Auparavant, les gènes de nombreux virus avaient été nommés différemment. Les gènes de Vaccinia Copenhagen ont été nommés d'après le profil de digestion de l'enzyme de restriction HindIII du virus de la vaccine. Les fragments de digestion individuels ont été nommés selon l'ordre de taille de A à P. Les gènes sont numérotés pour chaque fragment et désignés selon leur sens de transcription, droite (R) ou gauche (L). Tout au long de ce travail, les 2 nomenclatures seront utilisées.

2.2.4. Réplication virale

La réplication du MPXV est commune à celle des autres *Orthopoxvirus* en particulier et des poxvirus en général, qui appartiennent au groupe I de la classification de Baltimore (Koonin et al., 2020). Le cycle de réplication des poxvirus, contrairement à la plupart des virus à ADN, se produit dans le cytoplasme de la cellule hôte(Sklenovská, 2020) tel que le montre la **Figure 20**. Il existe 2 formes infectieuses différentes : le virion mature (VM) et le virion enveloppé (VE). Le virion enveloppé diffère du virion mature qui n'a qu'une seule membrane externe, par la présence d'une membrane protéolipidique supplémentaire avec composition protéique différente (Sklenovská, 2020). La forme infectieuse définit aussi le mécanisme d'entrée du virus dans la cellule hôte. Les VE sont spécialisées dans l'expansion paracellulaire (càd d'une cellule à une autre) par ses longues et mobiles projections qui sont formées par l'actine polymérisé adhérant à la surface cellulaire (Moss, 2016). Pour les VE, la membrane externe est d'abord éliminée, exposant la membrane sous-jacente du VM. Cependant les VM sont les plus abondants. La première étape du cycle de réplication virale est l'attachement du virion à la surface de la cellule hôte. Ensuite, les virions pénètrent dans la cellule par fusion cellulaire. La libération de l'ADN viral au niveau du cytoplasme est faite par la décapsidation. Ensuite, les protéines et des facteurs enzymatiques subséquents inhibent les défenses de l'hôte

et stimulent l'expression des premiers gènes. L'ADN est transloqué jusqu'à la région périnucléaire, sans entrer dans le noyau. Il s'en suit la synthèse de l'ARNm précoce par une ARN polymérase dépendante de l'ADN viral. La traduction de l'ARNm facilite la seconde décapsidation (éliminant la membrane nucléaire), la réplication de l'ADN viral et la production des facteurs de transcription intermédiaires dans des viroplasmes, structures également nommées usines virales.

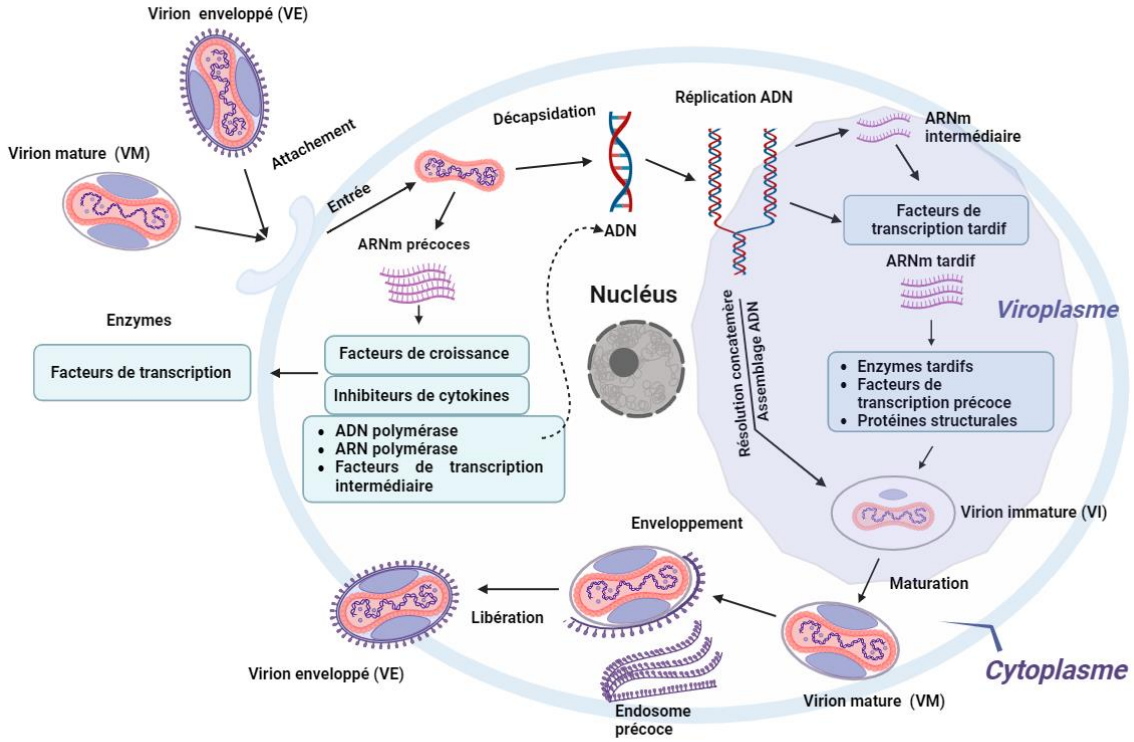


Figure 20 *: Cycle de réplication virale des Orthopoxvirus créée par Biorender.com (image obtenue par courtoisie auprès de Lebeni Liège)*

Une transcription précoce permet la synthèse d'enzymes et le facteur impliqué dans la réplication de l'ADN viral. Les molécules d'ADN nouvellement synthétisées servent de matrice pour la transcription des gènes intermédiaires dont les produits permettent la transcription des gènes tardifs. Ces derniers codent pour la synthèse des protéines virales structurales et non-

structurales (enzymes et facteurs de transcription précoce). Les protéines virales sont assemblées avec les ADN concatémères formés durant la phase précoce de la réplication pour former les virions immatures qui se transformeront en MV intracellulaire. Les MV intracellulaires n'ont pas d'enveloppe externe, mais sont infectieuses surtout après la lyse cellulaire qui les libére dans l'espace extracellulaire. Les MV qui ne sont pas casés dans la matrice protéique cytoplasmique acquièrent une seconde membrane les transformant en VE intracellulaire (Sklenovská, 2020; *Traité de virologie médicale*, 2019). La dernière étape du cycle de multiplication est la sortie des virions par une lyse ou moins fréquemment par exocytose, dans laquelle les virions sont enveloppés par des membranes cellulaires de la cellule hôte. Les formes VM intracellulaires sont dirigées grâce au réseau de microtubules vers la membrane plasmique et, fusionnent avec celle-ci pour former les virions associés aux cellules (VAC) qui déclenchent la polymérisation de l'actine et la formation des filaments qui permettent aux VAC de sortir de la cellule, étant devenus de virions enveloppés (VE) dans le milieu extracellulaire (Sklenovská, 2020). Il faut toutefois noter qu'au cours du processus de bourgeonnement, certaines particules virales peuvent rester attachées à la membrane plasmique(*Traité de virologie médicale*, 2019).

Somme toute, les formes intracellulaires et extracellulaires des VM et VE jouent un rôle important dans la pathogénie du mpox et des orthopoxviroses. Les formes intracellualires des VM et VE et les VAC sont impliquées dans une propagation de l'infection de proche en proche, alors que les VE extracellulaires sont impliquées dans la propagation systémique du virus dans l'hôte infecté (Pauli et al., 2010).

2.2.5. Diversité phylogénomique et dynamique des clades du MPXV

Sur base de sa structure génomique, MPXV est divisé selon les auteurs en deux clades distincts : le clade I et le clade II. Cette démarcation en clades I et II est associée à la pathogénicité chez l'homme, les modèles animaux, ainsi que la distribution géographique. Il

existe des différences génétiques entre les 2 clades I et II, montrant près de deux fois plus de divergence qu'entre les génomes d'un même clade. Aucune des deux sous-clades ne descend de l'autre. En plus, les deux clades comprennent des génomes des années 1960 (AY603973 Copenague) et 1970 (KJ642613 de Bokenda pour le clade I) et semblent avoir évolué séparément d'un ancêtre commun le plus récent datant de centaines d'années (Ulaeto et al., 2023).

Le clade I (anciennement désigné clade 1 ou également connu sous le nom de clade « Centrafricain » ou « Bassin du Congo ») et contenant des isolats circulant dans les pays d'Afrique centrale, auxquels quelques cas sporadiques d'exportations hors d'Afrique devraient être mentionnés en Suède et en Thaïlande. A ce jour, 2 sous-clades sont décrits dans le clade I. Bien que le premier génome complet déposé sur la genbank NCBI en 2001 (souche MPX-ZAI de l'épidémie de 1996 au Sankuru avec comme numéro d'accession AF380138 ou NC_003310) était du clade I (clade Ia précisément), peu de génomes ont été séquencés comparativement au clade II dont le nombre de génomes s'est considérablement accru avec la déclaration de la première USPPI en 2022. Peu de travaux ont caractérisé le clade I et jusqu'en 2022, 4 groupes ont été décrits dans le clade I par Kugelman et al., puis 5 groupes successivement par Nakazawa et al. et Berthet et al. (Ladnyj et al., 1972; Kugelman et al., 2014; McCollum et al., 2015; Nakazawa et al., 2015; Berthet et al., 2021). Avec l'émergence de l'épidémie de mpox dans la cité minière de Kamituga, dans la province du Sud-Kivu, un nouveau sous-clade (ou groupe) a été décrit, se transmettant essentiellement par voie sexuelle et menant à des longues chaines de transmissions, signant une adaptation à l'homme. Cette souche accusait également une grande déletion au niveau du gène OPG032 de près de 1000 paires de base, posant de soucis potentiels pour le diagnostic (Masirika et al., 2024). Son fort potentiel d'expansion a contribué aux déclarations d'urgence de santé publique de sécurité continentale par l'Africa CDC le 13 août 2024 et d'urgence de santé publique de portée

internationale par l'OMS(WHO, 2024e). Ainsi, la diversité connue du clade I a été classée dans le clade Ia et le nouveau clade clade Ib (***Figure 21***).

Le clade II ((anciennement désigné comme clade 2 ou aussi clade « Afrique de l'Ouest ») comprend également 2 sous-clades, à savoir le clade IIa et contenant des isolats provenant des pays d'Afrique de l'Ouest et le clade IIb (désigné aussi sous le nom de clade 3), qui descend du clade IIa et qui en plus d'isolats de Nigeria, comprend les isolats de l'épidémie mondiale de mpox de 2022. Dans le clade IIb, plusieurs lignées ont ensuite été identifiées telles que A.1, A.2, A.3, A.1.1 et B.1. (Cabanillas et al., 2023; Happi et al., 2022; Ulaeto et al., 2023; WHO, 2022d). Comme pour le SARS-COV-2 (Covid-19), la nouvelle nomenclature sus-mentionnée pour les 2 clades résulte d'une démarche d'alignement aux normes internationales visant à minimiser la nomenclature stigmatisante et discriminatoire généralement associée aux régions géographiques, aux nations, aux économies et aux personnes. En conséquence, il a été recommandé par exemple d'attribuer hMPXV.B.1 à la lignée à l'origine de l'épidémie mondiale ayant affecté les pays non–endémiques depuis 2022 (Happi et al., 2022)

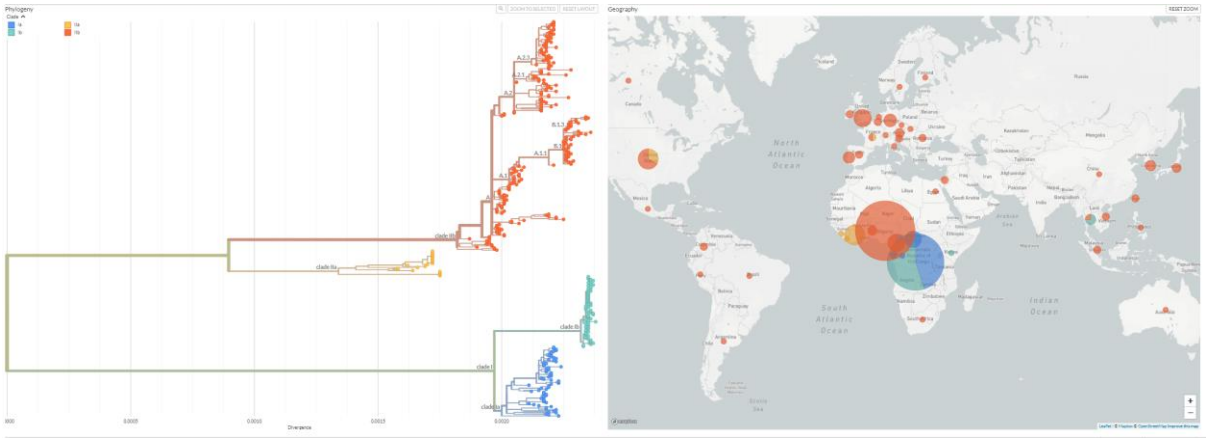


Figure 21 *: Arbre phylogénétique montrant le regroupement des clades*

Sont représentés le clade I (ex-Congo Bassin ou clade 1) en vert (clade IA diversité connue jusqu'en 2023) et bleu (clade Ib, souche ayant émergé à Kamituga à l'Est de la RDC), ainsi que le clade II, IIa (ex-Afrique de l'Ouest ou clade 2) en orange et IIb (ex-clade 3) en rouge (arbre phylogénétique à gauche et les distributions géographiques des clades de 1970 à 2024 à droite). (https://nextstrain.org/mpox/all-clades).

2.2.6. Différences génomiques entre clades I et II du MPXV

Dans ce paragraphe, il sera question de comparer fondamentalement les 2 clades (clade I et II). La plupart des études ont pris pour prototypes des génomes de clade IIa. Nous pourrons ainsi ajouter quelques détails relatifs au clade IIb en comparaison au clade II.

De nombreuses études ont mis en évidence les différences génomiques entre le clade I et le clade IIa du MPXV ainsi que la corrélation potentielle de virulence liées à des effets spécifiques de la suppression générale des réponses immunitaires de l'hôte. Les observations provenant d'infections humaines et de modèles animaux ont démontré que le clade II (y compris les sous-clades IIa et IIb) est associé à une maladie moins grave, plus faible mortalité et à des taux de transmission interhumaine plus faibles que le clade I (Okwor et al., 2023). Dans l'ensemble, le clade I et le clade IIa partagent 170 orthologues avec 99.4 % d'identité d'acides aminés dans le protéome viral. Les génomes du MPXV étaient identiques à 99 % au sein des régions géographiques (0.01-0.07 % de différence dans les comparaisons par paires entre les isolats du clade IIa) et identiques à 95 % entre les groupes géographiques (Likos et al., 2005) avec une différence de 0.55-0.56 % entre les isolats du clade I et ceux du clade Iia. Une analyse prédictive a trouvé 171 (dont 26 ORF non fonctionnels) et 173 gènes fonctionnels uniques (dont 16 ORF tronqués) dans les isolats MPXV du clade IIa et du clade I, respectivement (Chen et al., 2005; Okwor et al., 2023). En revanche, Chen et al. ont aussi décrit une différence de 0.2 % et de 1.1 % entre les souches de VARV majeur et celles du VACV, respectivement (Chen et al., 2005).

Likos et al. ont identifié neuf protéines qui diffèrent entre les deux clades avec au moins 5 acides aminés. Parmi ces protéines, quatre étaient censées jouer un rôle fonctionnel dans le cycle viral (sur la base des orthologues du virus de la vaccine) et cinq étaient censées être impliquées dans l'évasion immunitaire ou la gamme de l'hôte, y compris la régulation de l'apoptose et l'activation du complément. Les orthologues liés au cycle de vie viral

comprenaient OPG110, OPG135, OPG180 et OPG164. De multiples recherches ont identifié OPG195, B14R et OPG032 comme des déterminants liés à la virulence du MPXV qui diffèrent entre les clades I et IIa (Likos et al., 2005). Des recherches supplémentaires menées par Chen et al. (Chen et al., 2005) ont suggéré que les différences de virulence entre les clades I et IIa MPXV provenaient probablement de gènes trouvés dans les régions terminales du génome viral, qui comprenaient trois gènes qui étaient soit fragmentés dans le clade IIa MPXV (OPG195 et B14R), soit absents (D14L qui est un inhibiteur de la protéine de liaison au complément « MOPICE », un important facteur anti-inflammatoire).

En comparant le clade I au clade IIb, responsable de l'épidémie globale, d'autres différences de séquence ont été identifiées dans des orthologues non liés à la virulence et relatifs au cycle de vie viral : les alignements de séquences entre le clade I et les séquences récentes du génome viral du clade IIb révèlent que la gène B10R code pour une protéine de 221 acides aminés (aa) dans les virus du clade I, mais est fragmenté dans les virus du clade IIb (Okwor et al., 2023). La poursuite du séquençage et études offrira davantage des lumières.

En outre, les données de séquençage devraient être correlées à la clinique en vue d'établir clairement la part des différences génomiques dans les différences de virulence. En effet, les différences géographiques et d'accessibilité aux soins pourraient en partie expliquer la différence de virulence avec une sévérité et létalité faibles dans les pays développés où circule le clade II, comparés aux pays endémiques où circule le clade I (Afrique Centrale). Certaines conditions de comorbidités (virales, complications bactériennes, …) ou terrain de fragilité (âge, terrain d'immunodépression malnutrition, …) pourraient également expliquer le nombre élevé des décès, à l'instar du premier cas humain en 1970 décédé de rougeole.

Retenons que le clade I a été responsable du plus grand nombre de cas graves et de décès, alors que le clade II qu'on croyait moins transmissible, est devenu responsable du plus grand nombre de cas confirmés. Et la situation peut varier selon que le virus évolue.

2.2.7. Evolution des poxvirus

L'origine et l'évolution des poxvirus sont encore floues. Bien qu'il existe des preuves solides suggérant que ces virus sont apparus il y a des milliers d'années, leur génome a évolué par le gain et la perte de gènes, en particulier par la duplication de gènes et le transfert horizontal de gènes (HGT). L'analyse comparative des *Orthopoxvirus* a révélé que l'ADN du CPXV est non seulement le génome le plus long parmi les orthopoxvirus étudiés, mais également celui qui contient tous les éléments génétiques caractéristiques d'autres espèces d'orthopoxvirus. Par conséquent, le virus CPXV a été suggéré être le progéniteur de tous les *Orthopoxvirus* modernes pathogènes pour l'homme VARV, MPXV et VACV, considérés comme des variants du CPXV avec des délétions spécifiques à l'espèce, des réarrangements et des mutations ponctuelles dans le génome (Shchelkunova & Shchelkunov, 2022).

Certains gènes agissent sur les différences spécifiques aux poxvirus dans le tropisme et la gamme d'hôtes, et ont été appelés gènes de gamme d'hôtes (***Tableau 8***). On prévoit que tous les poxvirus codent pour une collection unique de gènes de gamme d'hôtes. Ils sont actuellement regroupés en 12 classes distinctes, Il existe actuellement un total de 12 groupes de HRG connus, dont la famille des serpines, la famille VACV-E3L, la famille VACV-K3L, la famille VACV-C7L, les protéines ANK/F, la famille Orthopoxvirus-K1L, la famille liée à B5R, la famille TNFRII, la famille T4, la famille M11L/F1L, la famille M13L et la famille P28 (Yang et al., 2024). Certaines d'autres présentent de nombreux membres (par exemple, les serpines, la famille C7L, la famille TNFRII, d'autres), qui résultent probablement d'événements de duplication de lignées.

Hendrickson et al. (Hendrickson et al., 2010) ont suggéré trois mécanismes principaux impliqué dans la variation génomique des poxvirus : (i) les mutations nucléotidiques (non synonymes) qui modifient les acides aminés ou les régions régulatrices ; (ii) l'acquisition de gènes par transfert horizontal ou la duplication de gènes par recombinaison ; et (iii) la perte de

séquences génomiques par délétion progressive entraînant une perte de fonction. Cependant, bien que ces altérations surviennent aléatoirement, elles doivent fournir un avantage sélectif pour la fixation dans le génome viral. Au cours de l'évolution de ces virus, les gènes nécessaires au cycle de vie viral migrent vers le centre du génome, tandis que ceux impliqués dans les fonctions périphériques restent dans les régions terminales du génome, expliquant la structure virale illustrée dans les points précédents. Le VARV, dont le génome est le plus petit parmi les orthopoxvirus ayant affecté l'homme, a été limité à l'homme pour l'infection et la réplication, alors que le CPXV, dont le génome est le plus grand, a la plus large gamme d'hôtes connus parmi le genre Orthopoxvirus (Hendrickson et al., 2010).

Terminons cette section en notant que le taux de mutation des poxvirus est estimé entre 10^{-5} et 10^{-6} mutations par site de réplication(Kerr et al., 2012). Ces virus sont soumis à l'édition cytoplasmique de l'ADN par des enzymes cellulaires telles que l'APOBEC3 vu qu'ils infectent les cellules immunitaires. Ce fait peut résulter en une augmentation significative de la mutagénicité induite par les erreurs de l'ADN polymérase virale. L'évolution par recombinaison homologue entre les souches co-infectées(Qin & Evans, 2014) ou par recombinaison non homologue (Vallée et al., 2021) reste possible.

Tableau 8 *: Les gènes d'intéraction avec hôtes de cinq poxvirus typiques sélectionnés.*

Famille de Gènes de spectre d'hôtes	**MPXV**(**Clade** II)	**VACV-**(souche **Cop**)	**VARV**(souche **India 1967**)	**CPXV**(souche **BR**)	**MYXV**(souche **Lausanne**)
ANK/F-box	C19L (NBT03_gp003, NBT03_gp177), NBT03_gp004, NBT03_gp008, C9L (NBT03_gp010), B4R (NBT03_gp159), B20R (NBT03_gp170), NBT03_gp176	C19L, C18L, C17L, C15L, C9L, B4R, B18R, B20R, B21R, B23R, B24R, B25R	VARVgp006, VARVgp007, B4R (VARVgp174), B18R (VARVgp187), B20R (VARVgp189), VARVgp195	C19L (CPXV006, CPXV225), C17L (CPXV008, CPXV223), B20R (CPXV011, CPXV213), CPXV017, C9L (CPXV027), CPXV025, B4R (CPXV198), B18R (CPXV211)	B4R (MYXV_gp151, MYXV_gp152), MYXV_gp008, MYXV_gp163
Famille liée au B5R-	B5R(NBT03_gp159)	C3L, B5R	C3L (VARVgp012), B5R (VARVgp175)	C3L (CPXV034), B5R (CPXV199)	C3L (MYXV_gp148)
Famille C7L	C7L (NBT03_gp011)	C7L	C4L (VARVgp003), C7L (VARVgp008)	C4L (CPXV020), C7L (CPXV029)	C7L (MYXV_gp066, MYXV_gp068), MYXV_gp067
Famille TNFRII	C22L (NBT03_gp002, NBT03_gp178)	C22L, A53R, B28R	VARVgp196	CPXV005, A53R (CPXV191), CPXV211, CPXV226	MYXV_gp003, MYXV_gp168
Famille E3L	E3L (NBT03_gp045)	E3L	E3L (VARVgp044)	E3L (CPXV070)	E3L (MYXV_gp033)
Famille F1L/M11L	F1L (NBT03_gp025)	F1L	F1L (VARVgp025)	F1L (CPXV048)	M11L (MYXV_gp015)
Famille Orthopoxvirus K1L	K1L (NBT03_gp020)	K1L	K1L (VARVgp021)	K1L (CPXV041)	–
Famille K3L	–	K3L	K3L (VARVgp023)	K3L (CPXV043)	M156R(MYXV_gp158)
Famille P28	NBT03_gp006	–	VARVgp004	CPXV023	MYXV_gp147
Famille des serpines	K2L (NBT03_gp021, NBT03_gp167, NBT03_gp171)	C12L, K2L, B14R	K2L (VARVgp022), VARVgp181, VARVgp193	K2L (CPXV042, CPXV207, CPXV217)	MYXV_gp012, MYXV_gp154, MYXV_gp155, MYXV_gp159
M13L	–	–	–	–	M13L (MYXV_gp017)
T4	–	–	–	CPXV203	MYXV_gp006, MYXV_gp165

2.3. Hôtes et réservoir des poxvirus

À l'heure actuelle, une grande diversité de poxvirus a été découverte chez les animaux sauvages et domestiques. La vaste gamme d'hôtes des poxvirus et les occurrences fréquentes de transmission croisée ont suscité des inquiétudes quant à leur potentiel à provoquer des épidémies chez les animaux et les êtres humains (Silva et al., 2020). Certains *Orthopoxvirus*, tels que le CPXV, le MPXV et le VACV, ont la capacité de circuler dans divers réservoirs animaux et de se transmettre aux humains par contact avec des animaux infectés (Haller et al., 2014; S. N. Shchelkunov, 2013; Yang et al., 2024).

Malgré les observations cumulées et avancées notables réalisées sur la connaissance des hôtes et des réservoirs des orthopoxvirus, en l'occurrence le MPXV, plusieurs zones d'ombre persistent encore et essentiellement sur la question du réservoir. Des enquêtes de séroprévalence dans la faune ont montré qu'un grand nombre d'animaux pouvaient être infecté naturellement par le virus MPXV, y compris les PNH et les rongeurs (écureuils et rats). Bien que ces derniers soient fortement suspectés d'être les réservoirs, le doute demeure encore. A tort, les primates non humains ont été incriminés comme réservoir ou hôtes principaux du MPXV à la suite des observations initiales d'épizooties ayant précédé le diagnostic chez l'homme (Arita & Henderson, 1968) et la détection des anticorps contre le virus chez différents espèces de macaques (Breman et al., 1980). En outre, un cas de transmission de mpox d'un chimpanzé symptomatique à un nourrison de 6 mois, a été décrit dans la région de Punia (Kivu, RDC) (Mutombo, 1983). Cependant, l'identité des animaux qui transmettent le MPXV à l'homme reste encore incertaine. En effet, les singes asiatiques à partir desquels le MPXV a été isolé à l'origine ont été infectés en captivité, et les sérums de singes asiatiques sauvages sont négatifs pour les anticorps orthopoxviraux.

En revanche, des études sérologiques menées dans les forêts tropicales de basse altitude d'Afrique centrale et occidentale ont montré que les rongeurs arboricoles, les singes et les chauves-souris présentaient les anticorps spécifiques aux orthopoxvirus (Doty et al., 2017; *Human Monkeypox*, 1988). La forte prévalence d'anticorps contre l'orthopoxvirus chez les écureuils arboricoles des genres *Funisciuris* et *Heliosciuris* dans quatre régions très éloignées les unes des autres de la RDC suggère qu'ils sont d'importants hôtes réservoirs (Doty et al., 2017). Les infections étant probablement de courte durée, il est rare de capturer des rongeurs porteurs du virus. Les caractéristiques environnementales des villages les plus touchés par le mpox sont repartis en trois zones distinctes : (i) la zone d'habitation de l'homme, (ii) la zone agricole et (iii) la zone de la forêt équatoriale. Les rapports socio-anthropologiques ayant permis de découvrir que la plupart des enfants (tranche d'âge la plus touchée entre 1 à 9 ans) passaient le plus de temps dans le village et ne rendaient presque pas dans la forêt, a guidé les investigateurs à rechercher le virus dans la faune comprise dans les 2 premières zones pour isoler le MPXV en RDC à partir d'un seul écureuil à corde (*Funisciurus anerythrus*). En plus, l'ADN du MPXV a été retrouvé dans 9% des peaux d'écureuils à corde provenant de musées d'Afrique centrale, la plus ancienne datant de 1899(Moss, 2024). En outre, les génomes complets (ou presque complets) du MPXV chez une musaraigne éléphant (*Petrodromus tetradactylus* anciennement identifiée *Crocidura littoralis*), un écureuil (*Funisciurus bayonii*), et des séquences plus courtes obtenues chez deux rats *(Stochomys longicaudatus, Cricetomys sp*.) prélevés en République démocratique du Congo et dont l'analyse suggère qu'outre les écureuils, un certain nombre de rongeurs, dont les musaraignes, sont impliqués dans l'écologie du Mpox, dont la diversité génomique et la distribution actuelles ont probablement été façonnées au cours des 1 000 dernières années (Mariën et al., 2024).

A l'issue de l'épidémie de Katako-Kombe au Sankuru en RDC en 1996, les anticorps ont été aussi détectés chez d'autres mammifères forestiers, dont le sanglier (*Sus scrofa*),

l'écureuil à corde (*Funisciurus anerythrus*), l'écureuil solaire (*Heliosciurus rufobrachium*), l'écureuil arboricole de Kuhl (*Funisciurus congicus*), chez le rat de Gambie (*Cricetomys emini*) et le rat à trompe tétradactyle (*Petrodromus tetradactylus*) (Hutin et al., 2001). En 2003, l'épidémie de MPXV aux États-Unis a été causée par la manipulation de chiens de prairie qui avaient été exposés à des rats à pochettes, des loirs et des écureuils à corde africains infectés par le clade IIa du MPXV dans une cargaison en provenance du Ghana (Reynolds et al., 2010). Les rats géants de Gambie (*Cricetomys spp*) avaient été cités parmi les animaux qui seraient à la base de cette épidémie des USA (Reed et al., 2004). Ces résultats ont été étayés postérieurement par les enquêtes sérologiques chez de nombreux rats au Ghana avec détection des anticorps chez plusieurs rongeurs (*Cricetomys spp*, *Graphiurus spp*, *Funisciurus anerythrus* et *Heliosciurus rubobrachium*) malgré qu'aucun cas de mpox n'ait été signalé au Ghana (Reynolds et al., 2010). Actuellement, la plupart des auteurs reconnaissent que les écureuils arboricoles en particulier, et les autres rongeurs sauvages, pourraient être le réservoir primaire du virus tandis que les singes et les autres animaux joueraient le rôle d'amplificateur du virus, tous ces animaux pouvant cependant être à l'origine de contaminations humaines directes. En outre, Curaudeau M. et al ont émis l'hypothèse selon laquelle *F. anerythrus* est l'espèce hôte réservoir, qui peut fréquemment contaminer d'autres espèces arboricoles, telles que les écureuils et les singes (hôtes secondaires), en raison de contacts réguliers (directs ou indirects) dans les arbres forestiers(Curaudeau et al., 2023).

Le MPXV a été isolé en Côte d'Ivoire à partir d'un primate mangabey fuligineux (*Cercocebus atys*) en 2010 (Radonić et al., 2014), et une épidémie chez les chimpanzés s'est produite en 2017 dans la même région (Patrono et al., 2020). Ainsi, le MPXV à l'instar d'autres poxvirus, circule dans de nombreuses espèces animales avec risque de transmission à l'homme et aux primates non humains (***Figure 22***) (Yang et al., 2024). Toutefois, peu d'études et en conséquence peu de séquençage du MPXV ont été réalisé dans la faune, et cela a fortement

limité la compréhension de la dynamique épidémiologique du MPXV et des adaptations subséquentes spécifiques aux différents hôtes, afin de mieux comprendre la transmission qui sera discutée dans le point suivant.

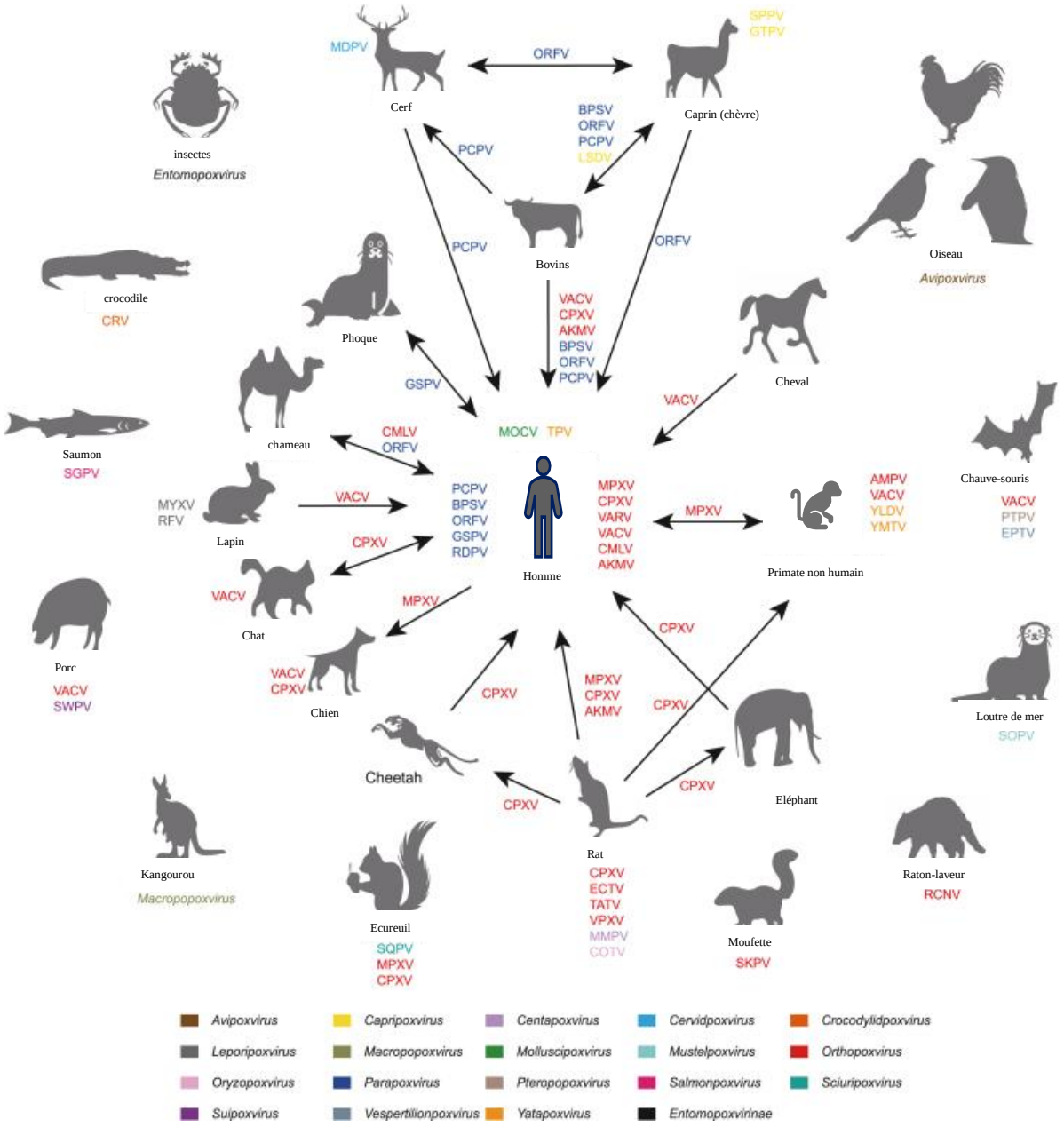


Figure 22 *: Voie de transmission des poxvirus entre différents hôtes adapté de (Yang et al., 2024).*

Les virus appartenant au même genre sont indiqués dans la même couleur. Les virus sur la flèche représentent la transmission inter-espèces entre différents hôtes.

2.4. Transmission du MPXV

On distingue deux types de transmission du virus telle qu'illustrée sur la ***Figure 22*** : la transmission interespèce et la transmission intraespèce. Le ***Tableau 9*** reprend quelques évènements de transmission interespèces des *Orthopoxvirus* repertoriés dans la littérature. Peu de cas de transmission ont été décrits avec confirmation virologique. Comme mentionné dans le point précédent, en Afrique, le virus a été retrouvé essentiellement dans la faune sauvage.

Tableau 9 *: Evènements de transmission interespèce rapportée adapté de (Yang et al., 2024)*

Virus		**Transmission**		**Référence (PMID)**	**Pays**
Genre	Virus	Espèce source	Espèce contaminée		
Orthopoxvirus	CMLV	Chameau	Homme	21571451	
	AKMV	Bovidés	Homme	25806914	
	CPXV	Rat	Eléphant	18394293	
	CPXV	Éléphant	Homme	18394293, 20580588	
	CPXV	Bovins	Homme	7999588	
	CPXV	Rat	Homme	12498670	
	CPXV	Rat	Singe	16707063	
	CPXV	Rat	Léopard	29121668	
	CPXV	Léopard	Homme	33396609	
	CPXV	Chat	Homme	18201221	
	CPXV	Homme	Chat	17359444	
	VACV	Bovidés	Homme	25811411	
	VACV	Cheval	Homme	29346277	
	VACV	Lapin	Homme	31107220	
	MPXV	Homme	Chien	35963267 (Seang et al., 2022)	France
	MPXV	Chien de prairie	Homme	16275790 (Kile et al., 2005), 14736926 (Reed et al., 2004)	USA
	MPXV	Primate Non-humain	Homme	26283752 (McCollum et al., 2015) 6132084 (Mutombo, 1983)	RDC

En considérant l'homme, la transmission interespèce est donc zoonotique et qualifiée de contamination primaire alors que celle intraespèces, est dans le contexte du présent travail la transmission interhumaine aussi qualifiée contamination secondaire. Par ailleurs, un cas de transmission de l'homme à un chien domestique, a été décrit en France en Juin 2022, suggérant l'expansion de la maladie à travers les animaux de compagnie (Seang et al., 2022)

Les cas primaires sont contaminés par contact direct avec du sang, des liquides organiques, des éruptions cutanées ou les morsures d'animaux infectés (*Human Monkeypox*, 1988; Hutin et al., 2001; Mutombo, 1983; Yang et al., 2024). Les facteurs de risque pouvant conduire l'infection mpox et à des épidémies ont lieu durant les activités de piégeage et de la chasse des animaux susceptibles d'héberger le virus, la dissection ou le transport sans précaution des proies infectées y compris pendant la préparation pour la consommation de l'animal ou leur commercialisation, la manipulation par les enfants des carcasses des animaux contaminés, ou encore à l'occasion d'une morsure par un animal blessé (Jones et al., 2008). Des premières épidémies décrites avant l'émergence du clade IIb dans le monde, la transmission zoonotique à l'homme a été la plus prépondérante, entraînant de courtes chaînes de transmission interhumaines secondaires (Arita & Henderson, 1968; Berthet et al., 2021; Kugelman et al., 2014; McCollum et al., 2015; Mutombo, 1983; Nakazawa et al., 2015; Rimoin et al., 2010; Tamfum et al., 2015). Cette transmission interhumaine peut résulter d'un contact étroit avec les sécrétions corporelles d'une personne infectée ou encore à partir des objets récemment contaminés par le virus (les vêtements, les draps de lits, …). Elle peut également se produire par voie placentaire (mpox congénital) (Fine et al., 1988; Jezek et al., 1988; Pittman et al., 2023). La transmission du MPXV parmi les contacts étroits au sein des ménages a été sujette à plusieurs études et certaines ont montré jusqu'à 6 - 7 événements de transmission intrafamiliale (Bolanda et al., 2005; Formenty et al., 2010; Tamfum et al., 2015). Il a été également suggeré depuis les premières descriptions que la transmission se produit essentiellenement par contact avec l'exsudat de la lésion (Hutson et al., 2011; Jezek et al., 1988).

Par ailleurs, des études de modèles animaux et études environnementales ont suggéré une transmission par voie respiratoire, malgré que les données issues des épidémies le suggèrent moins(Beeson et al., 2023; Hutson et al., 2011). La ***Figure 23*** : Emergence et transmission du virus dans la faune, zone rurale et zone urbaine résume différents canaux d'infection

virale, déterminant les voies probables de transmission du mpox. Actuellement les multiples introductions de la maladie dans la population humaine dont le flux de mouvement a augmenté significativement, induisent un changement évident du mode de transmission de la maladie avec des chaines de plus en plus longues (tel qu'illustré dans la ***Figure 23***), signant une adaptation du virus à l'hôte humain.

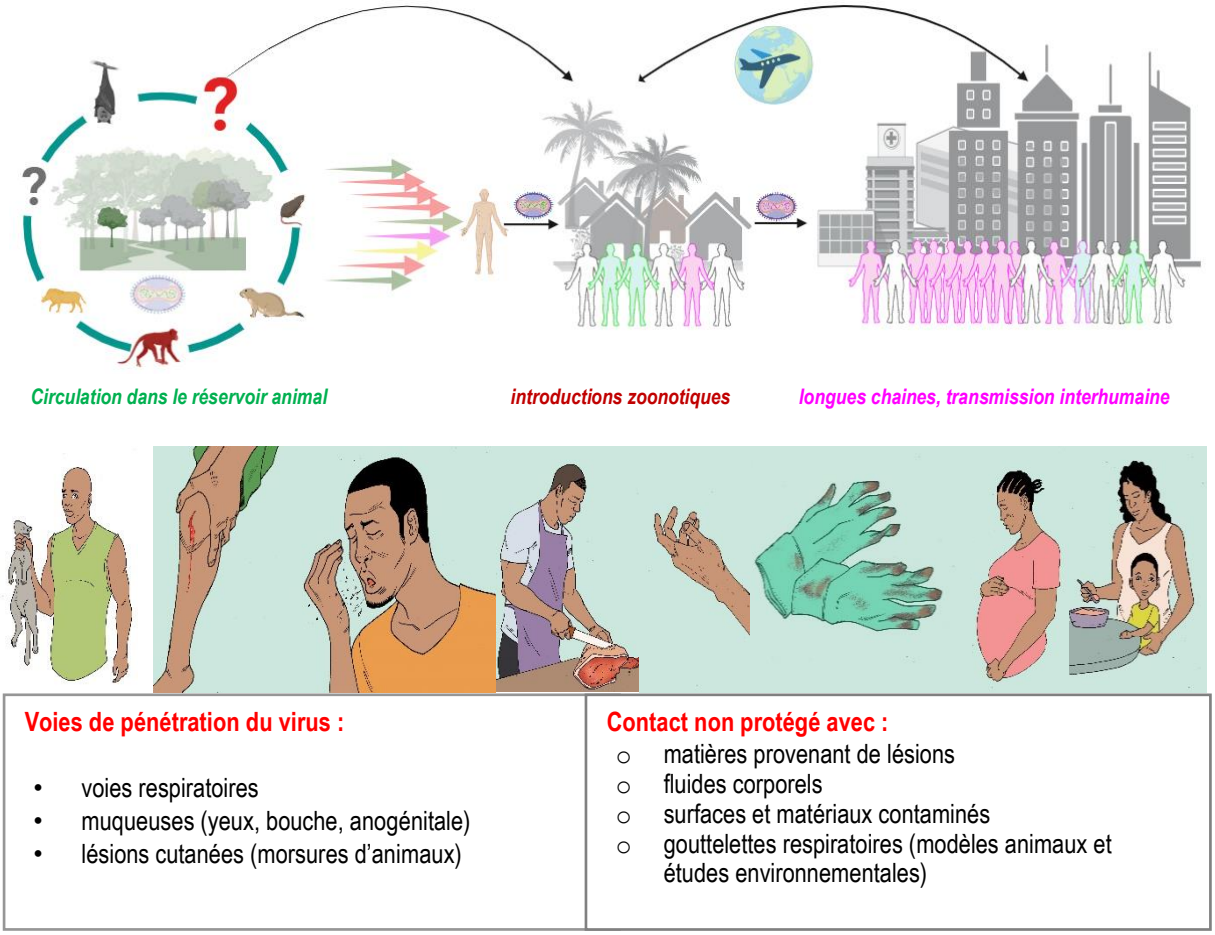


Figure 23 *: Emergence et transmission du virus dans la faune, zone rurale et zone urbaine*

La première grosse alerte enregistrée dans l'histoire de la maladie fut la grande flambée épidémique de Katako-Kombe dans la province du Sankuru en RDC, caractérisée par une transmission interhumaine très élevée, soit 78 % (Mukinda et al., 1997). Cependant, l'émergence de la maladie en zones rurales ou sémi-urbaines, difficiles d'accès ou enclavées,

a permis de contenir le mpox dans ses niches écologiques connues, à savoir les régions forestières de l'Afrique Centrale et de l'Afrique de l'Ouest. L'épidémie de 2017 au Nigéria a marqué un tournant considérable avec introductions de la maladie dans les grandes agglomérations urbaines qui ont ouvert les portes au monde. L'épidémie globale de 2022 – 2023 a donc été marquée par une transmission interhumaine soutenue.

2.5. Epidémiologie et risque pandémique : épidémie globale

2.5.1. 1958 à 1970 : des épizooties à l'émergence

Depuis la découverte du MPXV en 1958, plusieurs épizooties ont été observées parmi les primates d'Afrique ou d'Asie dans les laboratoires d'Europe et d'Amérique de 1959 à 1969. Cependant, aucun cas n'avait été signalé parmi les personnes qui entraient en contact avec les animaux malades. A la suite du diagnostic du premier cas de mpox humain dans le village de Bokenda en août 1970, faisant de lui une entité nosologique distincte, six cas supplémentaires de mpox ont été identifiés chez l'homme dans les pays d'Afrique de l'Ouest entre septembre 1970 et mars 1971. La plupart de ces patients étaient de jeunes enfants, et aucun n'avait été vacciné contre la variole alors en phase d'éradication (Gessain et al., 2022).

2.5.2. 1970 à 2000 : de l'émergence à la négligence

Depuis lors et dans les 3 décennies qui suivront, la majorité des cas seront cantonnés dans des zones de forêts tropicales du bassin du Congo et d'Afrique de l'Ouest. Les 20 premiers cas humains ont été décrits par l'OMS en 1972 et 1976, et 15 nouveaux cas ont été inclus dans la mise à jour de 1978 (Sklenovská & Van Ranst, 2018). Entre 1970 à 1979, 47 nouveaux cas de mpox ont été répertoriés parmi lesquels 38 cas notifiés par la RDC, avec un taux de létalité de 17 % (8 décès) et 83 % de patients âgés de moins de dix ans. Seulement 4 cas étaient attribués à une transmission interhumaine secondaire surtout parmi les plus proches parents (taux secondaire d'attaque de 7.5%) (Breman et al., 1980; Breman & Henderson, 1998; Bunge et al.,

2022). Cependant, l'OMS a signalé 54 cas entre 1970 et 1979, dont 47 ont été décrits par Breman et al. (Breman et al., 1980) et Jezek et al. ont rapporté 59 cas entre 1970 et 1980 (Heymann et al., 1998; *Human Monkeypox*, 1988).

Malgré la certification de l'éradication de la variole en mai 1980, l'émergence du mpox constituait un sujet d'inquiétude par le risque de transmission interhumaine, déjà évoqué à l'époque. La commission mondiale pour la certification de l'éradication de la variole a désigné le mpox comme l'infection orthopoxvirale la plus importante chez l'homme dans l'ère post éradication de la variole (à partir de 1980). Dans son rapport final de 1980, elle a recommandé la poursuite d'un programme de surveillance du MPXV, de son épidémiologie et de son écologie (WHO, 1980). C'est dans cette optique que fut diligentée un vaste programme d'investigation active en RDC (alors Zaïre) entre 1981 et 1986, à l'issu duquel 4024 personnes ont été suivies, dont 338 diagnostiqué au mpox et 3686 contacts. Des cas mpox provenant en majorité du Bandundu, l'Equateur et le Kasaï Oriental, 245 auraient été des cas index, suggérant une transmission zoonotique, soit un taux de transmission primaire de 72 %. Des 93 restant, on a distingué 69 cas de première génération, 19 de seconde et 5 de troisième ou quatrième (Jezek et al., 1988). Les études sérologiques réalisées avaient montré que l'infection subclinique était également survenue chez 18 % des contacts non vaccinés et 28 % des contacts vaccinés. Malgré un taux d'attaque secondaire maximal chez les enfants (86 % d'enfants de moins de 10 ans) et dans les foyers (jusqu'à 9.3% chez les contacts non-vaccinés vivant sous un même toit, alors qu'il est de 1.3% chez ceux présentant la cicatrice de vaccination), le taux d'attaque secondaire global est demeuré faible. Il était également corrélé ou le reflet du statut vaccinal des contacts ($\geqslant$60% au cours des années 1970 et au début des années 1980). Ainsi, l'équipe a conclu en l'inefficacité de la propagation interhumaine soutenue en l'absence de contaminations animales répétées (Jezek et al., 1988), reléguant le mpox au statut de maladie négligée. Il s'en suivra inéluctablement une baisse de la surveillance les 10 années qui suivront.

Cependant, il existait déjà des signaux attestant un changement, ou mieux une meilleure compréhension, dans la dynamique de transmission du virus, et son potentiel épidémique. En effet, le taux d'attaque secondaire était 3 fois plus élevé que celui observé entre 1970 et 1979, et le profil de distribution des patients agés suggéraient une perte d'immunité croisée conférée par la vaccination antivariolique contre cette zoonose. Au fil des années, il n'y a pas eu d'actions évidentes ni pour limiter les contaminations animales qui se sont répétées, ni pour maintenir le niveau d'immunité collective acceptable pour empêcher la transmission de la maladie. Somme toute, 386 cas sur 405 avaient été identifiés en RDC de 1970 à 1986. De la fin du programme intensif de surveillance de l'OMS (survenue en 1986) à 1992, 13 cas de mpox ont été rapportés au Gabon, au Cameroun et en RDC. Aucun cas n'a été déclaré entre 1993 et 1995 (Breman & Henderson, 1998).

Cependant, de 1996 à 1997, surviendra une grande flambée épidémique dans les zones de sante (ZS) de Katako-Kombe et de Lodja dans l'actuelle province du Sankuru (anciennement district sanitaire dans la province du Kasaï Oriental) en RDC. Le premier cas a été signalé à la mi-février 1996 dans le village d'Akungula, mais l'épidémie n'est devenue apparente qu'à la fin du mois de juillet, avec l'augmentation du nombre de cas. Soixante-onze cas suspects (dont 11 ont été confirmés par un laboratoire et 6 ont été mortels) ont été signalés dans 13 villages jusqu'au 30 août 1996. L'enquête a mis en évidence la présence d'orthopoxvirus dans tous les sérums disponibles. De février 1996 à octobre 1997, 2 pics épidémiques avaient été enregistrés, l'un en août 1996 et l'autre en août 1997 ; 511 cas suspects avaient été identifiés avec une prédominance masculine (58%) et une mortalité de 1.5 à 3 %. La transmission interhumaine était estimée à 78 % avec une contamination documentée jusqu'à la huitième génération d'un malade au sein d'une même famille. Cependant, peu de cas ont été confirmés biologiquement en raison de la situation sécuritaire précaire de l'époque (guerre de l'AFDL), contribuant à sous-estimer ce premier signal fort du fait que plusieurs cas suspects

pouvaient être confondus avec des cas de varicelle (Hutin et al., 2001; Mukinda et al., 1997), même si une coinfection n'était pas à exclure (Sklenovská & Van Ranst, 2018). Cette sous-estimation est d'emblée évidente dans cette communication de Breman et Henderson (Breman & Henderson, 1998) qui discutaient le dilemme posé par le mpox et la variole en tant que potentiel arme biologique, en ces mots : « *Reports suggesting that monkeypox might replace smallpox as a serious epidemic threat are unsubstantiated, but the threat posed by the possible use of smallpox as a terrorist weapon is genuine. Because of the gravity of this threat, all known stocks of variola virus should be destroyed as soon as possible. The deliberate deployment of this virus must be discouraged by whatever means possible.* » Et pourtant, en 30 ans d'évolution de la maladie, une augmentation de l'incidence 20 fois supérieure à celle observée dans les recherches du programme intensif de l'OMS en RDC a été démontré. (Rimoin et al., 2010).

2.5.3. 2001 à 2009 : de la négligence à la ré-émergence

La décennie suivante marquant l'entrée dans le 3ème millénaire, de février à août 2001, 31 patients dans 7 groupes distincts de maladies (foyers) ont été suspectés dans la province de l'Équateur en RDC. Des échantillons prélevés sur 14 patients ont été testés, dont 6 étaient positifs pour le MPXV, 5 pour le VZV, 1 positif pour les deux virus et 2 pour aucun. Cinq décès ont été signalés, dont quatre ont été confirmés comme étant dus au MPX (Meyer et al., 2002). En RCA, 4 cas de mpox sont également signalés dans la région de Mboumou (Berthet et al., 2021; Bunge et al., 2022). Un rapport d'agents de santé de la RDC indique que la fréquence des cas de mpox est en réalité plus importante que celle rapportée dans la littérature, avec un total, 1265 cas suspects signalés au ministère de la Santé de la RDC entre le 1er janvier 1998 et le 31 décembre 2002 (Kebela, 2004; Weinstein et al., 2005). Un autre rapport ultérieur indiquera que 2 734 cas de MPX humains suspects ont été signalés dans les 11 provinces de la RDC entre janvier 2001 et décembre 2004 dans le cadre du programme national de surveillance

de la maladie du ministère de la santé de la RDC : 380 cas ont été signalés en 2001, 545 en 2002, 783 en 2003 et 1026 en 2004. La confirmation biologique n'a concerné que 171 échantillons cliniques prélevés auprès de 136 patients (4.9 % des cas déclarés) à cause de la guerre civile. Parmi ces patients, 37.5 % étaient positifs au MPXV, 44.8 % au VZV et 0.7 % présentaient une coinfection des deux. Le ratio homme/femme était à peu près égal (66/68). Les âges variaient de 2 mois à 54 ans et la moyenne était de 15.4 ans (médiane 11 ans). L'âge moyen des patients avec MPX confirmé était de 10 ans (médiane 7 ans), alors que l'âge moyen des patients avec infection VZV était de 20.6 ans (médiane 17,0 ans, $p < 0,001$) (Rimoin et al., 2007).

Toujours à partir du 3ème millénaire, commence l'ère de la détection et de l'exportation du mpox humain en dehors des zones forestières de prédilection de la forêt d'Afrique Equatoriale dans le bassin du Congo et dans la forêt de Guinée. De mai en juin 2003, les premiers cas humains ont été rapportés aux Etats-Unis d'Amérique, dans l'Etat de Wisconsin. Ils présentaient la fièvre associée à une éruption cutanée après un contact étroit avec les chiens de prairie (*Cynomys sp*.), et d'autres rongeurs. Les investigations ont établi le lien entre la maladie et une cargaison de 800 rongeurs exotiques importés du Ghana. Ces rongeurs (*Funiscuirus spp., Heliosciurus spp., Cricetomys spp., Atherurus spp., Graphiurus spp., and Hybomys spp.*) auraient contaminé les chiens de prairies locaux logés à côté d'eux dans les boutiques de vente, qui à leur tour auraient transmis la maladie aux personnes qui les avaient achetés par morsure, griffure ou contact avec leurs sécrétions purulentes. Les investigations de laboratoire ont révélé la présence de trois espèces de rongeurs africains positives au mpox : *Cricetomys spp, Funisciuris spp* et *Graphiuris spp*. Au total, 82 cas étaient notifiés en provenance de Wisconsin, d'Indiana, d'Illinois, de Missouri, de Kansas et d'Ohio, dont 37 confirmés avaient été confirmés biologiquement et 10 probables. Les malades avaient présenté pour la plupart une forme moins sévère (clade IIa) (sauf pour 2 patients ayant été hospitalisés)

avec une éruption cutanée circonscrite au point de la morsure ou de la griffure (sauf pour un patient ayant développé une forme généralisée). Aucune transmission interhumaine n'avait été signalée, ni de décès enregistré (Bunge et al., 2022; Reed et al., 2004). Il convient de noter que c'est la manière dont une personne a été exposée au MPXV (invasive ou non invasive) qui a eu le plus d'effet sur l'évolution de la maladie contrairement aux épidémies de mpox en Afrique qui ont touché un nombre disproportionné d'enfants, et la majorité des cas de l'épidémie américaine sont survenus chez des adultes (Huhn et al., 2005; Hutson et al., 2011).

Durant la même année 2003, la République du Congo a signalé une épidémie de mpox au mois d'avril dans la ville d'Impfondo, dans le district isolé et très boisé de la Likouala (Learned et al., 2005). Il s'agit de la première épidémie de MPX signalée dans le pays avec 12 cas (3 confirmés, 8 probables et 1 suspect) dont un décès. Tous les patients (à l'exception du cas suspect) étaient âgés de moins de 18 ans. Cependant, la circulation du virus avait été suggérée auparavant par une étude de séroprévalence réalisée en 1981 (Talani et al., 1999). La transmission de personne à personne a été prédominante. Les enquêtes soutiennent l'hypothèse qu'au moins sept générations de transmission du virus (six transmissions en série) se sont produites, ce qui constitue la plus longue chaîne de transmission jamais documentée. Cela pourrait être dû à des expositions intenses ou à une transmission très efficace (Learned et al., 2005).

De septembre à décembre 2005, des cas ont été confirmés dans un environnement sub-sahélien semi-aride, au Sud-Soudan (Soudan à l'époque), pays frontalier de la RDC. Le premier patient détecté fut un enfant de 8 mois, et les 18 autres cas tous agés de moins de 32 ans. Au total, 30 cas suspects de MPX dont 10 confirmés et 9 probables ont été signalés dans 5 villages. Les 19 cas étaient répartis de la manière suivante : 2 à Bentiu, 3 à Modin, 5 à Nuria, 5 à Rubkona et 4 à Wang Kay avaient aussi été rapportés dans les villages de Nuria, Rubkona, Wang Kay et Modin. La transmission interhumaine avait été décrite pour 13 patients. La source

de contamination des autres malades était inconnue ; aucun patient n'était entré en contact avec les animaux suspectés (Damon et al., 2006; Formenty et al., 2010). Le déplacement de populations, voire des animaux, suite à la situation d'instabilité politique, aurait été à l'originie l'épidémie (Nakazawa et al., 2015). L'unique séquence du génome entier du MPXV obtenue de cette épidémie est la plus longue séquence du MPXV connue à ce jour avec plus de 200kbp. Il avait été suggéré qu'il s'agissait d'une souche différente, cependant, Nakazawa et al. ont suggéré que le duplication de séquence de 10,8 kb représente un événement de mutation unique et ne constitue pas une preuve suffisante pour suggérer une trajectoire évolutive indépendante, étant donné la similarité globale de l'isolat du Soudan avec les isolats du bassin du Congo. Leurs résultats étayent l'hypothèse selon laquelle le virus a été importé, très probablement du nord de la RDC.

La même année 2005 en RDC, est initié un vaste programme de 2 ans de surveillance active du mpox en RDC essentiellement concentrée au Sankuru, de novembre 2005 à novembre 2007 dont la description de Rimoin et al. a permis de capturer une bonne partie de la situation épidémiologique (Rimoin et al., 2010). Premièrement, 760 cas de mpox ont été confirmés en laboratoire dans neuf zones de santé sélectionnées. Ensuite, l'incidence la plus élevée a été enregistrée dans les zones ayant la plus grande couverture forestière (Kole, Lomela et Tshudi Loto) et aucune saisonnalité détectable n'a été observée. Enfin, l'âge moyen des cas était de 11.9 ans, et variait entre 5 jours et 70 ans. Presque tous les cas (92.1 %) étaient nés après les campagnes de vaccination massive contre la variole (après 1980). Comparé aux résultats des rapports des années 1980, l'incidence annuelle moyenne a été multipliée par 20 à Kole (de 0.7 à 14.4 pour 10 000) et dans les autres zones. Malgré ce seuil alarmant, ces résultats ont été jugés probablement sous-estimés en raison des ressources relativement limitées face à au défi logistique immense.

Durant la décennie 2000 – 2009, la République du Congo a notifié 73 cas, alors que la RDC a notifié près de 10 027 cas suspects (Bunge et al., 2022).

2.5.4. 2010 à nos jours : de la réémergence aux urgences

En 2010, une flambée dans la République du Congo (région de la Likouala) a été à l'origine de 10 cas (2 confirmés, 8 suspects). Elle serait en rapport avec un mouvement des réfugiés déplacés en provenance de la RDC, ayant traversé la rivière Ubangui après les violences interethniques. Le séquençage a permis d'obtenir une séquence partielle (81137 sections de nucléotides, de E9L à A24R) qui ressemblait étroitement (~99,5 %) à la souche de 2003 et distante de celle isolée en RDC entre 1979 et 1996 (Breman et al., 1980; Hutin et al., 2001).

Les données du Ministère de la Santé de la RDC pour la période 2010-2014 ont montré que le nombre de cas déclarés dépassait les 2000 cas chaque année. Au moins un cas suspect a été rapporté dans chaque région de la RDC, tandis que les provinces de l'Équateur et du Kasaï oriental comptent le plus grand nombre de cas (1166 et 708, respectivement). La raison pour laquelle la province de l'Equateur rapporte un nombre si élevé de cas suspects est probablement due à l'existence d'un projet de CDC dans le district de Tshuapa (Mwamba et al., 2014; Nolen et al., 2016). De plus, 6 cas de MPX suspectés ont été rapportés dans les zones forestières des provinces du Nord (4 cas) et du Sud-Kivu (2 cas) entre 2011 et août 2014, des zones dans lesquelles les cas de MPX sont vraiment rares. En 2014, un foyer de MPX a été signalé en Sierra Leone (Bo City) après plus de 40 ans (D. Li et al., 2017).

En RCA, de décembre 2015 à février 2016, au moins 12 personnes (dont 3 sont décédées) ont été infectées par le MPXV à Bangassou, dans la province du Mbomou (Berthet et al., 2021), alors que les provinces de la Basse-Kotto et de la Haute-Kotto ont connu au moins 26 nouveaux cas suspects (dont au moins 3 ont été confirmés) en août 2016 (Sklenovská & Van Ranst, 2018).

Entre septembre 2014 et février 2016, 587 cas suspects de MPX ont été signalés dans le cadre d'un programme de surveillance passive en RDC. La majorité des cas rapportés étaient localisés dans la province de l'Équateur (363 cas) et dans la province de Tshuapa (135 cas). Les autres provinces ont compté chacune 18 cas ou moins au cours de cette période. 55% de tous les cas suspects étaient des hommes, 320 cas suspects étaient âgés de moins de 15 ans et 256 étaient âgés de 15 ans ou plus. 592 échantillons cliniques ont été prélevés sur 339 patients, ce qui représente 57.8 % de tous les cas suspects signalés et 223 échantillons ont été testés positifs pour le MPXV, 40 pour le VZV et 78 pour aucun des deux. Il y a eu deux cas de co-infection par le MPX et le VZV (Sklenovská & Van Ranst, 2018).

Entre janvier et août 2017, la province de la Likouala (Republique du Congo) a rapporté une épidémie de mpox comptabilisant 88 cas dont 7 ont été confirmés en laboratoire, parmi lesquels 6 décès (CFR 6,8%). Au total, 18 villages dans 5 districts (Enyelle, Betou, Dongou, Impfondo et Owando) ont été touchés.

Deux épidémies ont été signalées en RCA en 2017. Le premier foyer a été signalé dans la province de Mbomou en février 2017. Des informations limitées sont disponibles pour cet événement ; 47 cas (5 confirmés) ont été signalés par l'OMS dans le bulletin de la semaine 22 (87), mais seuls 5 cas (2 confirmés) ont été signalés dans le bulletin de la semaine 38 (88). Aucun décès n'a été signalé. Le deuxième foyer a été signalé dans le district de Mbaki en avril 2017, avec 3 cas, dont 1 a été confirmé en laboratoire. Aucun décès n'a été signalé. Des investigations complémentaires soutenues par le ministère de la santé et l'OMS ont révélé que 24 des 26 (92,3 %) contacts étroits avaient des anticorps (IgG) contre mpox et 4 contre la variole de la vache. Cela suggère un niveau élevé de circulation du virus dans la région et peut expliquer le faible nombre de cas enregistrés au cours de ces épidémies.

Un cas isolé de mpox a été confirmé en Sierra Leone (district de Pujehan) en mars 2017.

De septembre 2017 à avril 2018, 244 cas dont 101 cas confirmés ont été répartis géographiquement dans 25 États et le territoire de la capitale fédérale (FCT) du Nigéria. Les

cas confirmés ont été signalés dans 15 (sur 36) États. Six décès ont été enregistrés (CFR 2.5). De septembre à décembre 2017, la majorité des cas étaient des hommes (75%) et âgés de 21 à 40 ans (médiane 30 ans). L'enquête a établi que le groupe initial de cas (deux frères, leur oncle et un voisin) était tombé malade après avoir tué et mangé un singe capturé dans le voisinage, avec lequel les jeunes garçons jouaient régulièrement. L'analyse phylogénétique a indiqué que le parent le plus proche des isolats de ce foyer était deux souches nigérianes isolées en 1971, appartenant au clade II. Cette épidémie est la plus importante épidémie de mpox documentée en Afrique de l'Ouest.

Seize cas de mpox, dont 2 cas confirmés, ont été signalés au Libéria entre novembre et décembre 2017, après plus de 40 ans depuis la dernière (et la première) occurrence signalée. Les cas ont été signalés à Grand Cape Mount (4), à Rivercress (11) et dans le Maryland (1). Deux décès ont été enregistrés (taux de létalité~12,5%) (Sklenovská & Van Ranst, 2018).

La décennie suivante, 2010 – 2019, a été notée une décennie charnière dans la situation encourue actuellement. Trois faits majeurs ont caractérisé cette épidémie. Premièrement, la maladie a été notifiée dans plus de pays que durant les décennies passées avec d'autres cas d'exportation en dehors de l'Afrique (Bunge et al., 2022; Mauldin et al., 2022). Deuxièmement, la RDC a connu un maintien de la croissance exponentielle du nombre de cas suspects en RDC avec 18 788 cas. En 2014, a sévit une épidémie dans la région du Kivu (Nord-Kivu et Sud-Kivu), en zone de conflict et ne notifiant pas régulièrement la maladie (Bunge et al., 2022; McCollum et al., 2015). Troisièmement, durant cette décennie, un fait marquant a été l'épidémie de mpox au Nigéria dont la particularité a été les introductions dans des agglomérations urbaines donnant lieu à des chaines de transmission interhumaines plus longues que d'habitude (Shchelkunova & Shchelkunov, 2022). Au total, 414 cas suspects de mpox chez l'homme, dont 152 confirmés en laboratoire, ont été identifiés en 2017-2019. Le plus grand nombre de patients était âgé de 21 à 40 ans. Des décès dus au MPXV clade II, pourtant moins

létal, ont été signalés dans 7 cas, dont 4 patients étant co-infectés par le VIH (Alakunle et al., 2020; Bunge et al., 2022; Kabuga & El Zowalaty, 2019; Yinka-Ogunleye et al., 2019). Le séquençage a permis la caractérisation de la souche qui présentait des caractéristiques la distinguant du clade II circulant traditionnellement (Alakunle et al., 2020; Okwor et al., 2023). En plus, les virus présentaient une accumulation des mutations APOBEC3 suggérant une adaptation virale à l'homme et de plus longues chaines de transmission interhumaines (O'Toole et al., 2023). Ces nouveaux variants ont été renommée clade IIb du MPXV, et l'épidémie du Nigéria regroupait la lignée A (lineage A). La notification des cas en agglomérations urbaines a eu pour conséquence inéluctable la propagation du mpox en dehors de l'Afrique ; aussi, le mpox a-t'il été signalé chez des voyageurs du Nigéria en Israël en septembre 2018, au Royaume-Uni en septembre 2018, en décembre 2019 et en mai 2021, à Singapour en mai 2019 et aux États-Unis en juillet et en novembre 2021. En outre, l'un de ces patients a infecté un agent de santé avec le mpox au Royaume-Uni (Mauldin et al., 2022; Ng et al., 2019).

Après la propagation du clade IIb peu virulent du MPXV dans la communauté des homosexuels, bisexuels et autres hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes (GBMSM), une nouvelle étape de l'évolution du virus a commencé. Après la grande parade de la « gay pride » à Gran Canaria du 5 au 15 mai 2022, des cas de mpox ont été enregistrés dans de nombreux pays sur différents continents, la grande majorité d'entre eux au sein de la population GBMSM (Holloway, 2022). Le 18 mai 2022, des cas d'infection par le MPXV ont été signalés en Espagne, au Portugal et au Canada, dans l'ordre de 7, 14 et 13, respectivement. Les premiers cas de mpox ont été confirmés en Italie, en Suède et en Belgique le 19 mai 2022. L'Australie a annoncé deux cas le 20 mai 2022, rentrant d'Europe. Dans 103 pays traditionnellement non endémiques, plus de 84 000 cas de mpox ont été signalés entre mai 2022 et janvier 2023 À partir de mai 2022, l'épidémiologie se modifie brusquement avec une série de cas signalée simultanément dans plusieurs pays en Europe (initialement en Angleterre, au Portugal, en Italie), quasi exclusivement chez les hommes ayant des relations sexuelles avec

les hommes (HSH). Le premier cas notifié en Angleterre était en lien avec un voyage au Nigeria, alors que les cas signalés ultérieurement n'avaient pas de liens avec les zones d'endémie.

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) déclarait le 23 juillet 2022 que l'épidémie de mpox était une urgence de santé Publique (WHO, 2022c). Début 2023, la situation épidémiologique dans le monde faisait état d'environ 86 000 cas recensés dans 110 pays, dont les plus concernés en nombre de cas étaient les États-Unis, le Brésil, l'Espagne et la France. Le pic de l'épidémie était atteint en août 2022. Les caractéristiques de l'épidémie de 2022 sont ainsi très différentes de celles antérieurement décrites en Afrique, étant donnée la multiplicité des épidémies concomitantes dans plusieurs pays du monde, aboutissant à un nombre important de cas déclarés (Greffe et al., 2023). Le facteur de risque le plus souvent identifié était des relations sexuelles avec un sujet infecté. La flambée mondiale a touché principalement (mais pas uniquement) les homosexuels, les bisexuels et d'autres hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes et s'est propagée de personne à personne par l'intermédiaire de réseaux sexuels. Les régions d'Asie ont également notifié des cas avec un pic à partir du printemps 2023.

En 2022, des épidémies de mpox dues au clade I sont apparues dans des camps de réfugiés en République du Soudan. Depuis 2022, on observe également une recrudescence des cas de mpox et des décès en République démocratique du Congo. Dans certaines régions du pays, une nouvelle ramification du clade I, appelée clade Ib, s'est propagée de personne à personne. À la mi-2024, ce clade a également été signalé dans d'autres pays. Du 1er janvier au 31 août 2024, plus de 106 310 cas confirmés de mpox ont été enregistrés dans 123 pays (***Figure 24***).

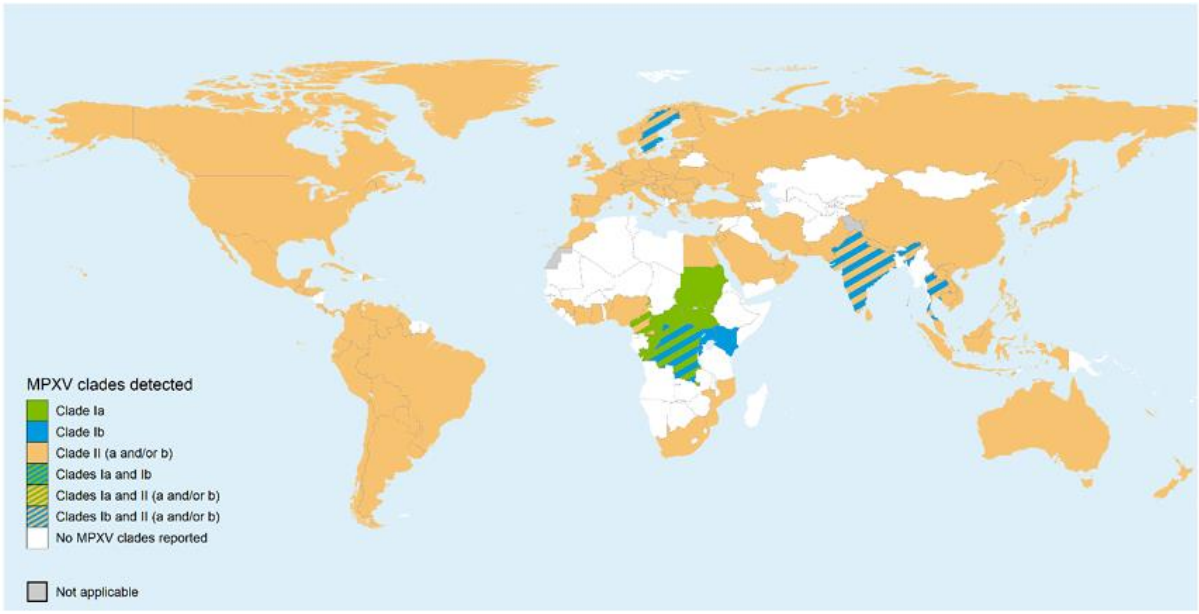


Figure 24 *: MPXV clades détectés globalement incluant les cas de 29 septembre 2024 (WHO, 2024a)*

Et cette tendance à l'expansion a été également observée à l'échelle de la RDC tel que partiellement illustré par la figure ci-dessous (***Figure 25***). Cette expansion consiste d'une part en la croissance des nombres de cas, et d'autre part en la notification des cas dans des aires géographiques non actives auparavant, ou restées longtemps silencieuses. L'un des exemples est l'épidémie de Kiri de décembre 2019 à janvier 2020, où des cas de décès non expliqués avaient été notifiées dans la zone de santé, alors que le pays faisait face à la 10ème épidémie de MVE, et que la déclaration de celle -ci à l'extinction de la 9ème épidémie MVE, s'est effectuée dans les conditions quasi-similaires(Mbala-Kingebeni et al., 2019). Au départ, des échantillons des cas avaient été prélevées comme cas suspects de fièvre virale hémorragique, a priori Ebola. Des investigations postérieures ont permis d'identifier le mpox. Les données de laboratoire indiquent que les derniers séra de cas suspects mpox en provenance de la zone de santé dataient d'octobre 2016.

Certes, l'augmentation de la surveillance boostée entre autres par l'USPPI déclarée en juillet 2022 pourrait expliquer cette hausse de notifications, cependant, elle ne suffit pas. Des études devraient être menées pour élucider cette dynamique croissante du mpox.

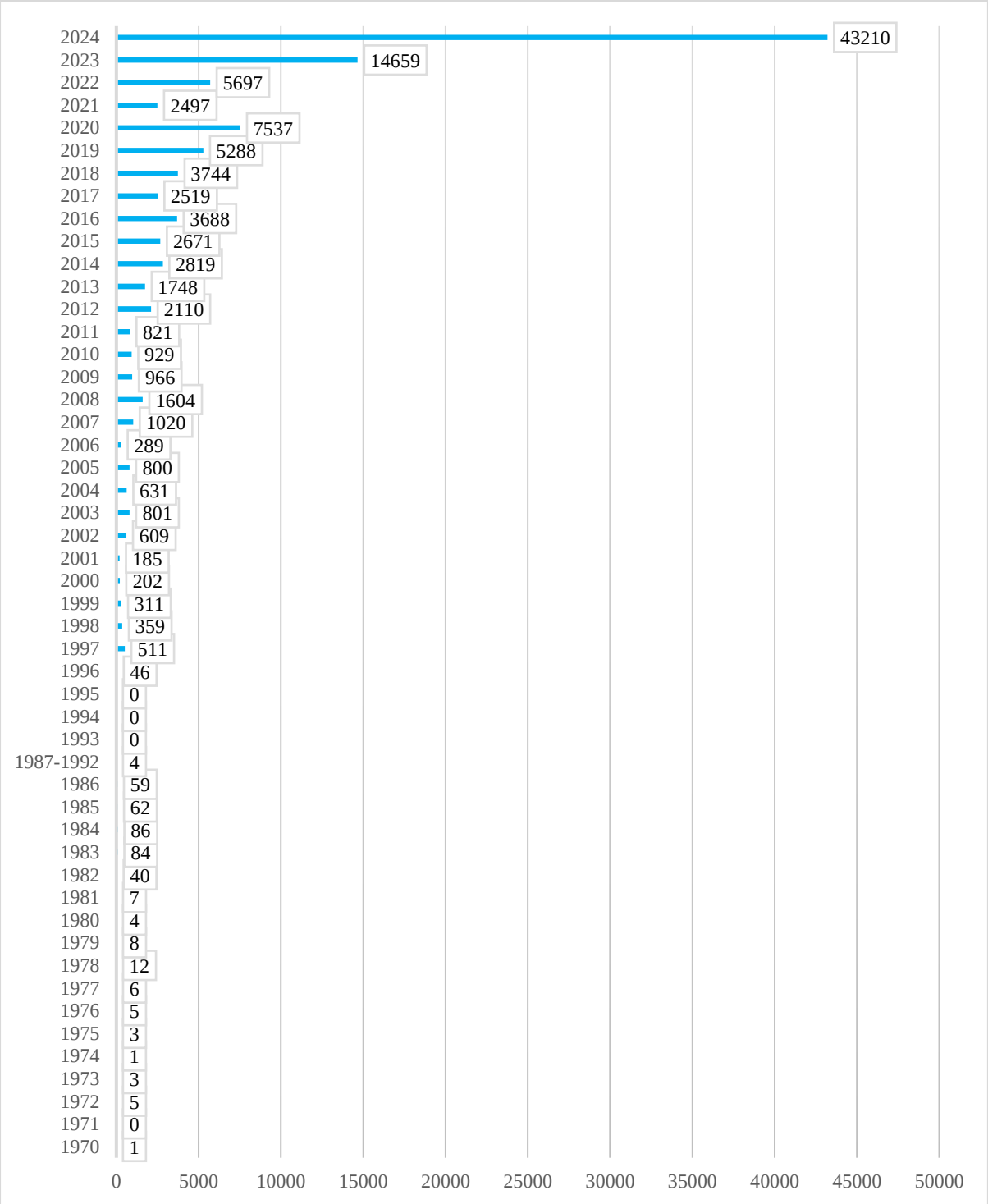


Figure 25 *: Evolution annuelle des notifications des cas suspects de mpox en RDC de 1970 à novembre 2024 (mise à jour au 16 novembre 2024)*

2.6. Diagnostic clinique

Bien qu'il existe de formes subcliniques ou asymptomatiques, pouvant aller jusqu'à 30% (Fine et al., 1988; *Human Monkeypox*, 1988; Jezek et al., 1988), le diagnostic clinique est crucial dans la surveillance et la prise en charge du mpox. Tel que vu précédemment, dans les régions avec faible accès au diagnostic biologique, le diagnostic clinique est de règle découlant sur la notification des cas suspects qui sert de cas d'indicateurs dans la surveillance. Mais il existe des caractéristiques distinctives attribuées à mpox, telles que les lymphadénopathies (hypertrophie ou tuméfaction des ganglions lymphatiques) survenant avec l'apparition de la fièvre au début de l'évolution de la maladie (Adnan et al., 2022; Shchelkunova & Shchelkunov, 2022). La période d'incubation varie entre 1 et 2 semaines (5-13 ou 10-14 jours), et peut aller jusqu'à 17 jours (Breman et al., 1980; Nolen et al., 2016). Ainsi, une période d'incubation maximale de 21 jours a été retenue par mesure de prudence. Cependant, La période d'incubation, la présentation de la maladie, la gravité et la durée peuvent également être influencées par la voie d'infection. Par exemple, l'infection par morsure peut entraîner une période d'incubation plus courte, l'absence d'un stade fébrile distinct et une maladie plus grave que les expositions non invasives (Reynolds et al., 2006).

L'évolution clinique de mpox peut être divisée en deux périodes, la période du prodrome et la période d'éruption cutanée. Une phase prodromique augure la maladie et est caractérisée par la fièvre, des céphalées intenses, de douleurs dorsales, de myalgie, une asthénie et des lymphadénopathies (Jezek et al.,1988; Weinstein et al., 2005). Celles – ci ont été décrites chez environ 90 % de patients (***Figure 26***). Elles peuvent être unilatérales ou bilatérales et peuvent survenir au niveau de la région cervicale, sous-mandibulaire, postauriculaire, axillaire ou inguinale, ou encore dans plusieurs régions au même moment.



***Figure 26** : Adénopathie latéro cervicale gauche ayant évolué vers une abcédation et fistulisation*

Après guérison quasi complète de lésion cutanée, au 28 ième jours d'infection après une semaine de traitement à l'hôpital de Kiri, Mai-Ndombe, RDC ; photographie réalisée par Kasongo François, crédit photo INRB

D'autres signes vont suivre environ une semaine après, et permettent de classer la maladie en cinq grands types (A.-J. Georges et al., 2004) :

- Formes sans éruption : les patients présentent de la fièvre mais pas d'éruptions ni de pustules, essentiellement chez les sujets immunologiquement non naïfs ;
- Formes atténuées : l'évolution est accélérée et les pustules sont petites. ;
- Formes plates : les pustules restent plates et ont habituellement une distribution confluente ou semi-confluente ;
- Formes hémorragiques : autrefois observées dans la variole (en particulier les femmes enceintes), elles ont aussi été décrites pour le mpox ;
- Formes classiques : elles se caractérisent par des lésions cutanées vésiculeuses, puis pustuleuses saillantes diverses. Elles seront décrites dans les lignes suivantes.

La période prodromique dure généralement un à trois jours avant l'apparition de l'éruption cutanée maculo-papuleuse (Cabanillas et al., 2023; Jezek et al., 1988; Pittman et al., 2023; Reynolds et al., 2006). La plainte clinique la plus fréquente, qui emmène le plus souvent à consulter, est l'éruption cutanée (96.8 %) (Pittman et al., 2023) La période d'éruption cutanée se caractérise par quelques à plusieurs milliers de lésions (Sklenovská, 2020). Les lésions apparaissent

simultanément et évoluent à peu près au même rythme. Les lésions progressent des macules aux papules entre 2 à 5 mm, aux vésicules, aux pustules et enfin aux croûtes. Leur distribution est principalement périphérique mais peut couvrir l'ensemble du corps lors d'une maladie grave. Selon la gravité de la maladie, il faut environ 2 à 3 semaines pour que les lésions sèchent et se desquament. Ces lésions distribuées de façon centrifuge, sont très sensibles à la palpation. Elles apparaissent premièrement aux extrémités c'est-à-dire les membres dont les avant-bras, mains, jambes et pieds, au visage, avant de se propager sur tout le corps. Les lésions peuvent également se trouver sur les muqueuses de la bouche, de la langue (**Figure 27**) et sur les organes génitaux.



***Figure 27** : atteintes du Mpox aux des muqueuses buccales (langues, faces internes des joues et vermillon)*
A gauche : lésions vésiculo-papuleuses associées à de dépôts fibrineux blanchâtres au-dessus et en-dessous de la langue chez un patient de 10 ans au 15ième jour d'infection (après début des symptômes), traité à domicile, au Mai-Ndombe, RDC
Au centre : lésions papuleuses sous forme d'un dépôt fibrineux arrondi déprimé au centre sur la langue, chez un patient de 14 ans au 12ième de l'infection hospitalisé, au Mai-Ndombe, RDC
A droite : dépôts fibrineux à la gorge chez et lésions vésiculo-pustuleuses, déprimées au centre au 19ème jour de l'infection, succédant des maux de gorges et une tuméfaction latéro-cervicale comme premier signe avant la fièvre et éruption cutanées chez un personnel de santé en zone d'épidémie, au Mai-Ndombe, RDC
Photographies réalisées par Kasongo François, crédit photo INRB

Ces éruptions progressent des papules vers les vésicules, les pustules, les lésions ombiliquées et les croutes pendant environ 14 à 21 jours avant que la desquamation intervienne en laissant souvent des cicatrices dépigmentées.

Tableau 10 *: Evolution des lésions cutanées (adaptée de https://www.cdc.gov/mpox/hcp/clinical-signs/index.html)*

Etape	durées	Characteristics
Enanthème		Parfois, des lésions se forment d'abord sur la langue et dans la bouche (***Figure* 27**).
Macules	1−2 jours	Apparition de lésions maculaires.
Papules	1−2 jours	Les lésions progressent généralement de maculaire (plate) à papuleuse (surélevée).
Vesicules	1−2 jours	Les lésions deviennent alors généralement vésiculaires (surélevées et remplies de liquide clair).
Pustules	5−7 jours	Les lésions deviennent alors généralement pustuleuses (remplies de liquide opaque) – fortement surélevées, généralement rondes et fermes au toucher (profondément ancrées). Enfin, les lésions développent généralement une dépression au centre (ombilication). Les pustules resteront environ 5 à 7 jours avant de commencer à former des croûtes.
Croûtes	7−14 jours	À la fin de la deuxième semaine, les pustules ont formé des croûtes et des croûtes. Les croûtes resteront pendant environ une semaine avant de commencer à tomber.
Cicatrices	quelques jours à plusieurs semaines	Des cicatrices piquées et/ou des zones hyper ou hypopigmentées peuvent rester après la chute des croûtes. Une fois que toutes les croûtes sont tombées et qu'une nouvelle couche de peau s'est formée, la personne n'est plus contagieuse

Selon le score de « sévérité clinique », basé sur la quantification des éruptions cutanées, l'OMS subdivise les cas de mpox en 4 formes (Breman et al., 1980) :

- Forme légère ou bénigne : patient avec moins de 26 lésions cutanées sans incapacité physique et n'ayant pas besoin des soins spéciaux ;
- Forme modérée : patient avec 26 à 100 lésions cutanées, incapable de réaliser la plupart d'activités physiques mais ne nécessitant pas des soins infirmiers ;

- Forme sévère : patient avec 101 à 250 lésions cutanées, se caractérisant par une incapacité physique complète et nécessitant des soins médicaux ;
- Forme grave : patient avec plus de 250 lésions cutanées, avec incapacité physique complète et nécessitant des soins intensifs (***Figure 28***).



Figure 28 *: nombreuses lésions (au-delà de 250): lésions ulcéreuses suintantes, papulo- ulcéreuse à nécrotiques*

Avec parfois des croutes jaunâtres au 30 ième jour de l'infection ; nombreuses lésions de scarification au plantes de pieds , chez une mère allaitante au troisième post partum (Décédé au 32 ième de suite d'un sepsis à porte d'entrée cutanée et d'une dénutrition) dans le Maindombe en RDC ; photographies réalisées par Kasongo François, crédit photo INRB

Parmi les complications liées à l'éruption cutanée, figurent la surinfection bactérienne secondaire (courante) et une déshydratation. Les patients présentent souvent des symptômes gastro-intestinaux (***Figure 29***) tels que des nausées, des vomissements, de la diarrhée et une perte d'appétit. En plus, des lésions buccales et du tube digestif peuvent être apparentes(Sklenovská, 2020).

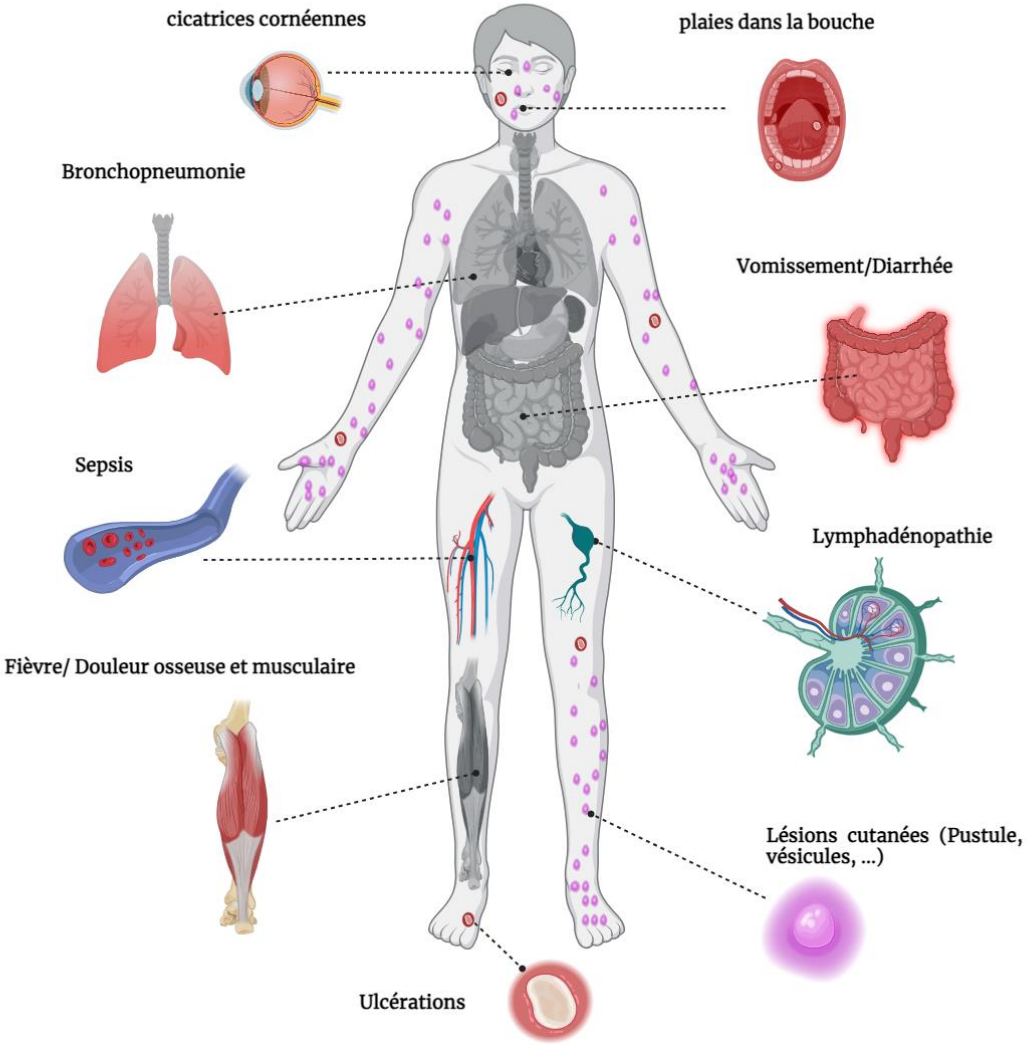


***Figure 29** : Manifestations cliniques du Mpox et organes atteints (image de courtoisie créée avec biorender.com par Lebeni Liège)*

Des infections oculaires par le MPXV (***Figure 29*** et ***Figure 30***) et des infections bactériennes secondaires peuvent également survenir rendant souvent l'œil du patient inflammé, rouge, sensible à la lumière et pouvant découler à une perte de vision.



***Figure 30** : atteintes occulaires chez des patients mpox*

A gauche : Tuméfaction palpébrale, sécrétion conjonctivale avec difficulté d'ouverture de l'œil et photophobie importante unilatérale gauche associée à lésions ulcéreuses suintantes en plus des lésions vésiculo-pustuleuses au centre déprimé chez un enfant de 4 ans au 33ième jour d'infection et 20ème jour d'hospitalisation (Kiri, Mai-Ndombe) ;
A droite : Muqueuses palpébrales et bulbaires hyperémiées, larmoiement associée à un exsudat à l'œil droit, chez une femme adulte investiguée à Mbaya, Sud-Ubangi, RDC
Photographies réalisées par Kasongo François, crédit photo INRB

Les voies respiratoires peuvent également être touchées ; les patients peuvent présenter une toux, des difficultés respiratoires ou une bronchopneumonie (***Figure 29***). L'encéphalite et la septicémie sont d'autres complications (Pittman et al., 2023; Reynolds et al., 2006).

Chez certains patients, des séquelles plus ou moins importantes peuvent être observées telles que des cicatrices varioliques, des cicatrices chéloïdiennes, une chute totale ou partielle des cheveux (alopécie), des opacités cornéennes et des cas de cécité uni ou bilatérale. Certains patients peuvent développer une encéphalite et une septicémie.

Les formes asymptomatiques ont été décrites chez des personnes exposées n'ayant jamais développé les signes cliniques de la maladie mais dont les examens sérologiques étaient positifs (Jezek et al., 1988; MacNeil et al., 2009; Reynolds et al., 2010). Déjà soupçonnées, les formes asymptomatiques et paucisymptomatiques ont également été observés et mieux décrites dans l'épidemie mondiale de 2022(De Baetselier et al., 2022) en Belgique, expliquant non seulement la magnitude de l'épidémie avec plusieurs chaines de transmission apparemment non liée, mais aussi l'inefficacité des mesures telles la mise en quarantaine pour le contrôle de la maladie.

2.7. Diagnostic différentiel

Plusieurs autres fièvres éruptives font diagnostic différentiel avec le mpox, à savoir la varicelle, de la dermatite allergique, de l'eczéma herpétique, des dermatites herpétiformes, le tanapox, des dermatites varioliques causées par les Rickettsies et le *Molluscum contagiosum*. Le plus souvent, le mpox est confondu à la forme sévère et atypique de la varicelle, particulièrement dans les lieux où cette maladie n'a pas été mise en évidence pendant plusieurs années (MacNeil et al., 2009; Sklenovská, 2020).

Le mpox peut être différenciée de la varicelle par les adénopathies (***Figure 26***) et de la période prodromique. La varicelle a un prodrome et une évolution clinique plus courts et plus bénins, la lymphadénopathie est peu fréquente et la mort est extrêmement rare (Jezek et al., 1988; Sklenovská, 2020).

Cependant, les personnes immunodéprimées et/ou agées peuvent développer une forme sévère de la varicelle avec un taux de létalité élevée. En outre, les lésions cutanées varicelleuses avec une distribution centripète, sont plus petites, superficielles avec des bords irréguliers et se transforment progressivement en croûtes après 3 ou 5 jours (Jezek et al., 1988; MacNeil et al., 2009; Sklenovská, 2020), contrairement à celles dures, profondes et bien circonscrites. Enfin, la survenue des éruptions cutanées au niveau des paumes des mains et des plantes des pieds est plus caractéristique du mpox que de la varicelle, même s'elle peut également s'observer lors de la syphilis secondaire, les infections causées par les rickettsies, certains états immunologiques et certaines formes atypiques de la varicelle (MacNeil et al., 2009). Bien que les co-infections par le MPXV et le VZV ont été signalées, le rôle du VZV dans l'épidémiologie du MPXV n'est pas clair.

2.8. Diagnostic virologique et profil biologique

Le tableau clinique du mpox étant très similaire à plusieurs autres maladies, seuls les examens de laboratoire permettent de confirmer l'infection. Plusieurs tests de laboratoire peuvent être utilisés pour établir le diagnostic spécifique : les tests immunohistochimiques, la microscopie électronique, la culture du virus, les tests sérologiques et les techniques de biologie moléculaires (PCR, séquençage). Cependant, la majorité d'entre eux sont peu spécifiques et ne permettent pas toujours distinguer le mpox d'autres poxviroses (Weinstein et al., 2005).

Les échantillons utilisés pour le diagnostic comprennent les croûtes, les vésicules ou écouvillons de sécrétions des lésions cutanées, les biopsies cutanées, les écouvillons oro-pharyngés et le sang. Un fait important à considérer est le fait que le choix de l'outil diagnostique et de l'échantillon y référent devrait tenir compte de la cinétique (***Figure 31***) des marqueurs directs (acide nucléique, antigène) ou indirects (anticorps), afin de garantir des performances optimales.

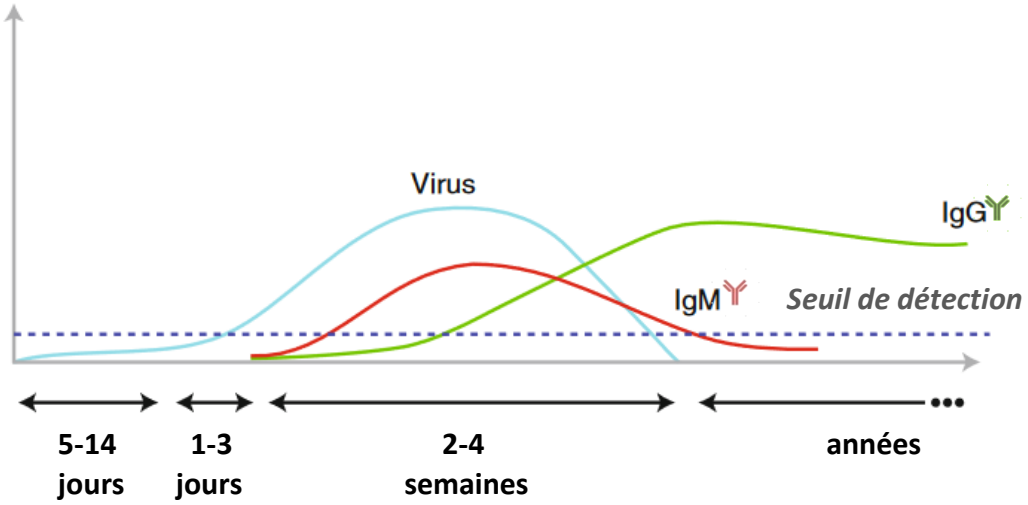


Figure 31 *: cinétique des marqueurs du mpox adapté de (Sklenovská, 2020)*

2.8.1. Prélèvement et stockage des échantillons

Devant un cas suspect, des précautions devraient être prises pour le prélèvement afin d'éviter des transmissions secondaires nosocomiales. Les précautions standardes impliquent l'utilisation des équipements de protection individuelle (EPI) utilisés par le personnel soignant. Ceux-ci comprennent la blouse de protection, les gants, les lunettes (ou écran facial) et un masque respirateur à particules approuvé par le NIOSH (National Institute for Occupational Safety and Health) et équipé de filtres N95 ou plus.

Les Centres américains pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC.US) recommandent des écouvillons synthétiques stériles (en polyester, nylon ou dacron) munis d'une tige en plastique, en bois ou en aluminium fin pour recueillir des échantillons suspects ou confirmés du virus mpox en vue d'un test de diagnostic. Le matériel des lésions cutanées, y compris les écouvillons de la surface des lésions, l'exsudat des vésicules ou les croûtes des lésions sont les types d'échantillons recommandés pour les tests de laboratoire des spécimens du MPXV (CDC, 2024b). Les procédures et le matériel utilisés pour recueillir les échantillons peuvent varier en fonction de la phase de l'éruption (par exemple, écouvillons de la surface de la lésion ou croûtes de la lésion en voie de guérison). Selon la disponibilité en kits de prélèvement et l'état du patient, il est recommandé de prélever deux écouvillons sur chaque lésion, de préférence à des endroits différents du corps ou sur des lésions d'aspect différent (par exemple, une paire d'écouvillons pour chaque lésion avec un total de 2 à 3 lésions). L'écouvillonnage doit être vigoureux sur chaque lésion, en évitant de contaminer les mains gantées, afin de garantir la collecte d'une quantité suffisante d'ADN viral (CDC, 2024b). Il n'est pas nécessaire d'aspirer les lésions (ou d'utiliser des instruments tranchants pour le test mpox) avant de procéder à l'écouvillonnage, et cela n'est pas non plus recommandé en raison du risque de blessures par des objets tranchants. Les écouvillons des lésions, des croûtes et des vésicules sont placés dans des tubes séparés (CDC, 2024b).

Dans certaines conditions, les urines, le sperme et les écouvillons rectaux ou vaginaux peuvent également être prélevés. Enfin, le diagnostic du MPXV peut se réaliser par l'analyse du sang total anticoagulé à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ; cependant, comme la virémie n'est détectée qu'au début de la maladie, avant la phase prodromique accompagnée d'une lésion cutanée, l'échantillon peut ne plus contenir des niveaux substantiels de virus (Arunagiri et al., 2024; CDC, 2024b; Sklenovská, 2020). Cependant, dans des régions réculées, avec ressources limitées, le sang est le plus souvent prélevé, tel qu'observé en RDC jusqu'avant 2024.

Après le prélèvement, si le test n'a pas lieu directement après le prélèvement, l'échantillon peut être conservé au réfrigérateur (2-8°C) jusqu'à 7 jours après prélèvement. Les écouvillons dans le VTM (Viral Transport Medium) et les croûtes de lésion qui sont conservés à l'état congelé (-20°C ou moins) peuvent être testés jusqu'à 30 jours après le prélèvement, tandis que les écouvillons secs qui sont conservés à l'état congelé (-20°C ou moins) peuvent être testés jusqu'à 60 jours après le prélèvement (CDC, 2024b). Le stockage à plus long terme est recommandé à -70°C (Arunagiri et al., 2024). Les procédures de conservation sus-mentionnées sont essentielles pour la fiabilité des résultats.

Une manipulation et un stockage appropriés des échantillons pendant le transport sont nécessaires pour la précision des tests et du diagnostic. Les échantillons cliniques, les isolats viraux et les cultures provenant de cas suspects, probables ou confirmés de MPXV doivent être expédiés dans la catégorie A, UN2814 "matières infectieuses affectant l'homme" lors de voyages à l'étranger. Selon la section 1.5.1 de l'ADR (adverse drug reaction), certains pays ont choisi de reclasser le MPXV dans la catégorie B de l'UN3373. Tous les échantillons transportés doivent être correctement tri-emballés, étiquetés et avoir une documentation adéquate fournie (Arunagiri et al., 2024; CDC, 2024b).

2.8.2. Diagnostic au laboratoire

Les méthodes conventionnelles de détection du MPXV employées au cours de ce demi-siècle comprennent la microscopie électronique, la culture virale, la sérologie et les approches immunologiques et la biologie moléculaire (Arunagiri et al., 2024).

1. Biosécurité au laboratoire

Les mesures de biosécurité incluent les précautions standard dont le port d'un équipement de protection individuelle (EPI) approprié, un accès restreint et la garantie que les échantillons ne sont manipulés que par des professionnels qualifiés, étant donné que la survenue d'infections par le MPXV chez le personnel de santé a été documentée dans le monde entier. Les tests de diagnostic de biologie moléculaire et certains tests sérologiques utilisant des produits pathologiques au préalable inactivés, peuvent être réalisés dans un laboratoire de niveau de sécurité biologique 2 (BSL-2). Cependant, il est recommandé de les effectuer au moins dans une enceinte de sécurité biologique de classe II (BSC). Par ailleurs, les procédures impliquant les travaux avec des virus vivants, comme la culture ou l'isolement de virus, ne doivent être effectuées que dans un laboratoire équivalent au niveau de sécurité biologique 3.

2. Culture virale et microscopie électronique

Historiquement, les poxvirus étaient diagnostiqués en fonction de leurs propriétés biologiques par des tests d'isolement du virus. La morphologie résultant des effets cythopathogènes sur la membrane chorioallantoïdienne d'un embryon de poulet ou la température du plafond reproducteur dans une culture cellulaire ont permis d'identifier des poxvirus particuliers. Cependant, ces méthodes sont limitées à des laboratoires bien équipés et impliquent un temps conséquent d’expédition de l’échantillon en plus d’être laborieuses et longues (Jezek et al., 1988; Lewis-Jones, 2004). De même, la microscopie électronique à coloration négative était largement utilisée pour le diagnostic des virus avant le développement des techniques moléculaires, mais étant donné les caractéristiques morphologiques similaires

des OPV, la différenciation des espèces au sein des genres n'est pas possible (Sklenovská, 2020). Le matériel lésionnel est l'échantillon le plus approprié pour les techniques mentionnées ci-dessus.

La microscopie électronique, appliquée aux biopsies cutanées, était l'un des principaux tests de diagnostic viral dans le passé (Gentile and Gelderblom, 2005). Néanmoins, ce test est onéreux, moins accessible et exige une main d'œuvre très qualifiée et ne permet pas de différencier les différentes espèces d'*Orthopoxvirus*.

3. Tests immunohistochimiques et sérologiques

Les techniques de détection immunologique du MPXV comprennent l'immunohistochimie, le dosage immuno-enzymatique (ELISA), le western blot (WB) et le dosage radio-immunologique (RIA), qui sont tous basés sur le principe de la liaison spécifique des antigènes aux anticorps (Zhou & Chen, 2023).

L'utilisation des examens histologiques est combinée aux tests immunologiques (analyses immuno-histochimiques) au moyen d'anticorps polyclonaux ou monoclonaux antipoxvirus, parce que les lésions histopathologiques provoquées par le MPXV ne sont pas pathognomoniques du mpox et peuvent rencontrées dans certaines autres maladies virales, dont notamment la variole, la vaccine, la varicelle, l'herpès zoster et simplex (Sklenovská, 2020).

Les tests sérologiques de détection du mpox sont utiles dans diverses circonstances, notamment pour identifier une infection auto-atténuée, déterminer une maladie asymptomatique et surveiller l'immunité. Cependant, des tests commerciaux restent rares et peu spécifiques car le MPXV et d'autres orthopoxvirus présentent une réactivité antigénique croisée (Arunagiri et al., 2024). La protéine MPXV A29 est la protéine de l'enveloppe, qui médie la reconnaissance du virus par la cellule hôte et est considérée comme la cible protéique la plus importante pour plusieurs MPXV (Zhou & Chen, 2023). Les anticorps IgM peuvent être

détectés cinq jours après l'infection à l'aide d'un test immuno-enzymatique, tandis que les anticorps IgG peuvent être détectés huit jours plus tard à l'aide d'un test ELISA.

Plusieurs tests sérologiques pour les antigènes de MPV existent également. Mais ils ne sont pas non plus très spécifiques à cause de la relation antigénique étroite entre les antigènes de surface des *Orthopoxvirus*. Pour contourner cet écueil, Dubois et al. ont proposé une étape de pré-absorption avant ELISA afin d'épuiser autant d'anticorps à réaction croisée et ont introduit l'usage de la protéine B21R (Dubois et al., 2012; Zhou & Chen, 2023). La neutralisation a été également utilisée dans certaines études pour obtention de réaction spécifiques. Bien qu'un kit de test rapide à base d'une cassette d'immunodosage latéral pour la détection de l'antigène et des anticorps MPXV pendant l'infection a été développé par JOYSBIO avec succès(Chauhan et al., 2023), les méthodes de biologie moléculaire restent à ce jour les plus utilisées.

4. Biologie moléculaire

Pour le MPXV, les tests de diagnostic moléculaire basés sur la PCR quantitative (qPCR) sont souvent utilisés. Dès 1995, Ropp et al. ont constaté que la séquence du génome codant pour la protéine hémagglutinine pouvait être utilisée comme cible pour identifier les VPO à l'aide d'amorces PCR spécifiques de cette région (Ropp et al., 1995). Cependant, comme tous les OPV contiennent de l'hémagglutinine, il devient difficile de détecter spécifiquement le MPXV. Afin d'améliorer la détection du MPXV par la PCR traditionnelle, Meyer et al. ont signalé que le gène codant pour la protéine du corps d'inclusion de type A (ATI) pouvait être utilisée pour distinguer le MPXV des autres OPV dans les tests PCR (Meyer et al., 1997). Plus tard, Neubauer et al ont identifié une délétion unique de 8 pb dans le gène ATI et ont démontré expérimentalement qu'elle pouvait être utilisée pour la détection spécifique du MPXV par PCR (Neubauer et al., 1998).

La PCR en temps réel est préférée à la PCR classique ou conventionnelle, entre autres pour le temps réduit d'analyse et de détection se faisant en temps réel et ne nécessitant pas une étape supplémentaire de révélation. En plus, la PCR en temps réel a une sensibilité et une spécificité plus élevées. La valeur de quantification du cycle (Cq) ou le cycle seuil (Ct pour cycle threshold) obtenue en ajoutant une sonde marquée par fluorescence au mélange réactionnel mesure l'intensité du signal de fluorescence du produit amplifié en temps réel et peut être utilisée pour non seulement confirmer la présence du MPXV dans l'échantillon, mais aussi estimer la charge virale (Y. Li et al., 2006).

Les amorces et les sondes de ces tests sont conçues à partir de régions conservées de la région des répétitions terminales inversées (RTI) du virus et de la zone de codage centrale.

Un certain nombre de tests génériques de PCR en temps réel pour le MPXV ont été mis au point pour distinguer le virus d'autres orthopoxvirus, soit directement, soit en utilisant des courbes de fusion pour distinguer les différents orthopoxvirus après l'amplification de la PCR (Maksyutov et al., 2016; S. N. Shchelkunov et al., 2011). Pour distinguer les souches du MPXV (c'est-à-dire le clade I et le clade II), le séquençage de l'ADN est nécessaire après l'amplification par PCR (Edghill-Smith et al., 2005). Le séquençage du mpox a joué un rôle crucial dans la caractérisation des épidémies et reste en plein essort. A ce jour, des efforts de standradisation à l'échelle globale sont actuellement en cours et ont permis d'inventorier les différentes approches présentées à la **Figure 32**.

Les formats PCR et LAMP multiplexés sont utilisés dans les tests spécifiques aux clades pour identifier les régions génomiques du MPXV qui diffèrent légèrement dans la composition des nucléotides entre les clades I, IIa et IIb. Toutefois, dans les pays où le mpox est endémique, l'accès aux tests moléculaires est limité malgré le besoin criant. Cependant, il n'existe pas de données définitives sur la charge virale minimale requise pour que l'homme soit

considéré comme infecté par le MPXV, et aucune relation significative n'a été observée entre le moment où apparaissent les manifestations cliniques chez les patients et la valeur Cq du virus dans le plasma (Zhou & Chen, 2023).

Des stratégies innovantes sont de plus en plus en développement afin de permettre de réduire le temps d’analyse, de manipulation, le risque de contamination croisée, tout en misant sur les performances (sensibilité, spécificité et valeurs prédictives positive et négative), l’accessibilité et la possibilité de déploiement dans de zones à ressources et énergie limitée. Ces stratégies sont présentées dans le ***Tableau 11***

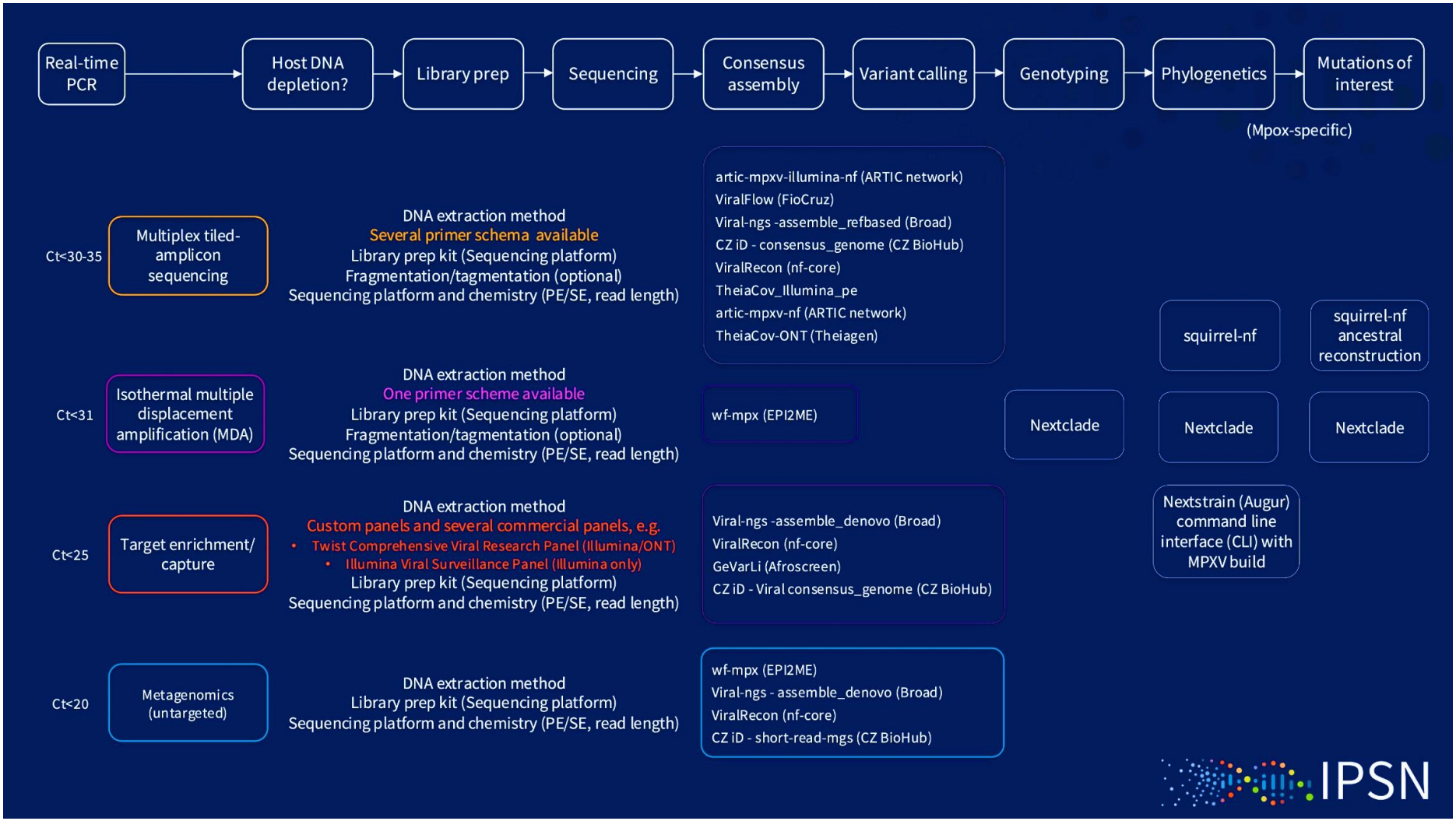


Figure 32 *: Approches et stratégies dans le séquençage du génome entier du MPXV*
mis à disposition de la communauté scientifique globale dans les efforts de riposte face à l'USSPI (https://github.com/WHO-Collaboratory/collaboratory-mpox-genomics-community/blob/main/img/landscape.jpg)

Tableau 11 : *Stratégies diagnostiques innovantes en développement adapté de (Arunagiri et al., 2024)*

Champ	Signification	Application	Description
LAMP (loop-mediated isothermal amplification)	amplification isotherme en boucle	Amplification rapide et simple des acides nucléiques pour le diagnostic	Permet une détection rapide de l'ADN du MPXV dans des lieux avec ressources limitées
Technologie CRISPR-Cas (clustered regularly interspaced short palindromic repeats-associated proteins)	Protéines associées à des répétitions palindromiques courtes régulièrement espacées en grappes	Capacités précises d'édition génomique et de diagnostic	Offre une détection précise de l'ADN du MPXV et le potentiel de thérapies ciblées
RPA (Recombinase Polymerase Amplification)	Amplification par polymérase Recombinase	Amplification isotherme en conditions de terrain, fonctionnant à 37-42°C	Permet une détection rapide et spécifique de l'ADN viral dans les zones reculées sans avoir besoin d'équipement lourd ou complexe
GeneXpert system		Plateforme de diagnostic point-of-care (POC) pour des résultats rapides	Automate tout en un, avec extraction intégrée dans une cartouche, facilite la détection rapide et fiable de l'ADN, améliorant ainsi le diagnostic sur le terrain
AI (Artificial intelligence)	Intelligence artificielle	Reconnaissance et analyse automatisées des images	L'IA aide au diagnostic du mpox grâce à l'analyse automatisée des images, ce qui permet aux professionnels de la santé de bénéficier d'évaluations précises, à construire au fil du temps et de l'alimentation des bases de données
MASTR Pouch (Mpox at-home Self-Test and point-of-care)	Autotest Mpox à domicile et point-of-care (POC)	Autotest et analyse rapide des particules virales	Intègre RPA et CRISPR pour une auto-évaluation rapide des particules virales du mpox, améliorant ainsi les efforts de détection à l'échelle mondiale
Dot immunoassay		Test sensible, rapide, simple et peu coûteux	L'immunodosage dot détecte l'orthopoxvirus dans les échantillons bruts et cliniques en 35 minutes, ce qui est adapté à la recherche sur le protocole de biocontrôle BSL 3 et efficace dans diverses applications de biosécurité

En conclusion, retenons sur cette section cruciale du diagnostic biologique que l'isolement du virus (par la culture du virus sur une lignée cellulaire ou dans l'œuf embryonné) et la caractérisation par les différentes techniques de PCR sont actuellement les méthodes les plus précises pour l'identification des *Orthopoxvirus*. PCR et le séquençage de l'ADN viral sont plus sensibles et plus spécifiques que les autres méthodes virologiques et immunologiques conventionnelles. Avec les 2 déclarations d'USPPI, des tests de détection d'*Orthopoxvirus* par PCR en temps réel ont été mis en place ces dernières années (Chauhan et al., 2023) en plus de ceux existant.

Pendant la phase active, la confirmation biologique peut se faire par analyse PCR du liquide des vésicules ou croûtes. Au cours de la phase de convalescence, le sérum peut être prélevé pour détecter les antigènes solubles de mpox ou les immunoglobulines M spécifiques du virus. La mise en évidence d'anticorps antipoxvirus chez un patient non vacciné avec une histoire de maladie grave et une éruption cutanée peut suggérer un diagnostic de l'infection mpox (Weinstein et al., 2005).

Quelques exemples de tests développés sont montrés dans le ***Tableau 12***.

Tableau 12 *: Exemples de tests moléculaires publiés utilisé pour la détection MPXV avec spectre de virus ciblés (ou des* Orthopoxvirus*)(Zhou & Chen, 2023)*

Technique	Virus	Gène cible	sequence d'amorces	sequence de sonde	Seuil de détection	Hôte	Equipement
PCR **(Ropp et al., 1995)**	OPV	HA gene	Amorce sens : CTGATAATGTAGAAGAC Amorce anti-sens : TTGTATTTACGTGGGTG	Non décrit	Non décrit	Homme	Modèle 9600 thermocyleur
PCR (Neubauer et al., 1998)	MPXV	ATI	Amorce sens : GAGAGAATCTCTTGATAT Amorce anti-sens : ATTCTAGATTGTAATC	Non décrit	Non décrit	Rongeur	GeneAmp® Système PCR 9600
PCR en temps réel **(Y. Li et al., 2010)**	MPXV Clade I	C3L	Amorce sens : TGTCTACCTGGATACAGAAAGCAA Amorce anti-sens : GGCATCTCCGTTTAATACATTGAT	FAM-CCCATATATGCTAAATGTACCGGTACCGGA-BHQ1	9.46 fg (~40.4 genomes)	Homme	Ouvert sur toutes les platformes
	MPXV	G2R	Amorce sens : GGAAAATGTAAAGACAACGAATACAG Amorce anti-sens: GCTATCACATAATCTGG AAGCGTA	FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-BHQ1	0.7 fg (~3.5 genomes)	Homme	
	MPXV Clade IIa	G2R	Amorce sens : CACACCGTCTCTTCCACAGA Amorce anti-sens : GATACAGGTTAATTTCCACATCG	FAM-AACCCGTCGTAACCAGCAATACATTT-BHQ1	1.7 fg (~8.2 genomes)	Homme	
	MPXVs	F3L	Amorce sens : CTCATTGATTTTTCGCGGGATA	6FAM-CATCAGAATCTG		Rongeur	

Technique	Virus	Gène cible	sequence d'amorces	sequence de sonde	Seuil de détection	Hôte	Equipement
PCR en temps réel (Kulesh et al., 2004)			Amorce anti-sens : GACGATACTCCTCCTCGTTGGT	TAGGCCGT-MGBNFQ	11–55 fg (50–250 copies de chaque gène)		Système LightCycler®
		N3R	Amorce sens : AACAACCGTCCTACAATTAAACAACA Amorce anti-sens: CGCTATCGAACCATTTTTGTAGTCT	FAM-TATAACGGCGAAGAATATACT-MGBNFQ			
PCR en temps rée (Y. Li et al., 2006)l	OPV de l'ancien monde non varioliques (exclu VARV et OPV du nouveau monde))	E9L-NVAR (gène non conservé)	Amorce sens : TCAACTGAAAAGGCCATCTATGA Amorce anti-sens: GAGTATAGAGCACTATTTCTAAATCCCA	TET-CCATGCAATATACGTACAAGATAGTAGCCAAC-QSY7	2.54 fg viral DNA (~12.5 genomes)	Homme	ABI7700® LightCycler® iCycler iQ™
	MPXV	B6R	Amorce sens : ATTGGTCATTATTTTTGTCACAGGAACA Amorce anti-sens: AATGGCGTTGACAATTATGGGTG	MGB/DarkQuencher-AGAGATTAGAAATA-FAM	10 copies virales (2 fg)		ABI7700® iCycler iQ™
PCR en temps réel (S. N. Shchelkunov et al., 2011)	MPXV	B7R	Amorce sens : ACGTGTTAAACAATGGGTGATG Amorce anti-sens : AACATTTCCATGAATCGTAGTCC	TAMRA-TGAATGAATGCGATACTGTATGTGTGGG-BHQ2	20 copies/réaction	Homme	Système PCR en temps réel 7500

Technique	Virus	Gène cible	sequence d'amorces	sequence de sonde	Seuil de détection	Hôte	Equipement
PCR en temps réel **(Maksyutov et al., 2016)**	MPXV	F3L	Amorce sens : CATCTATTATAGCATCAGCATCAGA Amorce anti-sens : GATACTCCTCCTCGTTGGTCTAC	JOE-TGTAGGCCGTGTATCAGCATCCATT-BHQ1	20 copies/réaction	Rongeur	Système PCR en temps réel 7500
PCR en temps réel (Edghill-Smith et al., 2005)	MPXV	J7R (gène hémagglutinin)	Amorce sens : GATGATGCAACTCTATCATGTA Amorce anti-sens : GTATAATTATCAAAATACAAGACGTC	FAMAGTGCTTGGTATAAGGAGMGBNFQ	50 copies/assay (10 fg)	Rhesus macaque	non décrit
GeneXpert **(D. Li et al., 2017)**	MPXV	G2R	Amorce sens: GGAAAA TGTAAAGACAACGAATACAG Amorce anti-sens: GCTATCACATAATCTGG AAGCGTA	FAM-AAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGTGTCC-BHQ1	12.5 genome copies (2.56 fg)	Homme	Plate-forme GeneXpert
LAMP (Iizuka et al., 2009)	MPXV Clade I	D14L	FIP:TGGGAGCATTGTAACTTATAGTTGCCCTCCTGAACACATGACA F3: TGGGTGGATTGGACCATT BIP:ATCCTCGTATCCGTTATGTCTTCCCACCTATTTGCGAATCTGTT B3: ATGGTATGGAATCCTGAGG Loop-F: GATATTCGTTGATTGGTAACTCTGG Loop-B: GTTGGATATAGATGGAGGTGATTGG	Non décrit	$10^{2.4}$ copies/ réaction	In vitro (cellules Vero et HeLa)	Loopamp® DNA Amplification Kit

Technique	Virus	Gène cible	sequence d'amorces	sequence de sonde	Seuil de détection	Hôte	Equipement
	MPXV Clade IIa	ATI	FIP:CCGTTACCGTTTTTACAATCGTTAATCAATGCTGATATGGAAAAGAGA F3: TACAGTTGAACGACTGCG BIP:ATAGGCTAAAGACTAGAATCAGGGATTCTGATTCATCCTTTGAGAAG B3: AGTTCAGTTTTATATGCCGAAT Loop-F: GATGTCTATCAAGATCCATGATTCT Loop-B: TCTTGAACGATCGCTAGAGA	Non décrit	10^3 copies/réaction		
	MPXV	ATI	FIP:TGGAGTCTGCTAATCTCTGTAAGATTAGAGAACTAGAGAATAAGTTGACC F3: CACAAGAAGTTGATGCACTG BIP:TGAGTGAATGCCGTGGAAATGCGCAGTCGTTCAACTGTA B3: CAGCATTGATTTCATTATTACGT Loop-F: CGCTCTCGATGCAGTC Loop-B: CAGAGATTACAATCTAGAATCTCAG	Non décrit	10^2 copies/réaction		
RPA (Davi et al., 2019)	MPXV	G2R	Amorce sens : AATAAACGGAAGAGATATAGCACCACATGCAC Amorce anti-sens : GTGAGATGTAAAGGTATCCGAACCACACG	ACAGAAGCCGTAATCTATGTTGTCTATCGQTFCCTCCGGGAACTTA	16 molécules d'ADN/µL	Homme	ESEQuant

2.9. Prise en charge

2.9.1. Mesures prophylactiques

a. Mise en quarantaine

Etant donné le fort potentiel épidémique du mpox, l'isolement des cas suspects ou patients est de règle. Les recommandations de prévention et contrôle de l'infection du CDC suggèrent qu'un patient suspecté ou confirmé du mpox doit être placé dans une chambre individuelle avec une salle de bain dédiée. Le transport et le déplacement du patient à l'extérieur de la pièce doivent être limités à des fins médicalement essentielles. L'intubation, l'extubation et toute procédure susceptible de propager des sécrétions buccales doivent être effectuées dans une chambre d'isolement pour les infections à transmission aérienne (CDC, 2024c). Dans les structures sanitaires, les patients doivent maintenir les précautions d'isolement recommandées pour le mpox jusqu'à ce que le diagnostic soit exclue. En cas de confirmation biologique, les précautions d'isolement recommandées pour le mpox sont maintenues jusqu'à ce qu'une nouvelle couche de peau saine se soit formée en dessous de croûtes découlant de toutes les lésions.

En règle, les cas suspects contacts de cas confirmés sont surveillés pendant la période de 21 jours. Les patients doivent : être placés en isolement empirique pendant 5 jours après l'apparition de tout nouveau symptôme, même si cette période de 5 jours se prolonge au-delà de la période de surveillance initiale de 21 jours.

Si le mpox est exclu ou si 5 jours se sont écoulés sans l'apparition d'un nouveau symptôme et qu'un examen approfondi de la peau et de la bouche ne révèle aucune nouvelle éruption ou lésion, les précautions d'isolement contre le mpox peuvent être interrompues. Si un nouveau symptôme apparaît à tout moment au cours de la période de surveillance de 21 jours, le patient doit à nouveau être soumis à des précautions d'isolement empiriques contre le mpox et une nouvelle période d'isolement de 5 jours doit être entamée.

b. Vaccination

Certaines preuves suggèrent que les vaccins contre la variole peuvent également offrir une protection croisée contre le mpox. D'ailleurs, l'enquête autour du premier cas humain de mpox diagnostiqué, a montré que le nourrisson atteint était le seul de la famille à ne pas avoir été vacciné contre la variole (Ladnyj et al., 1972).

Les vaccins activent une cascade de mécanismes cellulaires et de biomarqueurs qui entraînent l'élimination des cellules infectées par les lymphocytes T cytotoxiques, qui sont activés par les anticorps sécrétés par les lymphocytes B. La majorité de la population mondiale actuelle n'est pas vaccinée contre la variole, du fait de son éradication. Par conséquent, la susceptibilité aux orthopoxviroses n'a fait que croître avec le temps. La similarité du patrimoine génétique et antigénique entre orthopoxvirus, suggère une protection croisée induite par un vaccin ciblant efficacement l'un d'eux, ainsi il a été rapporté que la vaccination antivariolique conferait près de 85% de protection croisée contre le mpox(H. Li et al., 2023). Outre la vaccination avant l'exposition, elle peut également s'envisager dans le cadre d'une prophylaxie post-exposition (PPE) après une exposition à haut risque, idéalement 4 jours ou moins après l'exposition. Ceci se base sur le fait qu'il faut 4 jours au virus de la vaccine pour atteindre les tissus lymphatiques (contre 6 jours pour la variole) et ainsi prévenir une infection symptomatique, mais la PPE peut être administrée jusqu'à 14 jours après l'exposition en l'absence persistante de symptômes pour prévenir une maladie plus sévère(Pischel et al., 2024).

Trois générations de de vaccins ont été développé à ce jour (*Traité de virologie médicale*, 2019) :

- La première génération est faite des vaccins antivarioliques utilisés pour l'éradication du VARV, utilisant un VACV vivant, réplicatif. Quatre sur les 19 inventoriées sont principalement utilisées, à savoir la souche Lister (VAC-Lis), la souche NYCBH (New - York City Board of Health), la souche Temple of Heaven (Tian tan) et la souche EM-63 (dérivée de la NYCBH) ;
- La deuxième génération des vaccins produits par culture cellulaire a permis de résoudre le problème de qualité que posait la 1ère génération
- La troisème génération visant à atténuer ou éliminer les problèmes posés par les complications post-vaccinales et contre-indications des 2 groupes précédents.

Ces derniers vaccins ont été mobilisés pour protéger contre le mpox lors de l'épidémie mondiale de mpox qui a débuté en 2022. Trois vaccins ont été homologués pour la mpox : le vaccin modifié Ankara-BN (par ex, MVA-BN ou JYNNEOS, Imvamune ou Imvanex) à 2 doses hautement atténué et déficient sur le plan de la réplication, approuvé aux États-Unis, au Canada et dans l'Union européenne ; LC16-KMB (homologué au Japon) et OrthopoxVac (homologué dans la Fédération de Russie) (Duarte et al., 2024; Karagoz et al., 2023; Pischel et al., 2024). Un vaccin de deuxième génération, l'ACAM2000, a été homologué par la Food and Drug Administration (FDA) des États-Unis pour la protection contre la variole et confèrerait également une immunité croisée contre la variole et le mpox (Duarte et al., 2024; Pischel et al., 2024).

La force des mesures prophylactiques tient en un système de santé renforcé et une communauté engagée.

2.9.2. Thérapies disponibles

En instaurant les mesures de prise en charge, la recherche systématique d'autres Infections sexuelles transmissibles est la règle (VIH, VHB, syphilis, Chlamydia, gonocoque). Le traitement est principalement symptomatique avec l'usage d'antipyrétiques, d'analgésiques et d'antiseptiques cutanés (Greffe et al., 2023). L'administration des antalgiques adaptés au degré de la douleur est préférée aux antiinflammatoires proscrits ; le nettoyage et désinfection des plaies et des muqueuses doit être systématique pour prévenir des complications liées aux surinfections bactériennes. Au cas où elles surviendraient, les surinfections bactériennes devront être traitées sans différer. Le maintien d'une hydratation et nutrition optimale tenant compte de l'atteinte de la sphère oropharyngée gênant parfois l'utilisation de la voie orale garantit un bon pronostic.

Les traitements antiviraux sont recommandés en cas de formes sévères et des études sont en cours afin de définir la meilleure stratégie. Les molécules utilisables approuvées sont le técovirimat, le cidofovir, le brincidofovir et l'immunoglobuline de la vaccine, et leurs mécanismes d'action sont illustrés sur la ***Figure 33*** : Sites d'actions des thérapies antivirales dans le cycle de réplication des orthopoxvirus (image obtenue par courtoisie auprès de Lebeni Liège).

Le tecovirimat, également connu comme TPOXX, ST-246 ®, traitement utilisable par voie orale ou intraveineuse, a été approuvé en 2018 dans le traitement de la mpox et possède une forte activité contre les Orthopox virus (variole, mpox, cowpox). En 2022, le tecovorimat a été approuvé en Europe pour le traitement des cas de Mpox. Il semble diminuer la durée d'évolution de la maladie et semble bien tolérée. Cependant, l'essai clinique en RDC dans les provinces de Sankuru et de Maniema a montré que le técovirimat n'a pas réduit la durée des lésions de la mpox chez les enfants et les adultes atteints de mpox de clade I en République démocratique du Congo (RDC), d'après une première analyse des données d'un essai randomisé contrôlé par placebo.

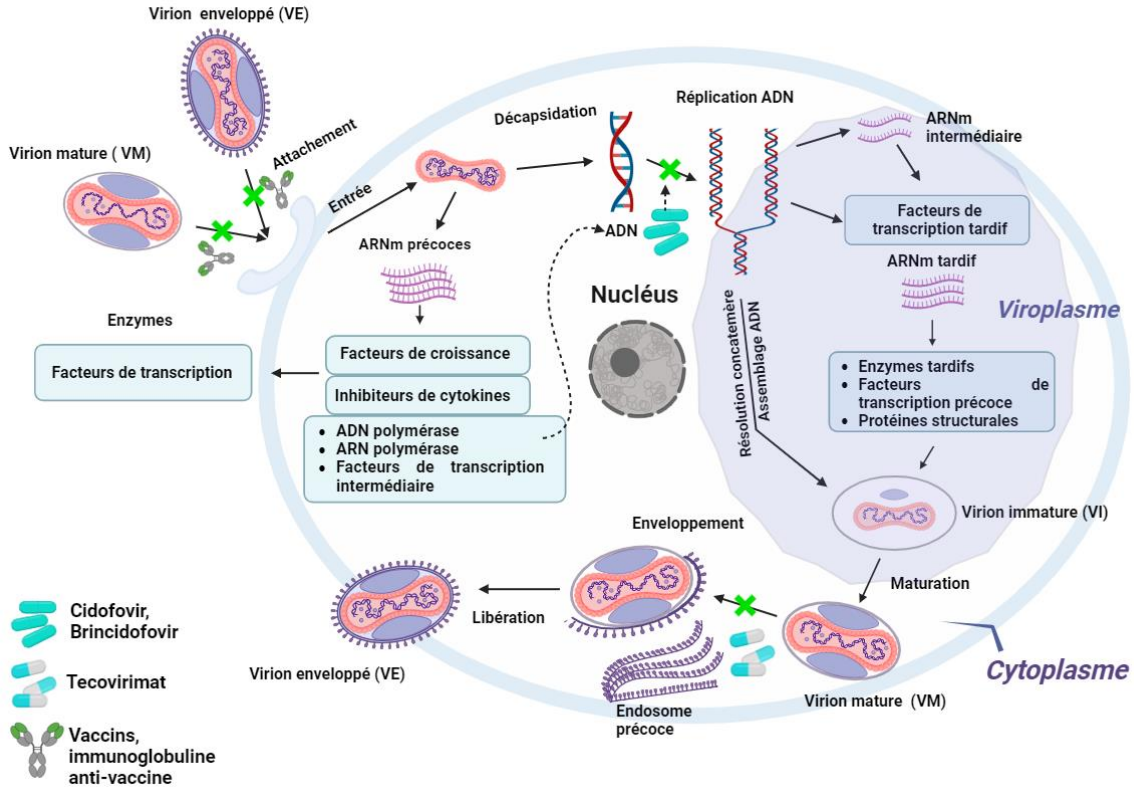


Figure 33 *: Sites d'actions des thérapies antivirales dans le cycle de réplication des orthopoxvirus (image obtenue par courtoisie auprès de Lebeni Liège)*

Toutefois, le taux de mortalité global de 1,7 % parmi les participants à l'étude, qu'ils aient reçu le médicament ou non, était bien inférieur au taux de mortalité dû au mpox, qui est de 3,6 % ou plus, rapporté pour tous les cas en RDC. Cela montre qu'il est possible d'obtenir de meilleurs résultats chez les personnes atteintes de mpox lorsqu'elles sont hospitalisées et qu'elles reçoivent des soins de soutien de haute qualité. En plus, l'identification des résistances chez des personnes n'ayant d'antécédents d'un traitement antérieur au tecovirimat sur plusieurs mois dans cinq États aux USA,.impose un renforcement de la surveillance génomique du fait de l'association avec une combinaison de mutations sur le gène F13, à savoir une délétion de l'asparagine 267 (N267del) et une substitution de l'alanine-184 en thréonine (A184T) (Gigante et al., 2024).

Le cidofovir, commercialisé sous le nom de Vistide, approuvé depuis 2012 pour le traitement des infections à cytomégalovirus et des rétinites chez les personnes vivant avec HIV, peut être utilisé dans les formes très sévères de mpox chez qui la voie orale ne peut être utilisée. Bien que le cidofovir soit néphrotoxique, il reste très prometteur. Il s'agit d'un antiviral à large spectre avec une action avérée contre plusieurs virus à ADN, y compris MPXV qui a donné des résultats encourageants dans les modèles expérimentaux réalisés avec les animaux de laboratoire (Duarte et al., 2024; Rizk et al., 2022).

Le brincidofovir, prodrogue du cidofovir, aussi connu sous le nom de CMX001 ou Tembexa, utilisable per os, a été approuvé en 2021 par la FDA pour le traitement de la variole, a montré une efficacité dans les cas de Mpox chez l'animal. Des effets secondaires digestifs et une élévation des transaminases rendent son utilisation en masse, en zones endémoépidémiques conditionnée par des développements de stratégies (Patel et al., 2023; Rizk et al., 2022).

L'efficacité de **l'immunoglobuline de la vaccine**, autrefois utilisée pour traiter la variole, n'a pas encore été prouvée pour soigner les patients mpox. Toutefois, l'immunoglobuline pourrait être utilisée comme traitement prophylactique pour les personnes exposées avec une immunodéficience sévère chez lesquelles la vaccination antivariolique serait proscrite (Rizk et al., 2022).

Les cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de l'infection à Mpox comprennent la Thymidylate Kinase, l'ADN ligase, le complèxe trimère protéique (D13L), la protéine majeure de l'enveloppe (F13L, cible du técovirimat) et la cystéine protéinase (I7L) (Patel et al., 2023).

Travaux de thèse

Travaux de thèse

Contexte, justification et Objectifs

Partie I : Séroprévalence et Caractérisation moléculaire du mpox en RDC

1. Utilisation de la sérologie mpox dans les investigations de cas et d'épidémies de mpox
2. Cas de mpox clade I, associés à des contacts sexuels dans la province de Kwango, République démocratique du Congo
3. Co-circulation du mpox et du swinepox dans la province de Tshuapa
4. Transmission présumée de 2 variants distincts du MPXV de la République centrafricaine à la République démocratique du Congo
5. Épidémie humaine soutenue d'une nouvelle lignée du MPXV – clade I dans l'Est de la République démocratique du Congo
6. Premiers cas importés de MPXV-Clade Ib à Goma, en République démocratique du Congo : implications pour la surveillance mondiale et la dynamique de transmission
7. Co-circulation des sous-clades Ia et Ib du MPXV dans la ville province de Kinshasa, République démocratique du Congo, de juillet à août 2024
8. Caractérisation moléculaire du Monkeypoxvirus en RDC de 2018 à 2024

Partie II : Caractériser les récentes émergences zoonotiques de la MVE en Equateur

1. 2020 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterisations

Contexte, justification et objectifs de thèse

1. Contexte et justification

a. Situation géographique et démographique

La RDC est le plus grand pays en étendue en Afrique Centrale, et se situe de part et d'autre de l'Équateur, entre la 5° latitude nord et 13° latitude sud. Elle partage ses frontières terrestres et maritimes sur 9 145 km avec neuf pays dont la République Centrafricaine et le Sud-Soudan au Nord, l'Ouganda, le Rwanda, le Burundi et la Tanzanie à l'Est, la Zambie et une partie de l'Angola au Sud ainsi que la République du Congo et l'Angola à l'Ouest (***Figure 34***). Avec 2 345 409 km², la RDC est le deuxième pays d'Afrique après l'Algérie par la superficie, et 4ème par la démographie après le Nigéria, l'Egypte et l'Ethiopie avec une population estimée en 2023 à environ 102 million d' habitants (*https://donnees.banquemondiale.org/indicator/SP.POP.TOTL?contextual=region&locations=CD*), 122 millions habitants en 2024 et elle pourrait atteindre plus de 185 millions habitants en 2033. Les moins de 15 ans représentent 48%, les 15-59 ans représentent 48% et le reste est constitué par les plus 60 ans (source : annuaire statistique INS 2020). Le secteur informel représente 90% d'emplois occupés sur un total de près de 27.3 millions d'emplois. Le dernier recensement scientifique de 1984 relevait que près de 40 % de la population vivrait en milieu urbain dont cependant, cette proportion est probablement sous-estimée suite aux nombreux déplacements des populations consécutifs aux multiples conflits armés de ces dernières années.

Sur le plan administratif, suite à la dernière réforme constitutionnelle instituant la 3ème République, la RDC est passée de 11 en 26 provinces, dont la capitale Kinshasa faisant office de ville – province. Ces provinces sont : Bas-Uélé, Equateur, Haut-Lomami, Haut-Katanga, Haut-Uélé, Ituri, Kasaï, Kasaï Central, Kasaï Oriental, Kongo Central, Kwango, Kwilu, Lomami, Lualaba, Maï-Ndombe, Maniema, Mongala, Nord-Kivu, Nord-Ubangi, Sankuru, Sud-Kivu, Sud-

Ubangi, Tanganyika, Tshopo, Tshuapa et Kinshasa. Avant, la RDC comptait 10 provinces et la capitale et toutes les provinces ont été démembrées sauf les 3 Kivus (Nord-Kivu, Sud-Kivu et Maniema) et le Kongo -Central (Bas-Congo) (***Figure 34***).

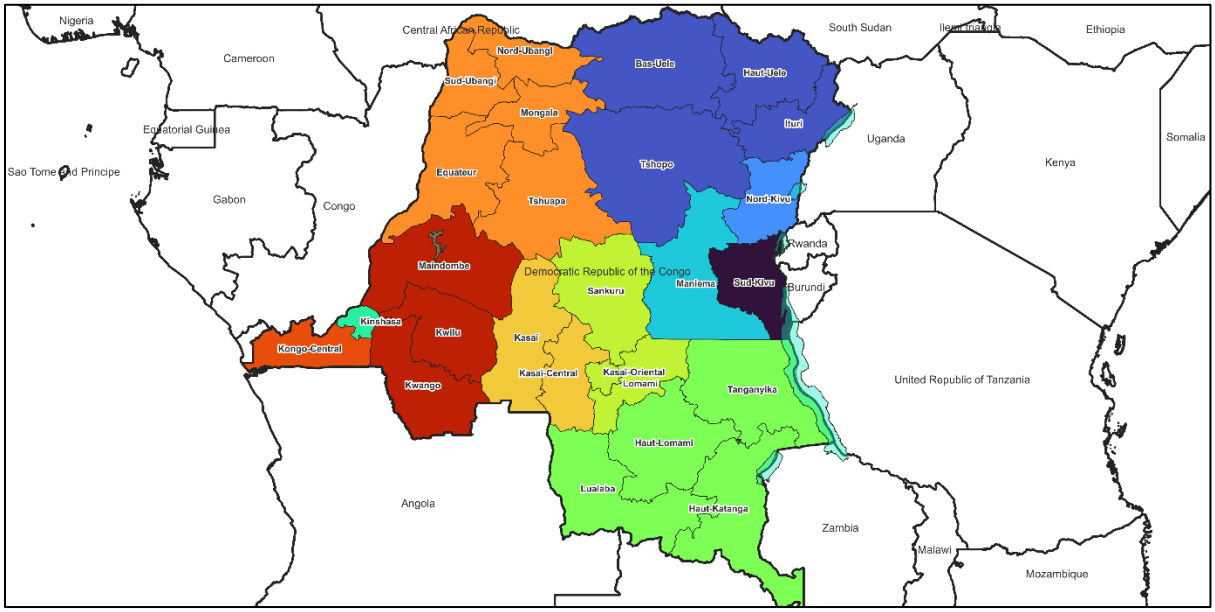


Figure 34 *: Carte administrative de 26 provinces de la RDC avec les pays limitrophes.*

Les provinces sont colorées selon les anciennes configurations avec 11 provinces, seules les 3 provinces du Kivu anciennement démenbrées en Nord-Kivu, Maniema et Sud-Kivu, n'ont pas été concernées par le démembrement qu'a connu toutes les autres provinces, faisant que la RDC est passée de 11 à 26 provinces. créée avec QGIS 3.22.11.

Le relief est très varié avec une partie centrale occupée par la cuvette centrale (48 % de la superficie du territoire national) dont l'altitude moyenne est de 350 m. A l'Est, nous notons la présence des montagnes, dont le Ruwenzori, 3ème versant montagneux en Afrique culminant à plus de 5 109 mètres d'altitude. En ce qui concerne la végétation, les forêts recouvrent près de 155.5 millions ha dont 99 millions ha de forêts denses humides au Nord représentant 48% de la superficie du pays. A l'Est du pays, borde le Grand – Rift de l'Afrique et on y trouve des montagnes, des collines, des grands lacs puis les volcans. Le réseau hydrographique de la RDC, 2ème au monde après l'Amazonie, repose sur le bassin du fleuve Congo qui, long de 4 374 km, traverse le pays d'Est en Ouest dans sa partie nord et, du nord au sud dans sa partie occidentale avant de se jeter dans l'océan Atlantique, avec plusieurs grandes rivières et de nombreux lacs. Quatre climats sont

rencontrés : un climat équatorial dans la cuvette centrale, un climat tropical humide au Nord et au Sud, un climat tropical tempéré d'altitude à l'Est et un climat de type montagnard dans l'extrême Est. La RDC constitue donc un vaste espace mixant plusieurs écosystèmes constituant une biodiversité riche tant en espèces végétales, animales qu'en microorganismes.

b. Situation politique et économique

Selon l'annuaire statistique 2020 de l'INS, la RDC comprend 98 villes, 145 territoires, 474 secteurs, 263 chefferies, 137 communes urbaines, 174 communes rurales et 5 908 groupements. La RDC est un paradoxe géologique avec d'énormes potentialités minières, agricoles, et énergétiques, contrastant avec la situation précaire de la population congolaise. En zones rurales, la pauvreté se juxtapose à la dégradation et au manque d'entretien des infrastructures socio-économiques (voies de communication en particulier) et est exacerbée par les multiples et récurrents conflits armés depuis près de 3 décennies. Ceci augmente la vulnérabilité de la majorité de la population de l'intérieur du pays vivant essentiellement de l'agriculture et de la chasse pour subvenir aux besoins familiaux et forcés à l'exode rural.

Avec les élections libres et démocratiques de 2006 (date des premières élections libres de la 3ème République), une accalmie a été observée malgré des poches de conflits principalement dans la Région des Grands Lacs (Ituri, Nord et Sud-Kivu, localités frontalières du Rwanda, du Burundi et de l'Ouganda). Actuellement sévit une crise avec le mouvement M23, et la somme de toutes ces crises plongent les populations déjà vulnérables dans une crise humanitaire sans précédent qui s'érige en boulevard pour les maladies infectieuses et épidémies. Selon l'aperçu des besoins humanitaires 2024, plus de 6.7 millions de personnes déplacées internes dont deux millions de femmes enceintes et femmes allaitantes (FEFA), sont dans le besoin d'assistance humanitaire. Les provinces les plus affectées sont celles concernées par les conflits armés.

c. Fonctionnement du système sanitaire

Sur le plan sanitaire, La RDC a adhéré depuis 1981 à la politique des soins de santé primaires de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). Le système sanitaire national est structuré comme une pyramide avec trois niveaux : le niveau central, le niveau intermédiaire ou provincial et le niveau périphérique. Le niveau central joue le rôle normatif, il édicte les politiques, les stratégies, les normes et les directives. Il est composé du Cabinet du Ministre, du Secrétariat général avec 6 directions (découlant des 13 directions anciennes) et 52 programmes spécialisés et des hôpitaux nationaux. Le niveau intermédiaire ou provincial assure l'appui technique au développement des ZS. Il réalise aussi le suivi et la mise en œuvre des directives et politiques au niveau de ces institutions sanitaires. Il est formé de 26 divisions provinciales de santé (DPS). Le niveau périphérique correspond au niveau opérationnel de la mise en œuvre de la politique des soins de santé primaires. Il est constitué de 519 zones de santé (ZS) dont 516 officielles. A travers ces ZS, le pays dispose de 469 Hôpitaux Généraux de Référence (HGR) opérationnels et 9 138 centres de Santé (CS). Les CS apportent un Paquet Minimum d'Activités (PMA), composé des soins curatifs, préventifs, promotionnels et de réadaptation tandis que les HGR fournissent un Paquet Complémentaire d'Activités (PCA) en améliorant la qualité du PMA des CS.

Malgré de multiples réformes en cours, et efforts de développements à travers des initiatives tel le plan de développement des 145 territoires ou la couverture sanitaire universelle, les défis sanitaires restent énormes surtout en termes de logistique, accessibilité à certaines régions reculées où l'accès aux soins et les infrastructures sanitaires sont limités. Là encore, le terrain est propice pour l'émergence et la propagation des maladies à potentiel épidémique, pouvant rapidement représenter un risque global.

d. RDC : Terre des émergences, cas de la maladie à virus Ebola (MVE) et du mpox

Depuis environ 50 ans, le monde livre avec la RDC une course et bataille contre les zoonoses. La MVE et le mpox constituent des réussites émergentielles car les agents causaux ont pu traverser les étapes de l'émergence d'une zoonose en allant du réservoir toujours, puis des contacts avec l'homme pouvant conduire à la première infection, en passant par des épidémies limitées avant de s'étendre. Dans cette lutte, la RDC est restée en première ligne de front avec des alternances de sollicitudes et de solidarité internationale.

Tout part de l'année 1970, notamment avec l'identification du premier cas humain de mpox (anciennement variole simienne) en 1970 à Basankusu (Ladnyj et al., 1972; Ziegler and Kima, 1972). Vers la fin de la même décennie, alors que la RDC recevait la certification de l'éradication de la variole, éclate la première épidémie de MVE à Yambuku (World Health Organization, 1978), toujours dans l'ancienne province de l'Equateur (actuellement province de la Mongala, ancien district de la Province d'Equateur, avant le démenbrement en 2006). A 2 reprises, la négligence de ces émergences a rattrapé la communauté internationale, tel que le démontre l'épidémiologie et différentes alertes des scientifiques.

Le mpox est passé rapidement au statut de maladie négligée à la suite du rapport du groupe d'experts qui suivit les premières grandes campagnes de surveillance de 1980-1986(Jezek et al., 1988). Ce rapport stipulait : « *il y a aucun signe d'augmentation du taux d'atteinte secondaire entre les périodes 1970-1980 et 1981-1986. L'inefficacité de la propagation de personne à personne, même dans des conditions d'exposition maximale, confirme l'hypothèse selon laquelle le virus de l'orthopoxvirose simienne est mal adaptée à une transmission interhumaine continue et que ce mode de transmission ne constitue pas un problème important*. » Cependant, 10 ans après cette conclusion, reapparaît une grande épidémie affectant 54 villages à Katako-Kombe, dans la

province de Sankuru avec près de 762 cas. Le mpox intégrera la liste des maladies à déclaration obligatoire et cette tendance est allée crescendo en RDC. Les provinces recouvertes par la forêt équatoriale sont déclarées endémiques et prioritaires quoique dénuées de ressources pour mener une surveillance à l'échelle du pays. En parallèle, le clade II s'est exporté en 2003 aux Etats-Unis et a causé des grandes épidémies qui se sont exportées en zone urbaine au Nigéria en 2017. Les événements de voyage qui ont suivi la plus grande épidémie au Nigeria de 2017 à 2019 ont permis au virus de se déplacer vers les villes urbaines et de se propager hors du pays, suivis d'une propagation mondiale en 2022 du clade IIb (Bunge et al., 2022 ; Hadfield et coll., 2018 ; Sagulenko et al., 2018). Il s'agira de l'alerte qui fera connaître le mpox à la communauté scientifique et qui aura touché 109 pays non endémiques avec plus de 90 000 cas dans le monde (CDC, 2022 ; OMS, Genève, 2022). Ainsi sera déclarée l'urgence de santé publique de portée internationale le 27 juillet 2022 au pic de l'épidémie. En général, on a supposé que chaque épidémie de mpox en Afrique était le résultat d'une transmission zoonotique à partir d'un réservoir animal suivie d'une transmission interhumaine limitée par contact étroit. La grande épidémie mondiale de mpox en 2022 a montré que la maladie peut être transmise sexuellement, que les cas pauci- et asymptomatiques ne sont pas rares, et que l'adaptation virale s'est produite pour conduire à des transmissions interhumaines efficaces. En RDC, il sera observé une augmentation de la répartition de l'aire géographique avant atteinte de nouvelles zones de santé qui ne notifiaient pas régulièrement la maladie. Il est important de noter que des observations récentes montrent que l'épidémiologie de mpox est également en train de changer en RDC. En 2023, plus de 14 000 cas suspects de mpox ont été signalés dans 156 des 516 zones de santé, dans 22 des 26 provinces, avec des cas confirmés par PCR dans 17 provinces. Le taux de létalité est estimé à 4,6 %. Le nombre de cas suspects a doublé ces dernières années, soit environ 3 000 cas en 2021, 5 600 en 2022 et >

14 000 en 2023 (OMS, 2024b). Déjà 11 166 cas suspects ont été signalés en juin 2024 (27ème semaine épidémiologique) (SGI-mpox, 2024). La situation épidémiologique globale a poussé l'Agence africaine Africa CDC à déclarer l'Urgence de santé publique de sécurité continentale le 13 août 2024 et l'OMS pour la fois deuxième urgence de santé publique de portée internationale (USPPI), le 14 août 2024. Au moment de ces 2 déclarations consécutives, 17 541 cas de mpox parmi lesquels 517 décès, avaient été reportés dans 12 pays africains en 2024, dont 1 en Afrique australe (Afrique du Sud), 3 Afrique de l'Est (Kenya, Rwanda, Ouganda), 5 en Afrique centrale (RDC, Burundi, RCA, République du Congo, Cameroun) et 3 en Afrique de l'Ouest (Nigéria, Côte d'Ivoire, Libéria). Ils s'en sont suivies des premières exportations documentées du clade I en Suède et en Thaïllande, en dehors de l'Afrique. Cette situation représentait un accroissement de 160% comparativement à l'année 2023, et la RDC est le pays qui a le plus de cas reportés à ce jour avec 96% des cas et 97% des décès(Africa CDC, 2024).

De même, la MVE n'a attiré l'attention qu'à l'issue de la grande épidémie de l'Afrique de l'Ouest malgré que la RDC qui en avait une contemporraine, avait déjà connu 5 épisodes épidémiques, et allait en connaître 9 autres dans les années qui allaient suivre. En effet, nous avons observé une déruralisation des épidémies, les pathogènes suivant le cours des migrations des populations humaines. Par exemple, les épidémies survenues à Yambuku (1976), Luebo (2007), Mweka (2008), Boende (2014), Likati (2017) et Bikoro (2018), concernaient des zones d'accès difficile, car forestières et très reculées ; contrairement aux épidémies de Kikwit (1995), de l'Afrique de l'Ouest (2014-2016), qui a touché plus de 28 000 personnes dans trois pays différents, ou du Nord-Kivu (2018-2020) avec des exportations en Ouganda (WHO Ebolasitrep_2016 ; WHO, Ebola Virus Disease-Republic of Uganda, 13 June 2019). L'épidémie du Nord- Kivu a été la plus importante en RDC et a été à la base pour une seconde fois de la déclaration d'USPPI. En outre,

pendant que la Guinée connaissait une réémergence à partir d'un survivant 5 ans la dernière émergence, l'intervalle interépidémique s'est réduit significativement en RDC avec 7 épidémies se sont enchainés à l'Est et à l'Ouest de la RDC, entre 2018 et 2022, changeant indibutablement le paradigme de la maladie.

Les déclarations de ces USSPI ont été accompagnées de mobilisation de fonds qui ont permis une recherche plus poussée sur ces pathogènes (***Figure 35***). Ainsi, des vaccins ont été développés et des essais cliniques de potentiels thérapeutiques mis sur pied.

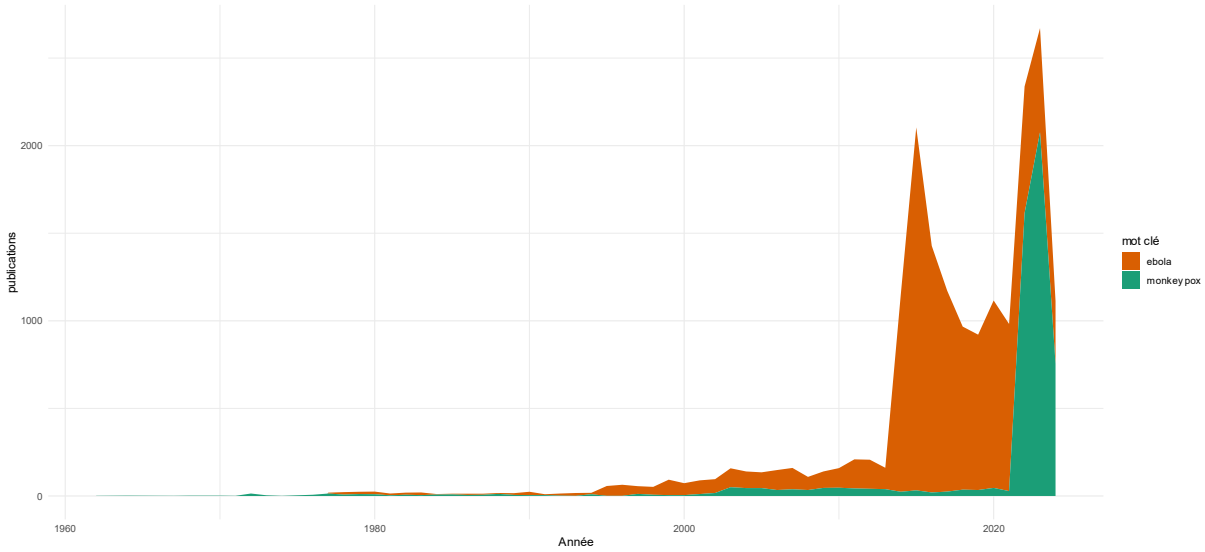


Figure 35 *: Graphique representant les nombres de publications sur pubmed mentionnant les mots cles « Monkeypoxvirus » Et « Ebola »*

Il ressort donc de ce qui précède que depuis 50 ans, la maladie à virus Ebola et le mpox causé par le clade I (différent de la forme causée par le clade II jamais détecté à ce jour en RDC), ont émergé en RDC. Le mpox évolue sous un mode endémo-épidémique et a une tendance sans cesse croissante alors que la MVE est responsable d'épidémies de plus en plus rapprochés. Les descriptions des épidémies passées démontrent que ces virus circulent dans des zones réculées avec ressources limitées, de plus en plus reliées aux grandes agglomérations urbaines. Et bien qu'il

y ait des avancées scientifiques considérables, bien de questions demeurent sur l'origine et la dynamique des épidémies : le réservoir animal demeure encore inconnu, la dynamique de ces maladies n'est toujours pas élucidée et les futures émergences difficiles à prédire. En outre, l'absence de moyens de détection dans les zones où émergent les épidémies nous rend aveugles quant à l'évolution de ces agents pathogènes. Ces maladies demeurent négligées aux lieux d'émergence avec un diagnostic précoce souvent inexistant (nécessité d'expédier les échantillons), une surveillance pauvre souvent perturbée par des crises régionales ; malgré qu'elles sont prioritaires à l'échelle globale à l'heure actuelle. Dans ce contexte, une évolution rapide de ces agents pathogènes peut rapidement conduire à des crises sanitaires mondiales qui se cumulent aux instabilités, menaçant la santé globale. Le contrôle de ces maladies implique donc la connaissance de la dynamique de transmission et de propagation par la surveillance de la circulation en RDC, un environnement proprice aux émergences.

L'immunité collective ou l'intégration des contre-mesures dans les épidémies passées pourrait également constituer des paramètres à inclure dans la compréhension de la cinétique des épidémies. En plus, nous avons pu observer que l'intensification des analyses génomiques à l'issue des différentes USPPI a occasionné une augmentation significative de connaissances débouchant sur un développement de contre-mesures efficientes. L'intégration de la génomique pourrait également permettre de mieux caractériser les virus et étudier leur transmission. En outre, les données issues de la génomique ne sont qu'un premier pallier qui va permettre non seulement la surveillance de l'émergence des variants d'intérêt de santé publique, mais aussi le développement des tests diagnostiques, des vaccins et molécules thérapeutiques. En plus, cet outil pourra permettre la surveillance de l'évolution de ces virus et l'evnetuelle émergences de résistances aux traitements au vaccins.

Durant les trois années de notre travail de thèse, la RDC a connu 2 épidémies successives de la maladie à virus Ebola et la dégradation de la situation épidémiologique du mpox avec explosion du nombre des cas, et exportation du clade I hors d'Afrique et la declaration USSPI en aout 2024.

2. Objectifs

Première partie : comprendre la circulation du mpox en RDC

Les objectifs spécifiques sont :

1. Développer un outil sérologique pour mieux évaluer la circulation du virus dans les zones endémiques et non endémiques
2. Caractériser moléculairement les souches de MPXV circulant en RDC afin de mieux comprendre la dynamique de l'épidémie de mpox

Deuxième partie : Caractériser les récentes émergences zoonotiques de la MVE en Equateur (RDC)

Les objectifs spécifiques sont :

1. Caractériser la 11ème épidémie de la MVE à l'Equateur
2. Évaluer l'apport de la génomique dans la compréhension de la transmission et de l'ensemble des épidémies

3. Contribution personnelle et impact global

3.1. Contribution dans les travaux de thèse

Depuis 2016, la RDC a fait face à plusieurs urgences avec, chaque année, au moins 2 grandes crises sanitaires. Ainsi, le pays a connu depuis 2017, 8 épidémies de MVE. A l'issu de la 9ème épidémie MVE, les activités de séquençage NGS sur la plate-forme Illumina ont été implémentées dans le pays sous l'impulsion du Professeur Muyembe. Nous avons été assistés par l'équipe de TRANSVIHMI, ARTIC et de l'USAMRIID pour l'installation du laboratoire de séquençage de nouvelle génération (NGS) à l'INRB avec les technologies MinION (séquençage par Nanopore) et Illumina (Miseq et Iseq).

Ayant fait partie l'équipe des scientifiques locaux, j'ai été, à travers ces initiatives, parmi les bénéficiaires de multiples formations de biologie moléculaire et d'initiation au séquençage sur les plateformes NGS Illumina et Nanopore. En plus, durant l'année 2019, la plate-forme Luminex pour les analyses sérologiques multiplex a également été implémentée avec l'assistance de l'équipe TRANSVIHMI et j'ai également été initié à l'utilisation du Magpix. Ces implémentations ont été très utiles : à titre d'exemple, elles ont permis la confirmation au pays et la caractérisation rapide des 11ème – 15ème épidémies MVE en RDC. J'ai ainsi contribué aux analyses de séquençage au laboratoire, à la génération des génomes consensus et à la maintenance de la plate-forme Nextstrain Ebola publique (https://nextstrain.org/community/inrb-drc/ebola-nord-kivu). J'ai implementé le séquençage sur le terrain pendant l'épidémie Ebola dans l'Est. Les travaux de recherche relatifs à la thèse, ont constitué une autre phase de formation à la suite du master en sciences. Ils ont été effectués à cheval entre la France (Montpellier) et la RDC (Kinshasa) sous la supervision de ma directrice de thèse, Dr Martine Peeters et de mon co-directeur de thèse, Professeur Steve Ahuka-Mundeke.

Les travaux de thèse sont donc partis de la 11ème épidémie, ayant sévi en Equateur en 2020. J'y ai contribué dans les analyses de séquençage sur la paillasse au laboratoire des échantillons reçus du terrain, les analyses bio-informatiques secondaires sur Illumina et Nanopore pour la génération des consensus, la vérification et la validation des données. J'ai également participé à la coordination de la rédaction, la correction du manuscrit ainsi qu'à l'obtention de l'approbation éthique pour la valorisation du travail.

Toujours à partir de 2020, le pays a connu plusieurs autres urgences sanitaires infectieuses dont le COVID- 19 et ensuite la croissance exponentielle des notifications de cas de mpox dans un contexte international d'USPPI, tel que mentionné dans le paragraphe de contexte. Les travaux portant sur mpox, ont ainsi pris une bonne partie de notre thèse étant donné la menace que représentait l'épidémie à l'échelle globale et l'insuffisance de connaissances sur mpox en général, et le clade I en particulier. J'ai contribué aux analyses de laboratoire, tant pour la sérologie Luminex sur le magpix que pour le séquençage NGS au laboratoire.

Les travaux sur la sérologie sont consécutifs à la conjonction du contexte et d'une hypothèse à vérifier. Le contexte était celui d'USPPI ayant mis l'unité TRANSVIHMI à finaliser le développement du test sérologique multiplex, débuté en 2019 mais mis en stand-by avec l'urgence de la pandémie COVID-19. J'ai contribué premièrement dans la validation du test sérologique en développement en réalisant une partie des analyses à Kinshasa. Une fois le test évalué, j'ai réalisé une analyse rétrospective pour lesquelles j'ai bénéficiée de l'appui des collègues du laboratoire des virus émergents, du Laboratoire National des orthopoxvirus et de la Biobanque à l'INRB à Kinshasa. J'ai également contribué dans la caractérisation de la souche isolée de l'échantillon du cas confirmé de Masimanimba, avec la validation des manipulations au laboratoire, l'analyse bio-informatique des résultats de séquençage en vue de générer les génomes consensus, le contrôle de qualité, l'alignement avec les séquences contextuelles publiquement disponibles, la

phylogénie par maximum de vraisemblance et la visualisation. Enfin, avec l'aide de mes encadrants, j'ai initié le draft original et contribué à la coordination de la rédaction du manuscrit, des analyses statistiques, la réalisation des cartes et de la soumission dans le journal.

A la suite de ce travail, une série d'investigation a été menée dans des provinces qui rapportaient une hausse du nombre de cas. Ainsi, j'ai contribué dans des missions d'investigations dans les provinces à travers l'initiation, le montage et la supervision de certaines investigations actives de cas en provinces (Kwango, Kwilu, Equateur, Maïndombe, Sud-Ubangi, Tshuapa, …) dans le cadre des projets AFROSCREEN et PANAFPOX sous l'impulsion donnée par les professeurs Placide Mbala et Steve Ahuka. Ces descentes se sont effectuées en synergie avec d'autres partenaires (UCLA, USDA, Africa CDC, IMT, OMS, PNLMFHV…) ou projets (DTRA, IMREC, …) en vue de couvrir de façon représentative le pays. Les travaux ayant résulté de la valorisation des données issues de certaines de ces investigations sont développés dans les chapitres 2 à 4 de la première partie portant sur mpox, et précèdent l'émergence de l'épidémie au clade Ib qui sera prise en compte dans les chapitres 5 à 8. De façon globale, j'ai contribué dans tous ces travaux avec la validation final des manipulations de séquençage au laboratoire, l'analyse bio-informatique des résultats de séquençage en vue de générer les génomes consensus et le contrôle de qualité. Pour l'investigation dans la Tshuapa (chapitre 3) et dans le Sud-Ubangi (chapitre 4), j'ai en plus contribué avec l'alignement des séquences d'intérêt avec les séquences contextuelles publiquement disponibles, la phylogénie par maximum de vraisemblance et la visualisation. J'ai aussi supervisé la soumission de ces génomes sur Gisaid.

En général, pour les chapitres 5 à 8, nous avons contribué à la validation et l'interprétation des analyses des données de séquençage que nous avions générées, en vue de leur partage rapide, étant donné l'urgence. L'assistance des partenaires de l'Université d'Edinburg, le pipeline squirrel qui permet l'analyse APOBEC a été calibrée pour le clade I du MPXV et a aidé à la caractérisation

du clade Ib dans les chapitres 5 et 6. Dans le chapitre 8, en plus de la vérification et validation des données de séquençage, j'ai également réalisé les cartographies, analyses statistiques, phylogénétiques, phylogéographiques et celles APOBEC3. Sous la supervision de mes encadrants, j'ai également contribué à la rédaction du draft original et la soumission tant du preprint que du journal.

Enfin, j'ai contribué à l'obtention des autorisations éthiques pour la valorisation de ces données générées dans le cadre de la surveillance nationale du mpox et des fièvres hémorragiques virales.

3.2. Impact sur la riposte globale

A la longue, les équipes ont dû s'accroître avec le temps en vue de permettre une réponse plus rapide aux enjeux sans cesse croissants. J'ai ainsi contribué à pérenniser les acquis de ce transfert technologique (Magpix, séquençage NGS et analyses bioinformatiques) en formant certains des autres collègues qui sont à leur tour devenus formateurs des équipes provinciales et d'autres pays africains. C'est dans ce cadre qu'a été mis en œuvre le séquençage NGS à l'INRB Goma pour différents pathogènes dont le SARS-CoV-2, EBOV, MPXV,… La caractérisation des épidémies MVE, l'identification des variants SARS-CoV-2 d'intérêt ou des clades mpox circulant ont eu un impact dans la gestion de ces crises sanitaires au pays ; et à ce jour, une stratégie nationale est en cours de rédaction en vue d'intégrer la surveillance génomique dans la surveillance intégrée ds maladies en RDC.

En outre, nous avons pu établir un algorithme d'analyse de séquençage, améliorer la préparation des librairies et contribuer au développement des outils d'analyse bioinformatique adaptée au clade I, avec l'aide des collègues du laboratoire TRANSVIHMI (GeVarLi) et autres partenaires.

Quelques applications pratiques sont iVar, CZid (https://czid.org/), le pipeline squirrel (GitHub-aineniamh/squirrel), artic-mpx-nf (https://github.com/artic-network/artic-mpxv-nf), consensus fasta (https://github.com/jtladner/Scripts/tree/master/reference-based_assembly), l'application Epi2me sur des données Illumina artic-mpx-illumina (https://github.com/artic-network/artic-mpxv-illumina-nf), Nextstrain(https://nextstrain.org/). Le renforcement des capacités dans les analyses bioinformatiques et phylogénétiques ont été rendues aisées grâce à différentes formations (GeVarLi, phylogénie moléculaire, …) que j'ai suivies durant mes années de thèse et appuis des équipes partenaires. Ce circuit permet à ce jour une réponse rapide devant différentes émergences, des communications rapides (virological.org) et la mise à jour sur la dynamique de l'épidémie (Nextstrain : Nextstrain / groups / inrb-mpox / clade-I). Et régulièrement, je contribue à valider les rapports des activités avant qu'ils ne soient partagés à la hiérarchie et aux partenaires impliqués.

Partie I : Séroprévalence et caractérisation moléculaire du mpox en RDC

Dans cette première partie, les travaux de thèse avaient pour objectif de mieux comprendre la circulation du mpox en RDC, voir à l'échelle globale, étant donné que dans l'histoire de la maladie, telle que vue dans la révue de la littérature, pendant longtemps la RDC a été le pays qui rapportait annuellement plus de 90% de cas avec en plus, une tendance à la hausse. Cependant, la surveillance de la maladie, pendant longtemps négligée, et dans un pays aux dimensions continentales, fait face à de nombreux obstacles, incluant les défis logistiques et l'insuffisance des outils de détection, débouchant entre autres sur un faible taux de confirmation biologique, pourtant obligatoire à cause de la faible spécificité des signes cliniques. Ainsi, sont essentiellement notifiés et rapportés les cas suspects répondant à la définition des cas.

Alors que la notification des cas sur une base clinique peut surestimer les taux d'infection, la confirmation en laboratoire par PCR peut les sous-estimer, en particulier sur des échantillons sous-optimaux comme le sang, couramment utilisé en RDC. Dans le cadre de nos travaux de thèse, le premier chapitre de cette partie se focalisera sur le developpement d'un test de serologie multiplex et son utilisation pour évaluer si les tests sérologiques peuvent être complémentaires pour confirmer les cas et identifier les chaînes de transmission humaines lors des enquêtes sur les épidémies. Au-delà des bénéfices obtenus en combinant les résultats de la PCR et la sérologie, nous avons appliqué cette stratégie dans une investigation de mpox dans une zone de santé nouvellement affectée, qui nous a permis d'identifier et confirmer un cas qui précédait le cas déclaré index.

Par la suite, les chapitres 2 à 7 sont une suite d'investigations qui document et élucident la dynamique de transmission changeante du mpox en RDC. Successivement, il sera question au chapitre 2 d'une investigation dans la province du Kwango, voisine à celle de Kwilu concernée par la première étude. Il s'agissait d'un évènement de cas de Clade I du virus mpox associés à des contacts sexuels en RDC, mettant en lumière pour la première fois une nouvelle voie de transmission potentielle jusqu'ici sous-estimée pour ce clade, car plus attribuée au clade II.

Ensuite, au chapitre 3, sera dressé un premier rapport sur la co-circulation du virus mpox et du virus de la variole porcine dans la province de la Tshuapa en RDC, relevant le rôle clé de l'approche « Une seule Santé » (« One Health ») soulevant des préoccupations quant à la transmission interespèces et aux interactions virales potentielles, au-delà desquelles les implications sur le diagnostic devraient être considérés, car prenant à profit la conservation des poxvirus et autorisant le diagnostic d'un cas par le test détectant le genre *Orthopoxvirus* (non-variolique). Dans le chapitre 4, sera documentée des transmissions transnationales du mpox entre la RCA et la RDC, via la Province du Sud-Ubangi, proche de la province de la Tshuapa, avec une analyse génomique.

Les chapitre 5 à 7 s'étendront respectivement sur l'émergence d'une nouvelle lignée du Clade I du virus mpox depuis la zone minière de Kamituga donnant lieu à une épidémie humaine soutenue, la documentation de ses premiers cas à Goma, ville dotée d'un aéroport international et ses introductions dans la ville de Kinshasa dressant un tableau de cocirculation des 2 sous-clades du clade I du MPXV dans la capitale.

Enfin, pour conclure cette partie, le chapitre 8 traitera de la caractérisation moléculaire des échantillons prélevés entre 2018 et 2024 afin de comprendre la diversité des virus MPXV et la dynamique de la transmission du mpox en RDC.

Chapitre 1 : Utilisation de la sérologie mpox dans les investigations de cas et d'épidémies de mpox

a. Résumé :

Contexte :

Les cas de mpox sont de plus en plus signalés en Afrique, avec la République démocratique du Congo (RDC) payant le plus lourd tribut. Alors que la notification des cas sur une base clinique peut surestimer les taux d'infection, la confirmation en laboratoire par PCR peut les sous-estimer, en particulier sur des échantillons sous-optimaux comme le sang, couramment utilisé en RDC.

Méthodologie :

Ici, nous avons utilisé un test basé sur la technolgie Luminex pour évaluer si les tests d'anticorps peuvent être complémentaires pour confirmer les cas mpox et identifier les chaînes de transmission humaines lors des enquêtes sur les épidémies.

Résultats et conclusion :

Nous avons utilisé des échantillons de sang restants de 463 patients, prélevés lors de 174 épidémies entre 2013 et 2022, avec les résultats correspondants de la PCR mpox et VZV (varicelle). Au total, 157 échantillons (33.9 %) étaient positifs à l'orthopox-PCR et classés comme mpox+ ; 124 (26,8 %) avaient des anticorps dirigés contre au moins un des trois peptides du MPXV. La proportion d'échantillons positifs pour les anticorps était significativement plus élevée dans les échantillons positifs à mpox (36.9 %) que dans les échantillons négatifs (21.6 %) ($p < 0,001$). En combinant la PCR et la sérologie, 66 patients supplémentaires ont été identifiés, ce qui a conduit à un taux d'infection mpox de 48.2 % (223/463) contre 33.9 % lorsque seule la positivité de la PCR est prise en compte. Des infections au MPXV ont été identifiées dans 14 zones de santé supplémentaires et 23 émérgences supplémentaires (111/174 (63.8 %) contre 88/174 (50.6 %)).

Nos résultats soulignent le besoin urgent d'un diagnostic rapide sur place pour éviter la propagation du mpox et de caractérisation de souches circulantes qui sera longuement discuté dans les chapitres suivants.

b. Article, Pathogens, 2023.

Use of mpox Multiplex Serology in the Identification of Cases and Outbreak Investigations in the Democratic Republic of the Congo (DRC)

Eddy Kinganda-Lusamaki [1,2,3,*], Lionel Baketana Kinzonzi [2], Etienne Ndomba-Mukanya [2], Julie Bouillin [1], Guillaume Thaurignac [1], Adrienne Amuri Aziza [2], Gradi Luakanda Ndelemo [2], Nicolas Fernandez Nuñez [1], Thierry Kalonji Mukendi [4], Elisabeth Pukuta Simbu [2], Antoine Nkuba-Ndaye [1,2,3], Emmanuel Lokilo Lofiko [2], Emile Malembi Kibungu [4], Robert Shongo Lushima [4], Ahidjo Ayouba [1], Placide Mbala-Kingebeni [2,3], Jean-Jacques Muyembe-Tamfum [2,3], Eric Delaporte [1], Martine Peeters [1,*] and Steve Ahuka-Mundeke [2,3]

[1] TransVIHMI, University of Montpellier (UM), French Institute of Health and Medical Research (INSERM), French National Research Institute for Sustainable Development (IRD), 34394 Montpellier, France;

[2] Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo;

[3] Service de Microbiologie, Département de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa (CUK), Université de Kinshasa (UNIKIN), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[4] Programme National de Lutte Contre le Monkeypox et les Fièvres Hémorragiques Virales, Ministère de la Santé (PNLMPX-FHV), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo;

***** Correspondence: eddylusamaki@gmail.com (E.K.-L.); martine.peeters@ird.fr (M.P.)

Pathogens 2023, 12(7), 916; https://doi.org/10.3390/pathogens12070916

Submission received: 6 June 2023 / Revised: 29 June 2023 / Accepted: 4 July 2023 / Published: 7 July 2023.

Abstract

Human mpox cases are increasingly reported in Africa, with the highest burden in the Democratic Republic of Congo (DRC). While case reporting on a clinical basis can overestimate infection rates, laboratory confirmation by PCR can underestimate them, especially on suboptimal samples like blood, commonly used in DRC. Here we used a Luminex-based assay to evaluate whether antibody testing can be complementary to confirm cases and to identify human transmission chains during outbreak investigations. We used left-over blood samples from 463 patients, collected during 174 outbreaks between 2013 and 2022, with corresponding mpox and VZV PCR results. In total, 157 (33.9%) samples were orthopox-PCR positive and classified as mpox+; 124 (26.8%) had antibodies to at least one of the three mpox peptides. The proportion of antibody positive samples was significantly higher in mpox positive samples (36.9%) versus negative (21.6%) ($p < 0.001$). By combining PCR and serology, 66 additional patients were identified, leading to an mpox infection rate of 48.2% (223/463) versus 33.9% when only PCR positivity is considered. mpox infections were as such identified in 14 additional health zones and 23 additional outbreaks (111/174 (63.8%*)* versus 88/174 (50.6%)). Our findings highlight the urgent need of rapid on-site diagnostics to circumvent mpox spread.

Keywords: mpox; multiplex serology; outbreak; Democratic Republic of the Congo

1. Introduction

Mpox, previously called Monkeypox (MPX), is a zoonosis caused by the Monkey-pox virus (MPXV) from the Orthopox genus. Mpox occurs mainly in central and west Africa and causes a disease with symptoms similar to those previously observed in smallpox patients [1–3]. The first case of Mpox in humans was identified in 1970 in the Democratic Republic of the Congo (DRC) [4]. With the eradication of smallpox in 1980, human Mpox cases have increasingly been reported in central and west Africa. Before 2022, 11 African countries have reported human cases of Mpox, i.e., Benin, Cameroon, the Central African Republic (CAR), Cote d'Ivoire, DRC, Gabon, Liberia, Nigeria, the Republic of the Congo (RC), Sierra Leone and South Sudan [5–7]. The highest burden of the disease is reported in DRC, where more than 90% of Mpox cases occurred. Never-theless, sporadic cases have been documented outside Africa, but always with an epi-demiologic link to the continent [8,9]. There are also two distinct clades of MPXV vi-ruses; clade I circulates in Central Africa (Congo Basin) and clade II in West Africa, with the latter clade being less pathogenic [1,5,9,10].

Mpox has been considered as a rare and neglected disease, but the recent large outbreak that started in May 2022 and infected more than 80,000 individuals in more than 100 countries over the world highlighted the global public health threat of Mpox [11,12]. Mpox outbreaks are supposed to be the result of spillover events from animals to humans, and subsequent human-to-human transmission chains are limited to a few individuals [7,13]. But the recent global outbreak, which was caused by a strain close to one from an outbreak in 2017 in Nigeria [9,11,13], suggests that human transmission has been ongoing for a longer period than previously thought. The new strains have been classified as clade IIb or III depending on the authors [14,15]. The true burden of Mpox

in Africa is not known and it cannot be excluded that human transmission and pauci-or asymptomatic infections are underestimated in Africa.

In DRC, the highest affected country in Africa, Mpox is one of 21 reportable dis-eases or health events in the national Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR) program. The majority of Mpox cases occur in remote areas and case reporting is thus mainly based on clinical signs according to the WHO case definition [14,16]. Mpox disease can resemble various other diseases with generalized skin eruption or rash-like measles, bacterial skin infections, scabies and chickenpox, also known as var-icella [17]. The high similarities in the clinical presentation of varicella can lead to up to 50% of varicella cases that are confused with Mpox [2,18–21]. Moreover, Mpox/varicella coinfections can also occur [22]. Based on clinical signs only, there is thus likely an overestimation of Mpox cases. Since 2004, confirmatory testing by polymerase chain reaction (PCR) in DRC, is only available in the National Reference Laboratory at the "Institut National de Recherche Biomédicale" (INRB) located in Kinshasa, the capital city, but is rarely performed to confirm clinically notified case numbers. The most suitable specimens for laboratory confirmation are swabs or crusts from the skin le-sions. Blood is not recommended for molecular diagnosis because of the short and variable viremic period [2,14]. However, remote health care centers are often not equipped to safely collect crusts or swab samples, and instead blood samples are col-lected and shipped to the reference laboratory for the large majority of cases. Underes-timation of clinically confirmed cases by PCR in the reference laboratory is thus very likely, especially for patients in remote areas who often arrive with a delay after the onset of symptoms. In addition, adequate storage, processing and shipment of samples from remote areas, with equatorial climates, to the reference laboratory can also have a negative impact on PCR results. Therefore, antibody detection could be an alternative and complementary test to confirm Mpox

infections. IgG antibodies can be detected soon after a rash [2]. However, the challenges with serological assays are cross-reactions with other orthopox viruses because they share many conserved sur-face antigens, which is especially crucial in serological assays that are based on whole virus lysates. Dubois and colleagues developed an Elisa based on a combination of conjugated peptides that are specifically for the detection of antibodies against MPXV without cross-reactivity with smallpox antibodies in vaccinated people. The test has high sensitivity and specificity to detect Mpox antibodies early in infection (2–6 months) and more than 2 years after infection [23].

Here we adapted the optimized peptide-based Elisa on a multiplex serological platform to evaluate to what extent antibody testing can be complementary to the current Mpox surveillance system in DRC and can provide additional information on eventual human transmission chains during epidemiologic investigations around the outbreaks, such as occurred recently in Masimanimba, a newly affected area in the Kwilu province in DRC.

2. Materials and Methods

2.1. Study Samples

Left-over blood samples with corresponding Mpox and/or Varicella-Zona Virus (VZV) PCR results from the national surveillance program were used for this study. Samples were from different cases and outbreaks that occurred between 2013 and 2022 across the country. Sample collection and shipment to the reference laboratory in Kinshasa for confirmation of Mpox infection was achieved in the framework of the national Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR) program (***Figure 38***) in collaboration with the National Program for the Control of Monkeypox and Viral Haemorrhagic Fevers (PNLMFH). Authorization for further analysis and

use of data was obtained by the Ethical Committee of the Ecole de Santé Publique de l'Université de Kinshasa (ESP-UNIKIN, Number ESP/CE/05/2023).

Limited demographic data, like sex, age, health zone and province, as well as in-formation on onset of symptoms were also available for the majority of the samples. All samples are from patients that meet the clinical case definition, i.e., "An acute illness with fever >38.3 °C (101 F), intense headache, lymphadenopathy, back pain, myal-gia, and intense asthenia followed one to three days later by a progressively develop-ing rash often beginning on the face (most dense) and then spreading elsewhere on the body, including soles of feet and palms of hand" [16]. Blood samples were kept at −20 °C since their arrival at INRB. Samples used in the study were those for which ade-quate volumes were still available.

2.2. PCR Detection, Differential Testing and Sequencing

We extracted DNA at INRB using a Qiagen DNA Mini kit from blood samples and subsequently screened for Mpox with an Orthopoxvirus-specific real-time PCR assay followed by a real-time PCR assay targeting the varicella-zoster virus (VZV) [24]. Or-thopox (OPX)-positive samples were presumptively considered as Mpox-positive, be-cause other known human Orthopox viruses do not cause the same clinical symptoms [14]. In order to confirm Mpox infection in the newly affected area in Masimanimba, whole genome sequencing was attempted on samples from the index case by Next Generation Sequencing (NGS). The library preparation was performed using Illumina DNA Prep with Enrichment and the libraries were enriched for Mpox using biotinyl-ated custom probes synthesized by Twist Biosciences as described previously [25,26].

2.3. Bioinformatics and Phylogeny

From the fastq files obtained, a bioinformatic pipeline, GeVarLi (GEnome assem-bly, VARiant calling and LIneage assignation; https://forge.ird.fr/transvihmi/GeVarLi accessed on 5 July 2023),

was used to control reads quality and clean them. Cleaned reads were aligned to NC_003310.1 MPXV genome, and the viral lineage was assigned using Nextclade. Further, variants calling and genome coverage statistics were per-formed and a consensus genome sequence generated lead to a fasta format file. The sequence was deposited on GISAID with accession number EPI_ISL_14201642.

The newly identified MPXV sequence was aligned with other reference sequences that have been detected in humans and rodents, mostly in DRC, representing the di-versity of currently known Mpox lineages. Multiple sequence alignment was per-formed using MAFFT v7 (https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/ accessed on 5 July 2023). The best scalable model based on alignment data was obtained using the MegaX version 10.0.5 software [27]. The phylogeny was inferred by maximum likelihood (ML) using PhyML. Branch support was estimated with 100 bootstrap resampling [28]. The trees have been formatted and annotated with FigTree v1.4.4 software (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/, accessed on 5 July 2023) and Inkscape (https://inkscape.org accessed on 5 July 2023).

2.4. Antibody Testing

Recombinant proteins and peptides were used to optimize the multiplex serolog-ical assay at TransVIHMI unit at the Institut de Recherche pour le Développement (IRD) in Montpellier (France) and INRB, Kinshasa (DRC). The evaluated set included 3 commercially available recombinant proteins, which are C19L from Left terminal re-gion (ProteoGenix SAS, Schiltigheim, France), D13L Central conserved region (Prote-oGenix SAS, Schiltigheim, France) and A29 the Right terminal region (SinoBiological, Advion Interchim Scientific, Montluçon, France); and 3 synthetic peptides from Right terminal region B (B21R.179/180, B21R.185/186 and B22R.64/65), previously identified by Dubois and colleagues [23]. These peptides were

synthesized as 31-mer peptides with an additional N-terminal cysteine residue (82–95% purity) and conjugated to bovine serum albumin (BSA) (Eurogentec, Seraing, Belgium). Reconstituted pep-tide-conjugates (2 mg/mL in H2O) were stored at –80 °C until use. We used our previ-ously described protocol for coupling the conjugated peptides or recombinant proteins at different concentrations to Luminex beads to optimize the assay conditions [29]. Briefly, conjugated peptides (5 µg/1.25 × 106 beads) and recombinant proteins (2 µg/1.25 × 106 beads) were covalently coupled on carboxyl functionalized fluorescent magnetic beads (Luminex Corp., Austin, TX, USA) with the BioPlex amine coupling kit (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France) according to the manufacturer's instruc-tions. Unreacted sites were blocked with blocking buffer from the amine coupling kit. Peptide-coupled microsphere preparations were stored in storage buffer (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) at 4 °C in the dark until use. Before use, peptide-coupled beads were diluted to 2000 beads/µL of assay buffer (Phosphate Buffered Saline (PBS) containing 0.75 mol/L NaCl, 1% (w/v) bovine serum albumin (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), 5% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum (Gib-co-Invitrogen, Cergy Pontoise, France), and 0.2% (v/v) Tween-20 (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France). Fifty microliters of bead mixture were added to each well of 96-well flat-bottom chimney plates (Greiner bio one, Frickenhausen, Germany). The recombinant proteins and peptides were evaluated on a panel of 60 samples from patients confirmed with Mpox at INRB, Kinshasa and 30 control samples from indi-viduals in France born after 1980. Antigens with areas under curve (AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) analysis above 0.9 were kept for the screening. After optimization, patient samples were then tested at INRB with the optimized con-ditions; i.e., a 1/200 dilution and incubated for 2 h at 37 °C with peptide-coated beads in the dark on a plate shaker at 300 rpm/min. After washing, 50 µL of biotin-labeled an-ti-human IgG was

added (BD-Pharmingen, Le Pont De Claix, France) at a concentration of 1 µg/mL in each well and incubated for 30 min in the dark while shaking at 300 rpm. Fifty µL of streptavidin-R-phycoerythrin (Fisher Scientific/Life Technologies, Illkirch, France) at 1 µg/mL were added per well after washing, and incubated for 10 min with shaking at 300 rpm. Magpix equipment (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette. France) was used to read antigen-antibody reactions. At least 100 events were read for each bead set, and the results were expressed as Median Fluorescence Intensity (MFI) per 100 beads. For the calculation of cut-off values, we tested 90 Mpox negative samples from DRC collected during routine screening for Human Immunodeficiency Virus (HIV) in-fection. The cut-off was calculated as the mean plus three standard deviations for each peptide. On each plate, one positive and one negative known sample were included and tests were not validated when inter-assay variability was above 15%. We consid-ered samples positive for a given antigen if they presented MFI above the cut-off value for this antigen. Samples were considered positive for Mpox infection when reactivity to at least one peptide was observed as recommended by Dubois and colleagues [23].

2.5. Statistical Analysis

We used the Chi-square and the non-parametric Wilcoxon Mann–Whitney tests implemented in Stata 15 software to compare proportions and medians of age, MFI values for each peptide between Mpox PCR positive and negative samples. The signif-icance level was set at 0.05. MFI distribution were represented graphically using PRISM version 9 software.

3. Results

3.1. Assay Optimization and Antibody Testing for mpox Outbreak Confirmation

Overall, six antigens were used to optimize the multiplex serological assay as de-scribed in Methods on a subset of 60 Mpox PCR positive samples, out of the 463 with corresponding

Mpox PCR results used in this study. The three peptides (B21R.179/180, B21R.185/186 and B22R.64/65) had the best performances and were selected to be used in our panel. The areas under curve (AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) curves per protein summarizing their performances were best for the three peptides; i.e., 0.9575, 0.9506 and 0.9486 for B22R.64/65, B21R-180/186 and B21R-179/180, respectively, versus 0.8578 for C19L(A), 0.8398 for A29(B), and 0.7092 for D13L(C) (***Figure 39*** et ***Figure 40***).

Left over blood samples from the total of 463 patients with corresponding Mpox and VZV PCR results from the national surveillance program were then used to evalu-ate to what extend serological testing has an additional value in Mpox outbreak con-firmation. All assays were performed at the national reference laboratory at INRB, Kinshasa. Samples were from 174 different outbreaks that occurred between 2013 and 2022 in 22 of the 26 provinces of the country. Specifically, samples were collected from a total of 129 different health zones out of the 519 in DRC. The majority of analyzed samples are from 2022, representing 47.3% (219/463) of the total tested. In this same year, we registered a higher number of blood samples that have been collected and shipped to the INRB (241 samples), compared to previous years' 41–135 samples/year as shown (***Figure 41***), which also reflects the higher number of clinical suspect cases reported in 2022.

The characteristics of patients and samples are shown in ***Tableau 13***. Overall, 214 (46.2%) samples were from female patients, 229 (49.5%) from male, and for 20 (4.3%) samples no information on sex was available. The median age of patients was 12 years (IQR 5–25, range <1 to 78 years). The median time from rash onset to sample collection was known for 378 samples (81.6% of the dataset) and was 6 days (IQR, 4–10; range, 1 to 95 days). The median time of shipment of samples was 12 days (IQR, 8–20; range, 0–66 days) for 431 samples (93.1% of the dataset) with information available.

Tableau 13. *Characteristics of patients and samples included in this study.*

Variable	mpox PCR Positive N = 157 *	mpox PCR Negative N = 306	Total N = 463	P value
Age [1], years median (IQR [#])	12 (5–25)	13 (6–26)	13 (5–25)	0.523
Sex [2],				0.434
Female	70 (44.9%)	145 (47.2%)	214 (46.2%)	
Male	83 (53.2%)	146 (47.6%)	229 (49.5%)	
Missing	4 (2.6%)	16 (5.2%)	20 (4.3%)	
Delay symptoms and sampling [3]				
Days (IQR)	6 (3–9)	6 (4–11)	6 (4–10)	0.042
Range	0–28	0–95	0–95	
Delay sample shipment [4]				
Days (IQR)	13 (8–21)	12 (7–20)	12 (8–20)	0.435
Range	2–58	0–66	0–66	
mpox IgG antibodies	58 (36.9%)	66(21.6%)	124 (26.8%)	<0.001 **
VZV PCR positive [5]	0/20 (0.0%)	28/305 (9.2%)	28/325 (8.6%)	

[1] Age is documented for 440 patients (154 mpox PCR-positive and 286 negative). [2] Sex is documented for 443 patients (153 mpox PCR-positive and 290 negative). [3] Delay between symptoms and sampling are documented for 378 patients (130 mpox PCR-positive and 248 negative). [4] Delay of sample shipment is documented for 431 patients (155 mpox PCR-positive and 276 negative). [5] VZV PCR results were available for 325 patients (20 mpox PCR-positive and 305 mpox PCR-negative). The VZV PCR was not performed for 137 mpox positive patients. * Out of those 157 mpox positive samples, 1 blood sample was negative but the vesicle from the same patient was positive. ** IgG antibody detection proportion is significantly higher in mpox PCR positive than negative (Chi-2 test). [#] IQR; interquartile range.

A total of 157 (33.7%) samples were positive by Orthopox PCR and thus classified as Mpox-positive, and 306 were negative for Orthopox (***Tableau 13***), among which 277 out of 305 tested were also negative for VZV PCR. Mpox PCR-positive samples were ob-served in 17 of the 22 provinces and in 71 (55%) of the 129 health zones from which samples were tested (maps in ***Figure 42*** and ***Figure 43***). Among the 463 samples tested, a total of 124 (26.8%) had antibodies to at least one of the three MPXV peptides. The B22R-64/65 peptide detected the highest number of seropositive samples (99/124, 79.8%), and an additional 25 (20.2%) were detected with the other peptides (***Tableau 14***). It was not possible to evaluate whether reactivity with a particular peptide was related or not to the delay between symptom onset ant testing given the low numbers of reac-tive samples for certain peptides.

Tableau 14 *: Serological results against the different peptides and peptide combinations*.

Reactive Antigen(s)	Positive samples (N = 463)	Median days of delay between symptoms and sample sollection (IQR)
B21R-179/180 only	17 (3.7%)	9.5 (5–18)
B21R-180/186 only	5 (1.1%	4 (2–6)
B22R-64/65 only	70 (15.1%)	8 (5.5–10)
Both B21R-179/180 and B21R-180/186	3 (0.6%)	2 (0–13)
Both B21R-179/180 and B22R-64/65	24 (5.2%)	9.5 (6–10.5)
Both B21R-180/186 and B22R-64/65	4 (0.9%)	37.5 (23–52)
All 3 peptides	1 (0.2%)	8
All positive to B21R-179/180	45 (9.7%)	8.5 (5–11)
All positive to B21R-180/186	13 (2.8%)	6 (2–13)
All positive to B22R-64/65	99 (21.4%)	8 (6–10)
Positive to at least one antigen	124 (26.8%)	8 (5–11)

The proportion of antibody positive samples was higher in samples that were confirmed for Mpox infection by PCR; i.e., 58/157 (36.9%) versus 66/306 (21.6%) for the Mpox PCR negative samples with $p < 0.001$ (***Tableau 13***), regardless of the delay between symptoms and sampling. After running a Wilcoxon rank-sum test for each peptide, the median MFI values were higher in Mpox PCR-positive samples than in negative results, with p-values estimated to be 0.0027, 0.0002 and <0.0001 for B21R179/180, B21R180/186 and B22R64/65, respectively (***Figure 36*** : MFI distribution per peptide for mpox PCR negative (blue) and positive (red) samples.).

Overall, 99 (21.4%) samples were only positive by PCR, 58 (12.5%) were positive by PCR and serology and 66 (14.3%) were positive only by serology. This means that by combining PCR and serology, an additional 66 patients were identified as infected, bringing the total Mpox infection rate to 48.2% (223/463) instead of 33.9% when only PCR positivity is considered. In our sample set, this also means that Mpox infection was confirmed in 14 additional health zones, including in urban health zones such as N'djili in Kinshasa the capital city, or Kikwit-Sud in Kwilu Province (maps in ***Figure 42*** and ***Figure 43***), i.e., 86/129 (66.7%) versus 72/129 (55.8%) affected health zones.

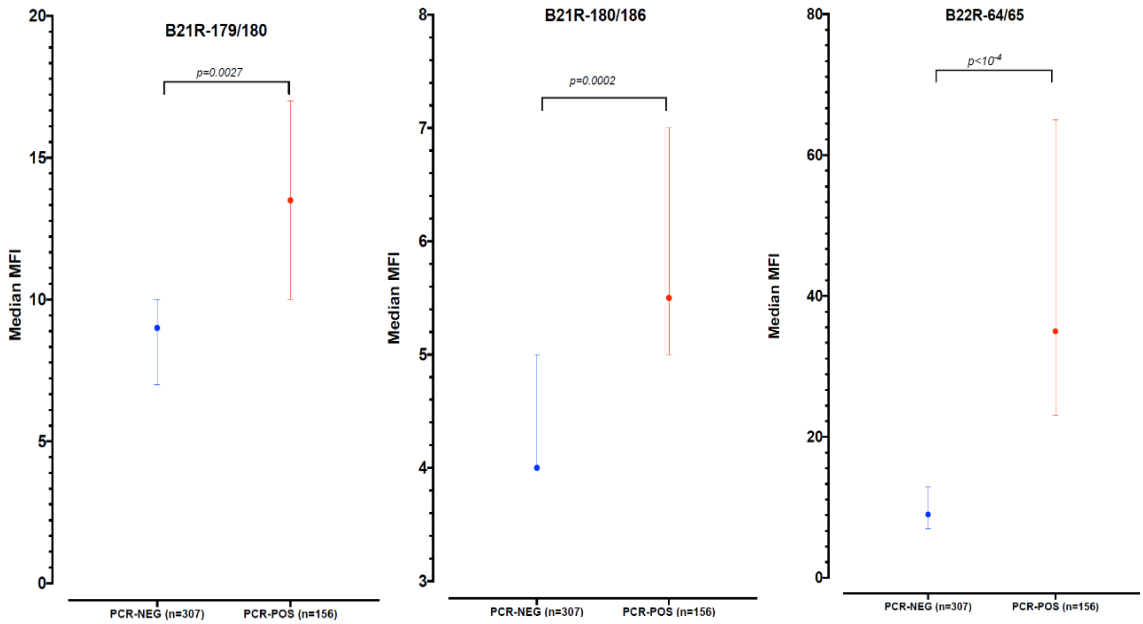


Figure 36 *: MFI distribution per peptide for mpox PCR negative (blue) and positive (red) samples.*

The median age of patients with antibodies to Mpox is comparable to those with a PCR confirmed infection; i.e., a median of 14 years (IQR, 7–25; range <1–60 years) ver-sus 12 years (IQR, 5–25; range <1–63 years) for the 120 and 154 patients with infor-mation on age available, respectively (p = 0.3578) (***Tableau 15***). Similarly, there were no significant differences using the same test (p = 0.523), when comparing the median age of patients with PCR confirmed infection (median, 12 years; IQR, 5–25; range, <1–63 years) to the median of age of patients with negative PCR results (median, 13 years; IQR, 6–26; range, <1–76 years) as shown in ***Tableau 13***. Male patients were more frequently positive, either by PCR (83/157; 53.2%) or for antibodies (66/121; 54.6%), alt-hough not significantly (p = 0.523). The time between the onset of symptoms and sam-ple collection was comparable between patients that tested positive for Mpox by PCR (n = 130) and those that were negative (n = 248); median 6 days (IQR, 3–9; range; 0–28 days) versus 6 days (IQR, 4–11; range 1–95 days), respectively. Regarding serology re-sults, the time of onset of symptoms was statistically different (p = 0.0016) between pa-tients without anti-Mpox antibodies and those with, i.e., a median of 6 days (IQR, 4–9; range, 0–95 days) for the 274 seronegative

samples versus 8 days (IQR, 5–11; range, 0–52 days) for the 104 seropositive samples for whom this information was available. Overall, the delay of symptom onset and detection of Mpox by PCR was shorter as for the delay for presence of antibodies; i.e., median 6 days (IQR, 3–9; range, 0–28 days) for PCR positivity versus 8 days (IQR, 5–11; range, 0–52 days) for antibody detection.

For some Mpox alerts, samples from more than one patient were shipped for con-firmation and the 463 samples tested were from 174 alerts, among which 88 (50.6%) were confirmed by PCR, and an additional 23 (13.2%) were identified by serology with a total of 111 (63.8%) outbreaks confirmed for Mpox. The 23 additional alerts were con-firmed by the serology of thirty-one samples out of the sixty-six samples only positive to serology, with a median of one sample per alert. Among the sixty-three remaining outbreaks that were classified as negative for Mpox, nine were confirmed as VZV by PCR. We also noted four outbreaks with co-circulation of Mpox and VZV; i.e., two Mpox PCR confirmed outbreaks were also positive for VZV, and two additional VZV outbreaks were observed in outbreaks that were only serologically identified.

3.2. Antibody Testing during an Outbreak Investigation in Masimanimba Health Zone, Kwilu Province

When Mpox cases are notified in a new health zones, an epidemiological investigation is organized in the framework of the national Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR) program. As such, the Masimanimba health zone in the Kwilu province reported a first case on the first of May 2022. The index case was a 20-year-old male student; fever and cervical lymphadenopathy started on 20 April followed by rashes 4 days later. He first received traditional care, which failed. Therefore, he was brought to the Masimanimba's referral general hospital. The evolution of the disease and skin lesions alerted the Central Office of the Masimanimba health zone and the case was officially reported to the provincial (Kwilu province) and national health

authorities on 1 May. Blood and crust samples were taken on 3 May for laboratory confirmation, and the case was confirmed positive for Mpox by universal orthopox PCR on 9 May for both samples. The Ct values were, respectively, 35.8 on blood and 17.67 on crust. Sequencing was performed on the crust sample due to its higher viral load and the whole genome sequence was obtained with 99.78% genome coverage at 3×, 94.46% at 10× and mean depth 55. Phylogenetic analysis confirmed that the strain (in red on the tree) belonged to Clade I, subgroup IV (***Figure 37***).

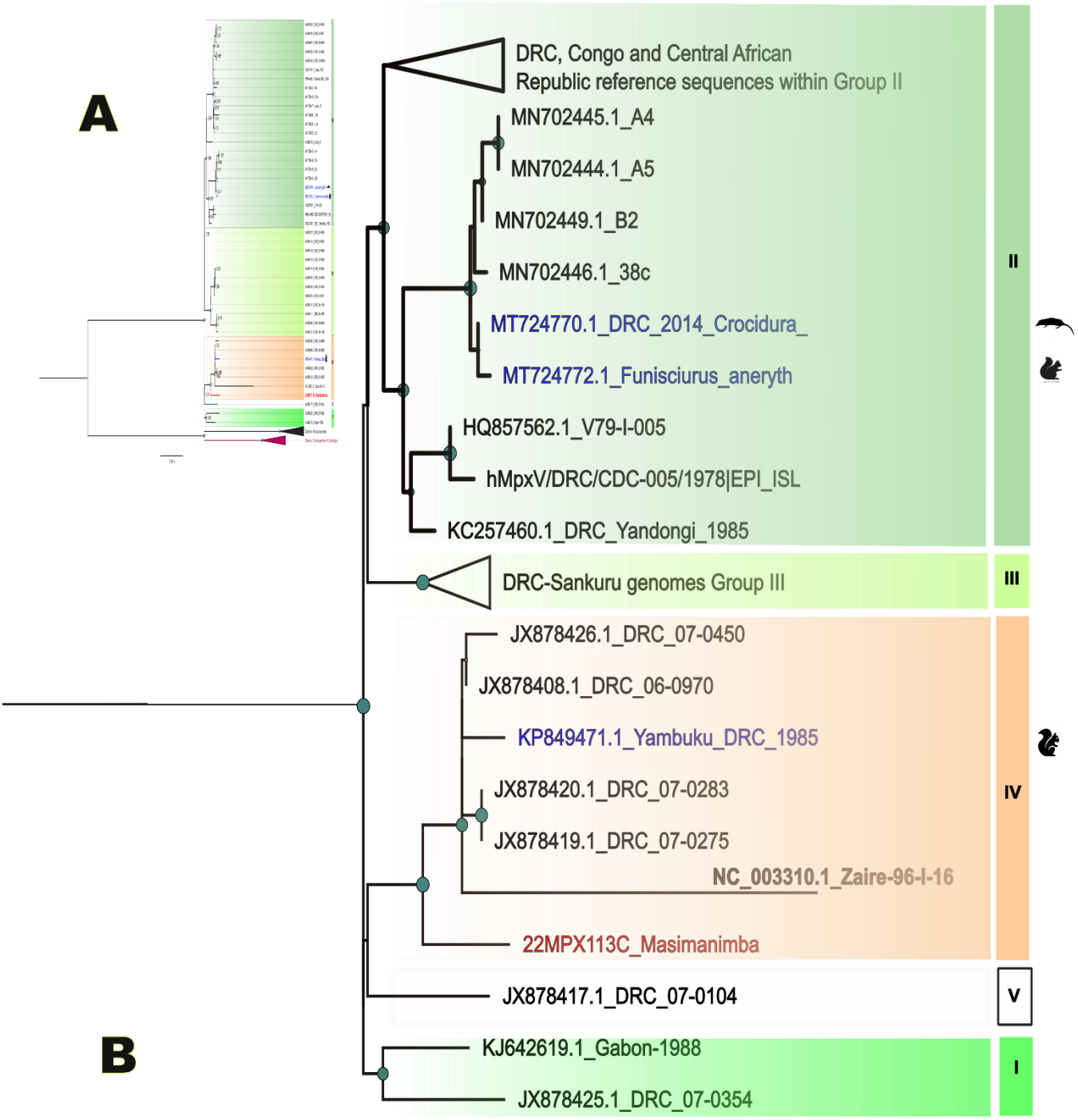


Figure 37 : *(**A**) Phylogenetic tree based on complete genomes built by maximum likelihood using the GTR+G model. Clade II sequences are used as outgroup. (**B**) Subtree highlighting the newly identified monkeypox strain in Masimanimba in red and sequences in blue are from animals. Roman numbers indicate previously described MPXV lineages [31], each MPXV lineage is highlighted in a different color.*

Epidemiological investigation in the field was conducted between 17 and 24 May 2022. This investigation revealed that the index case, at the basis of the national alert, is probably not the primary case of Mpox infection in the village without excluding the zoonotic source. A 25-year-old male, a friend of the index case, reported that he had similar clinical symptoms, which started 3 weeks earlier on 4 April. He was assisted by the index case during his symptomatic phase, who provided him traditional care using medicinal plants, treated as having chickenpox. Blood was drawn from this individual and serological testing revealed the presence of antibodies to Mpox peptides, suggesting that this person could be at the origin of the contamination of the case reported to the health authorities (***Figure 44***).

Moreover, the epidemiological investigations also reported a case of another potential Mpox case, i.e., a man of more than 60 years old who died on December 2021 from a disease with similar symptoms. These observations illustrate that Mpox cases can go unrecognized and suggests underreporting.

4. Discussion

In this study, we evaluated whether testing for IgG antibodies can provide additional information during the investigation of Mpox outbreaks and identification of cases, in the framework of the national Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR) program in the Democratic Republic of Congo (DRC). In DRC, due to shortage of collection kits, blood samples are generally used instead of crust or skin lesions, which are more appropriate for confirmation of clinical suspect cases, and it is thus very likely that PCR confirmation underestimates the number of Mpox cases. Mpox occurs mainly in remote areas, especially in Central Africa, and patients often attend the health care centers at a late stage in the disease, which could be after the viremic peak in blood. Similarly as for Mpox, crust and skin samples are more suitable than blood to diagnose infection with varicella/chickenpox (VZV), which is often clinically confounded with

Mpox [14]. Therefore, serological testing may be useful when the clinical presentation and epidemiology suggest Mpox infection despite negative PCR results and in a low-resource context. In addition, instead of using each antigen separately, or more stringent criteria like reactivity to a minimum of two antigens, we chose to use positivity to at least one antigen to determine positivity and to gain sensitivity as those peptides were already shown to be specific and as recommended by Dubois and colleagues [23]. Among the 463 blood samples tested in our study from 174 clinically confirmed Mpox alerts in DRC between 2013 and 2022, 50% (87/174) were confirmed by PCR and most negative samples for Mpox also tested negative for varicella/chickenpox by PCR. Testing for MPXV-specific antibodies identified 66 additional patient samples positive for Mpox, thus increasing the positivity rate from 33.7% by PCR to 48.2% when both PCR and/or seropositivity are considered. Mpox was as such identified in 14 additional health zones in the country and in 24 additional Mpox alerts leading to a total of 63.8% alerts confirmed as Mpox.

Overall, for almost half of the patients with clinical confirmed Mpox infection, the samples shipped for laboratory confirmation were negative by PCR and/or antibody testing for Mpox and the large majority were also negative for varicella PCR. For a proportion of these samples, PCR negativity can be due to the fact that diagnosis is performed on blood after the viremic peak for both infections. In addition, suboptimal shipping and storage conditions on site can also play a role in PCR negativity. The median time of sample shipment was 14 days, often in suboptimal equatorial climate temperature conditions that can affect both antibody and molecular detection, for example delays of 2 months were observed for some samples in our study. These logistical factors combined to the use of long storage of samples could impact sample integrity and assay sensitivity. This is especially the case for IgM antibodies that are more temperature sensitive and therefore we used IgG detection in our assay.

The low positivity rate of antibody detection suggests that, in this early stage of the disease, IgG antibody levels are still low and that the period of IgG antibody development can be variable and longer than a few days only after the onset of rash as previously reported [2,17,31]. Detection of total immunoglobulins using anti-kappa light chain, instead of anti-IgG, did not improve the detection rate (data not shown). In our study, the median time of onset of symptoms and sample collection was 6 days. In general, antibody detection occurs later than viral detection in blood. In this sample set from the national surveillance program, the delay of Mpox detection by PCR was shorter as the delay for the presence of antibodies; i.e., a median of 6 days for PCR positivity versus 8 days for antibody detection. Although the information on symptom onset has to be taken with consideration because of the possible variability in the interpretation of symptoms in the different healthcare centers across the country and can vary significantly on the experience and training of health care personnel. Other studies in other areas from DRC or in the Central African Republic also observed that a significant proportion of clinical suspect Mpox were not confirmed [32,33]. Despite the fact that a significant proportion of samples could be false negatives by PCR and antibody detection because of the sensitivity of the assay or the short viremic period and variable period of IgG appearance, the storage conditions on site and suboptimal shipment, it cannot be excluded that, for a subset of the samples that are negative for Mpox PCR and serology as well as negative for varicella PCR, another etiologic agent is responsible for the rash. Even though the set of peptides used for serology was the best option according to the literature for specificity, it cannot be excluded that the sensitivity is too low. Today, only limited data are available on antibody dynamics in Mpox infections early in infection as well as on their long-term duration and more studies are urgently needed.

When Mpox cases are reported in new health zones in DRC, an epidemiologic investigation in the field around the new cases is organized in the framework of the national Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR) program. This was the case in Masimanimba in May 2022, where the investigation completed with serological testing revealed that the index case was not the primary Mpox patient in this area, i.e., the first case after the zoonotic transmission event. The index case most likely acquired the disease by human to human transmission instead of a zoonotic transmission event. Moreover, clinical suspect cases seemed to be present in the area since the end of December 2021. The index case that alerted the health system was confirmed for Mpox infection by PCR on blood and crusts and the complete genome from the virus was sequenced, confirming infection with a clade I variant from Central Africa. Therefore, it is also very likely that the serological test from the contact person corresponds to specific Mpox antibodies. This patient did not attend the health-care center, but used traditional medicine and was therefore missed by the national surveillance system.

5. Conclusions

In conclusion, our study clearly shows that the extent of Mpox infections is not known in DRC and most likely also in other African countries after more than 50 years of occurrence and despite the threat it represents. On one hand, case reporting on clinical case definitions can overestimate the number of infections and on the other hand, laboratory confirmation by PCR only and logistical challenges can underestimate infection rates. Moreover, Mpox cases that alert the health system can already be secondary cases and are thus not always the index cases who acquired Mpox after zoonotic transmissions and therefore some Mpox alerts from the same areas over several months interval could represent human transmission chains that can be longer than initially expected. It can thus also not be excluded that certain outbreaks go unrecognized. There is thus an urgent need

for rapid and point of care tests that can be used in remote areas to rapidly diagnose Mpox cases. Seroprevalence studies to evaluate the extent of Mpox infections in endemic areas and countries are also urgently needed as well as genetic characterization of Mpox virus strains in humans but also in wildlife to evaluate the proportion of human and zoonotic transmissions. The recent large outbreak of Mpox outside Africa has highlighted the global public health threat of this infection.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: https://www.mdpi.com/article/10.3390/pathogens12070916/s1,

***Figure 38*:** Workflow of the mpox Surveillance Algorithm in DRC

***Figure 39*:** ROC curves summarizing peptide validation used in this study: ROC curve analysis was performed on a panel of 90 samples (60 mpox cases from the DRC and 30 control samples from France).

Figure 40: ROC curves summarizing recombinant protein validation discarded in this study: ROC curve analysis was performed on a panel of 90 samples (60 mpox cases from the DRC and 30 control samples from France).

Figure 41: Graph bars showing the percentage of samples analyzed in this study (dark grey bar) of the total number of samples tested for mpox per year at INRB (light grey bar). The absolute number of samples included in the study or received at the INRB each year is displayed in the dark grey area and light grey area, respectively. The numbers displayed in the blue areas (upper graph) or yellow areas (lower graph) correspond to the total number of positive samples analyzed each year by PCR or serology, respectively.

***Figure 42*:** Map of DRC Map showing the number of clinical mpox suspected samples tested by province and proportions of samples confirmed by PCR only (yellow), serology only (blue) and samples positive by serology and PCR (green).

***Figure 43*:** DRC map representing health zones in which outbreaks were not detected by PCR with serological evidence of mpox circulation (yellow) and health zones with mpox positive cases by PCR (yellow filled arrow head) or Serology (red asterisk fill),

***Figure 44*:** Masimanimba Health zone in the Kwilu Province and main events around the first mpox confirmed case.

***Tableau 15*:** Characteristics of patients and samples per serological results.

Author Contributions: Conceptualization, M.P., A.A., S.A.-M., **E.K.-L**. and E.D.; methodology, E.K.-L., L.B.K., E.N.-M., J.B., G.T., A.A.A., E.P.S. and A.A.; software, G.L.N., N.F.N. and E.L.L.; validation, **E.K.-L**., G.T., A.A.A., E.P.S., A.N.-N., P.M.-K. and A.A.; formal analysis, **E.K.-L**., G.L.N., A.N.-N., A.A. and M.P.; investigation, T.K.M., E.M.K. and P.M.-K.; resources, R.S.L., P.M.-K., A.A., J.-J.M.-T., E.D., M.P. and S.A.-M.; data curation, E.N.-M., G.L.N., E.P.S., T.K.M. and M.P.; writing—original draft preparation, M.P., **E.K.-L**. and A.A.; writing—review and editing, **E.K.-L**., G.T., A.A.A., G.L.-N., N.F.N., T.K.M., A.N.-N., E.M.K., R.S.L., P.M.-K., A.A., J.-J.M.-T., E.D., M.P. and S.A.-M.; visualization, **E.K.-L**., P.M.-K., A.A., M.P. and S.A.-M.; supervision, E.P.S., A.N.-N., R.S.L., P.M.-K., A.A., J.-J.M.-T., E.D., M.P. and S.A.-M.; project administration, R.S.L., P.M.-K., A.A., J.-J.M.-T., E.D., M.P. and S.A.-M.; funding acquisition, J.-J.M.-T., E.D., M.P. and S.A.-M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded in part by ANRS-MIE (projet PANAFPOX), Agence Française de Développement through the AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209, coordinated by ANRS Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut Pasteur and IRD) and and BIODIV-AFREID project (BiodivERsA ERA-Net COFUND programme, 2018-

2019 joint call for proposals (grant number ANR-19-EBI3-0004). Eddy Lusamaki received a PhD grant from the French Foreign Office. Field investigations in Masimanimba were conducted in the framework of the National surveillance lead by the PNLMPXFHV in collaboration with INRB, Central Veterian Laboratory.

Institutional Review Board Statement: Ethical review was waived for this study as samples were collected within the framework of the Monkeypox National surveillance program, but the authorization for further analysis and use data was obtained by the Ethical Committee of the Ecole de Santé Publique de l'Université de Kinshasa (ESP-UNIKIN, Number ESP/CE/05/2023).

Informed Consent Statement: As samples were collected within the framework of the Monkeypox National surveillance program, the informed consent process was exempted by the review from the ethical committee, but the authorization for further analysis and use data was obtained by the Ethical Committee of the Ecole de Santé Publique de l'Université de Kinshasa (ESP-UNIKIN, Number ESP/CE/05/2023).

Data Availability Statement: The novel sequence is available on Gisaid epipox platform with accession number EPI_ISL_14201642 (https://www.epicov.org/epi3/frontend#496aeb, accessed 6 July 2023). Serological data are available on request from the corresponding author and senior authors.

Acknowledgments: We are grateful to all provincial health divisions and especially Masimanimba health zone staff lead by Georges Mungenga, all health care workers involved in the mpox surveillance in DRC (Ministry of Health and partners), PNLMPX-FHV staff. We also thank Justin Masumu (INRB-VCL), Twabela Augustin (VCL), INRB Biorepository staff (Andre Citenga, Fanny Kisata, Fiston Cikaya, Sifa Kavira, Zadoc Yungwe, Michel Kenye), and staff from INRB epidemiology, virology Departments (Sophie Gabia, Elyse Muyamuna, Frida Nkawa, Chloé

Muswamba, Ola Rilia, Emmanuel Hasivirwe) and Microbiology service at CUK/UNIKIN (Raphael Lumembe, Gabriel Kabamba, Jean-Claude Makangara, Francisca Muyembe) assistance. We finally thank members from the AFROSCREEN Consortium (https://www.afroscreen.org/en/network/, accessed 6 July 2023) for their work and support on genomic surveillance in Africa.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Nolen, L.D.; Osadebe, L.; Katomba, J.; Likofata, J.; Mukadi, D.; Monroe, B.; Doty, J.; Hughes, C.M.; Kabamba, J.; Malekani, J.; et al. Extended Human-to-Human Transmission during a Monkeypox Outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1014–1021. https://doi.org/10.3201/eid2206.150579.
2. Sklenovská, N. Monkeypox Virus. In *Animal-Origin Viral Zoonoses*; Malik, Y.S., Singh, R.K., Dhama, K., Eds.; Livestock Diseases and Management; Springer: Singapore, 2020; pp. 39–68, ISBN 9789811526503.
3. WHO. WHO Recommends New Name for Monkeypox Disease. Available online: https://www.who.int/news/item/28-11-2022-who-recommends-new-name-for-monkeypox-disease (accessed on 6 July 2023).
4. Ladnyj, I.D.; Ziegler, P.; Kima, E. A Human Infection Caused by Monkeypox Virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *46*, 593–597.
5. Damon, I.K. Status of Human Monkeypox: Clinical Disease, Epidemiology and Research. *Vaccine* **2011**, *29*, D54–D59. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2011.04.014.
6. Doshi, R.H.; Guagliardo, S.A.J.; Doty, J.B.; Babeaux, A.D.; Matheny, A.; Burgado, J.; Townsend, M.B.; Morgan, C.N.; Satheshkumar, P.S.; Ndakala, N.; et al. Epidemiologic and Ecologic Investigations of Monkeypox, Likouala Department, Republic of the Congo, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 281–289. https://doi.org/10.3201/eid2502.181222.
7. WHO. Monkeypox. Available online: https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/monkeypox (accessed on 25 November 2022).
8. Bryer, J.; Freeman, E.E.; Rosenbach, M. Monkeypox Emerges on a Global Scale: A Historical Review and Dermatologic Primer. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2022**, *87*, 1069–1074. https://doi.org/10.1016/j.jaad.2022.07.007.
9. Bunge, E.M.; Hoet, B.; Chen, L.; Lienert, F.; Weidenthaler, H.; Baer, L.R.; Steffen, R. The Changing Epidemiology of Human Monkeypox—A Potential Threat? A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, *16*, e0010141. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010141.
10. Doty, J.; Malekani, J.; Kalemba, L.; Stanley, W.; Monroe, B.; Nakazawa, Y.; Mauldin, M.; Bakambana, T.; Liyandja Dja Liyandja, T.; Braden, Z.; et al. Assessing Monkeypox Virus Prevalence

in Small Mammals at the Human–Animal Interface in the Democratic Republic of the Congo. *Viruses* **2017**, *9*, 283. https://doi.org/10.3390/v9100283.

11. Antunes, F.; Cordeiro, R.; Virgolino, A. Monkeypox: From A Neglected Tropical Disease to a Public Health Threat. *Infect. Dis. Rep.* **2022**, *14*, 772–783. https://doi.org/10.3390/idr14050079.
12. CDC (DHCPP). 2022 Monkeypox and Orthopoxvirus Outbreak Global Map. Available online: https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html (accessed on 12 June 2022).
13. Gessain, A.; Nakoune, E.; Yazdanpanah, Y. Monkeypox. *N. Engl. J. Med.* **2022**, *387*, 1783–1793. https://doi.org/10.1056/NEJMra2208860.
14. WHO. Laboratory Testing for the Monkeypox Virus: Interim Guidance, 23 May 2022; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2022; p. 6.
15. WHO. Monkeypox: Experts Give Virus Variants New Names. Available online: https://www.who.int/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variants-new-names (accessed on 21 december 2022).
16. WHO. *Integrated Disease Surveillance and Response Technical Guidelines: Booklet Two: Sections 1, 2, and 3*, 3rd ed.; World Health Organization, Regional Office for Africa: Brazzaville, Congo, 2019; pp. xi, 119.
17. *Traité de virologie médicale*, 2nd ed.; Société Française de Microbiologie Société Française de Virologie: Paris, France, 2019; ISBN 978-2-87805-036-3.
18. Fine, P.E.M.; Jezek, Z.; Grab, B.; Dixon, H. The Transmission Potential of Monkeypox Virus in Human Populations. *Int. J. Epidemiol.* **1988**, *17*, 643–650. https://doi.org/10.1093/ije/17.3.643.
19. MacNeil, A.; Reynolds, M.G.; Carroll, D.S.; Karem, K.; Braden, Z.; Lash, R.; Moundeli, A.; Mombouli, J.-V.; Jumaan, A.O.; Schmid, D.S.; et al. Monkeypox or Varicella? Lessons from a Rash Outbreak Investigation in the Republic of the Congo. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *80*, 503–507.
20. Marin, M.; Leung, J.; Gershon, A.A. Transmission of Vaccine-Strain Varicella-Zoster Virus: A Systematic Review. *Pediatrics* **2019**, *144*, e20191305. https://doi.org/10.1542/peds.2019-1305.
21. Meyer, H.; Perrichot, M.; Stemmler, M.; Emmerich, P.; Schmitz, H.; Varaine, F.; Shungu, R.; Tshioko, F.; Formenty, P. Outbreaks of Disease Suspected of Being Due to Human Monkeypox Virus Infection in the Democratic Republic of Congo in 2001. *J. Clin. Microbiol.* **2002**, *40*, 2919–2921. https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2919-2921.2002.
22. Li, Y.; Olson, V.A.; Laue, T.; Laker, M.T.; Damon, I.K. Detection of Monkeypox Virus with Real-Time PCR Assays. *J. Clin. Virol.* **2006**, *36*, 194–203. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.012.
23. Dubois, M.E.; Hammarlund, E.; Slifka, M.K. Optimization of Peptide-Based ELISA for Serological Diagnostics: A Retrospective Study of Human Monkeypox Infection. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 400–409. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0779.
24. Kulesh, D.A.; Baker, R.O.; Loveless, B.M.; Norwood, D.; Zwiers, S.H.; Mucker, E.; Hartmann, C.; Herrera, R.; Miller, D.; Christensen, D.; et al. Smallpox and Pan-Orthopox Virus Detection by Real-Time 3'-Minor Groove Binder TaqMan Assays on the Roche LightCycler and the Cepheid Smart Cycler Platforms. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 601–609. https://doi.org/10.1128/JCM.42.2.601-609.2004.
25. Twist Bioscience. Twist Pan-Viral Panel Confident Identification of over 1000 Viral Human Pathogens from a Single Sample; 2021. Available online: https://www.twistbioscience.com/sites/default/files/resources/2021-12/ProductSheet_NGS_PanViralPanel_30NOV21_Rev2.0.pdf). (accessed on 14 june 2022.

26. Kinganda-Lusamaki, E.; Black, A.; Mukadi, D.B.; Hadfield, J.; Mbala-Kingebeni, P.; Pratt, C.B.; Aziza, A.; Diagne, M.M.; White, B.; Bisento, N.; et al. Integration of Genomic Sequencing into the Response to the Ebola Virus Outbreak in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *Nat. Med.* **2021**, *27*, 710–716. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01302-z.
27. Kumar, S.; Stecher, G.; Li, M.; Knyaz, C.; Tamura, K. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **2018**, *35*, 1547–1549. https://doi.org/10.1093/molbev/msy096.
28. Guindon, S.; Dufayard, J.-F.; Lefort, V.; Anisimova, M.; Hordijk, W.; Gascuel, O. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* **2010**, *59*, 307–321. https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010.
29. Ayouba, A.; Thaurignac, G.; Morquin, D.; Tuaillon, E.; Raulino, R.; Nkuba, A.; Lacroix, A.; Vidal, N.; Foulongne, V.; Le Moing, V.; et al. Multiplex Detection and Dynamics of IgG Antibodies to SARS-CoV2 and the Highly Pathogenic Human Coronaviruses SARS-CoV and MERS-CoV. *J. Clin. Virol.* **2020**, *129*, 104521. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2020.104521.
30. HCSP. Conduite à Tenir Autour d'un Cas Suspect, Probable Ou Confirmé d'infection à Monkeypox Virus; Haut Conseil de la Santé Publique: Paris, France, 2022
31. Berthet, N. ; Descorps-Declère, S. ; Besombes, C. ; Curaudeau, M. ; Nkili Meyong , A.A. ; Selekon, B, ; Labouba, I,; Gonofio, E.C.; Ouilibona, R.S., et al. Genomic history of human monkey pox infections in the Central African Republic between 2001 and 2018. *Sci Rep*. **2021**, 1,13085. Https://doi: 10.1038/s41598-021-92315-8.
32. Besombes, C.; Gonofio, E.; Konamna, X.; Selekon, B.; Gessain, A.; Berthet, N.; Manuguerra, J.-C.; Fontanet, A.; Nakouné, E. Intrafamily Transmission of Monkeypox Virus, Central African Republic, 2018. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1602–1604. https://doi.org/10.3201/eid2508.190112.
33. Mande, G.; Akonda, I.; De Weggheleire, A.; Brosius, I.; Liesenborghs, L.; Bottieau, E.; Ross, N.; Gembu, G.-C.; Colebunders, R.; Verheyen, E.; et al. Enhanced Surveillance of Monkeypox in Bas-Uélé, Democratic Republic of Congo: The Limitations of Symptom-Based Case Definitions. *Int. J. Infect. Dis.* **2022**, *122*, 647–655. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2022.06.060.

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Supplementary materials

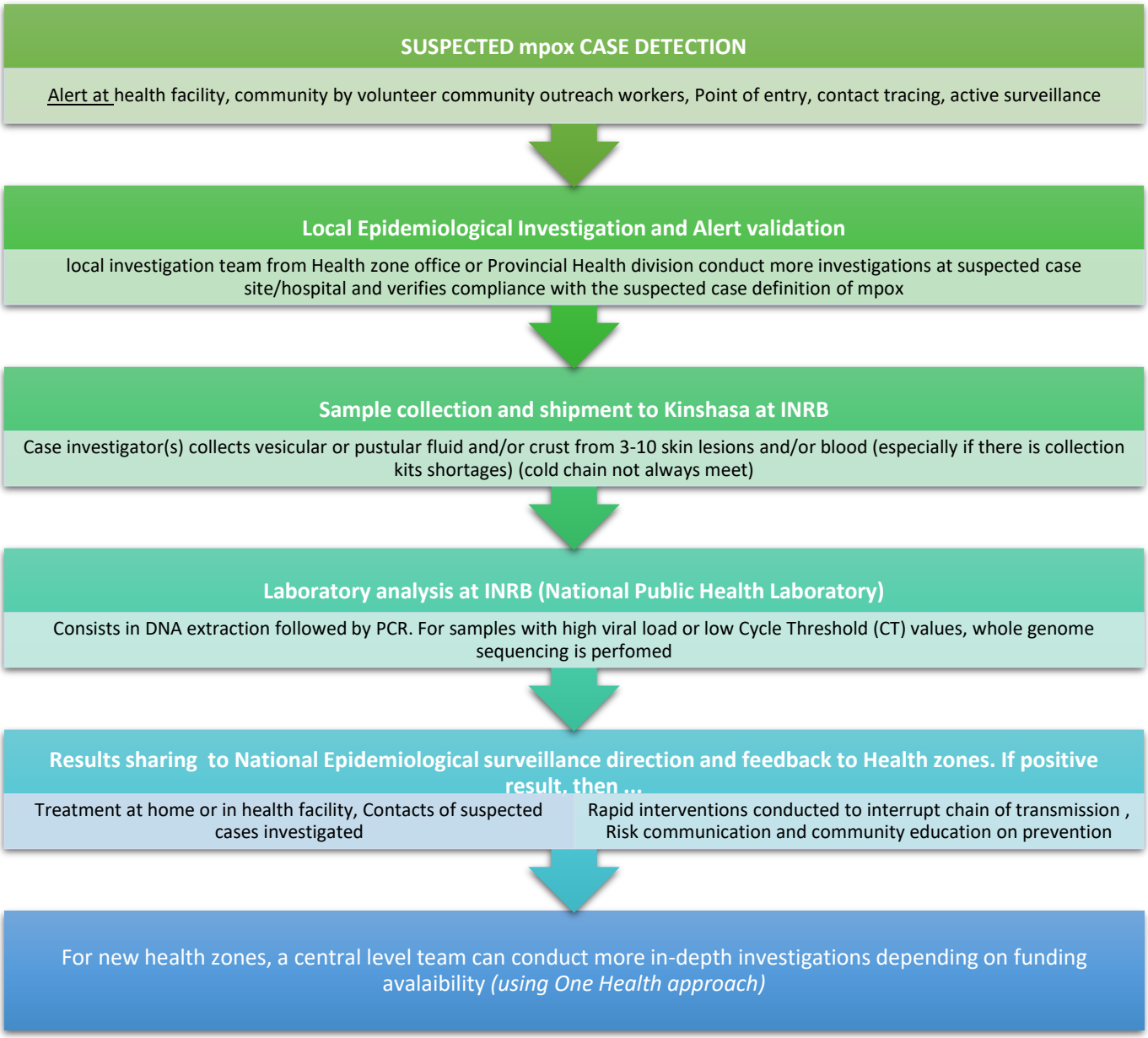


Figure 38 *: :workflow of the mpox Surveillance Algorithm in DRC*

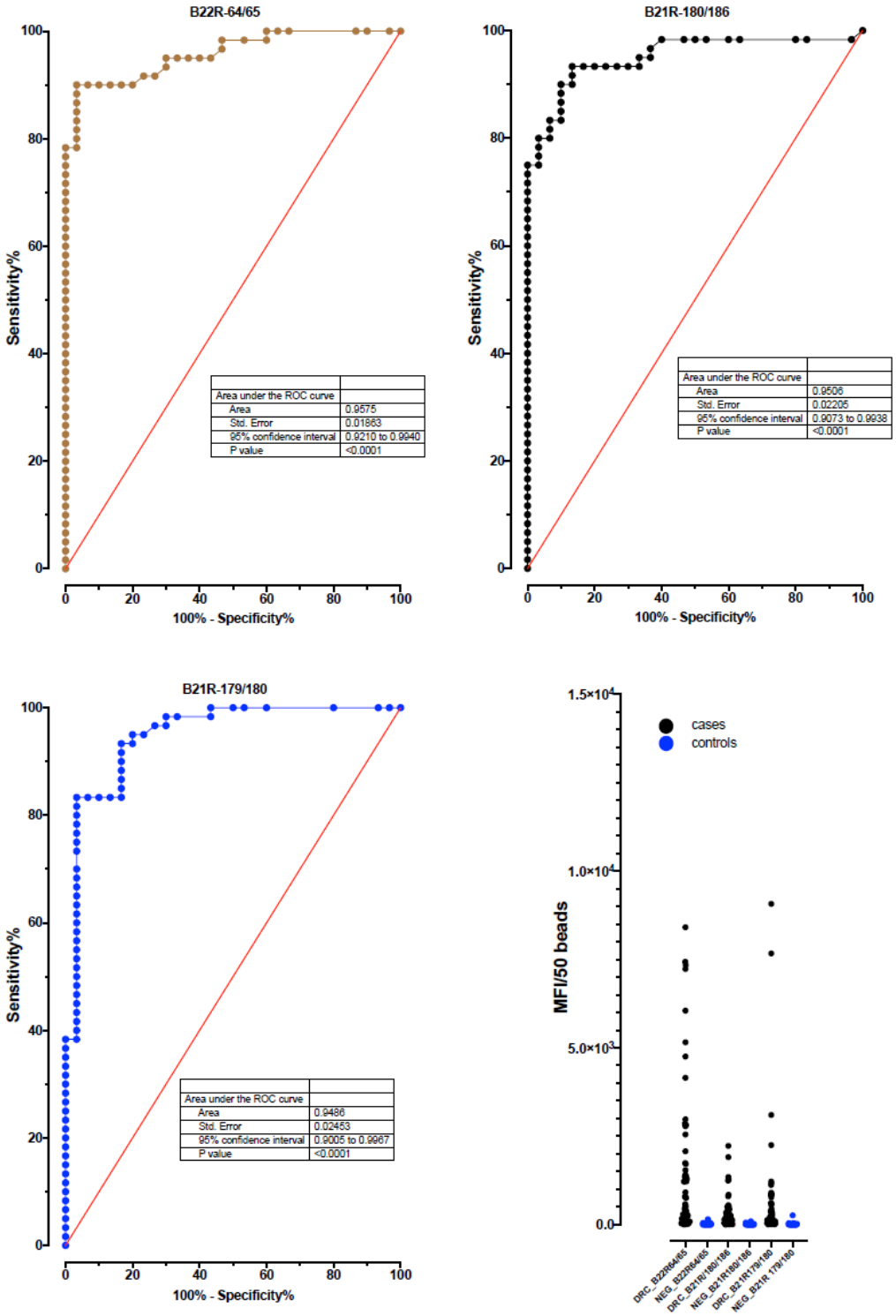


Figure 39 *:Areas Under Curve (AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) curves per peptid summarizing the performances of the assay for each peptid.*

Areas are respectively 0.9575, 0.9506 and 0.9486 for B22R.64/65 (A), B21R-180/186(B) and B21R-179/180(C). These peptids were kept for the multiplex serological assay. (D) The dotplot highlights Median Fluorecence Intensity (MFI)values per 50 beads for the panel of 90 blood samples including 60 mpox cases (black dots) collected in the Democratic Republic of the Congo (DRC) and 30 control samples (blue dots) collected in France born after 1980). MFI are presented for each peptide and stratified by cases and controls samples. The ROC analysis was performed with GraphPad Prism 8.4.3 for MacOS.

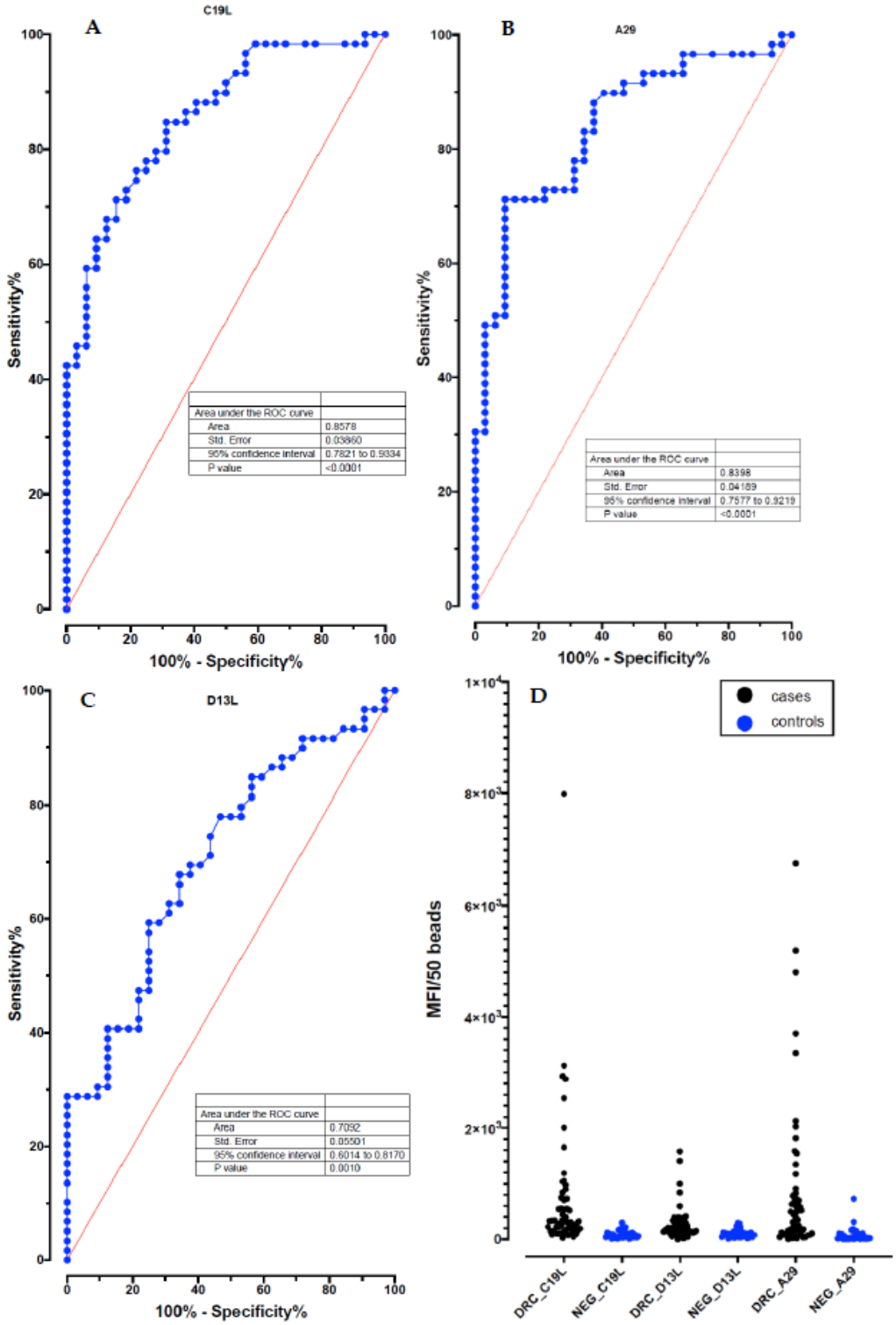


Figure 40 : *Areas Under curve(AUC) of the Receiver Operating Characteristics (ROC) curves per protein summarizing their performances.*

AUC are 0.8578 for C19L(A), 0.8398 for A29(B), 0.7092 for D13L(C). Dots plots (D) summarize MFI/50 beads for the panel of 90 blood samples including 60 mpox cases (black dots) collected in DRC and 30 control samples (blue dots) collected in France born after 1980. MFI are presented for each protein and stratified by cases and controls samples. The ROC analysis was performed with GraphPad Prism 8.4.3 for MacOS.

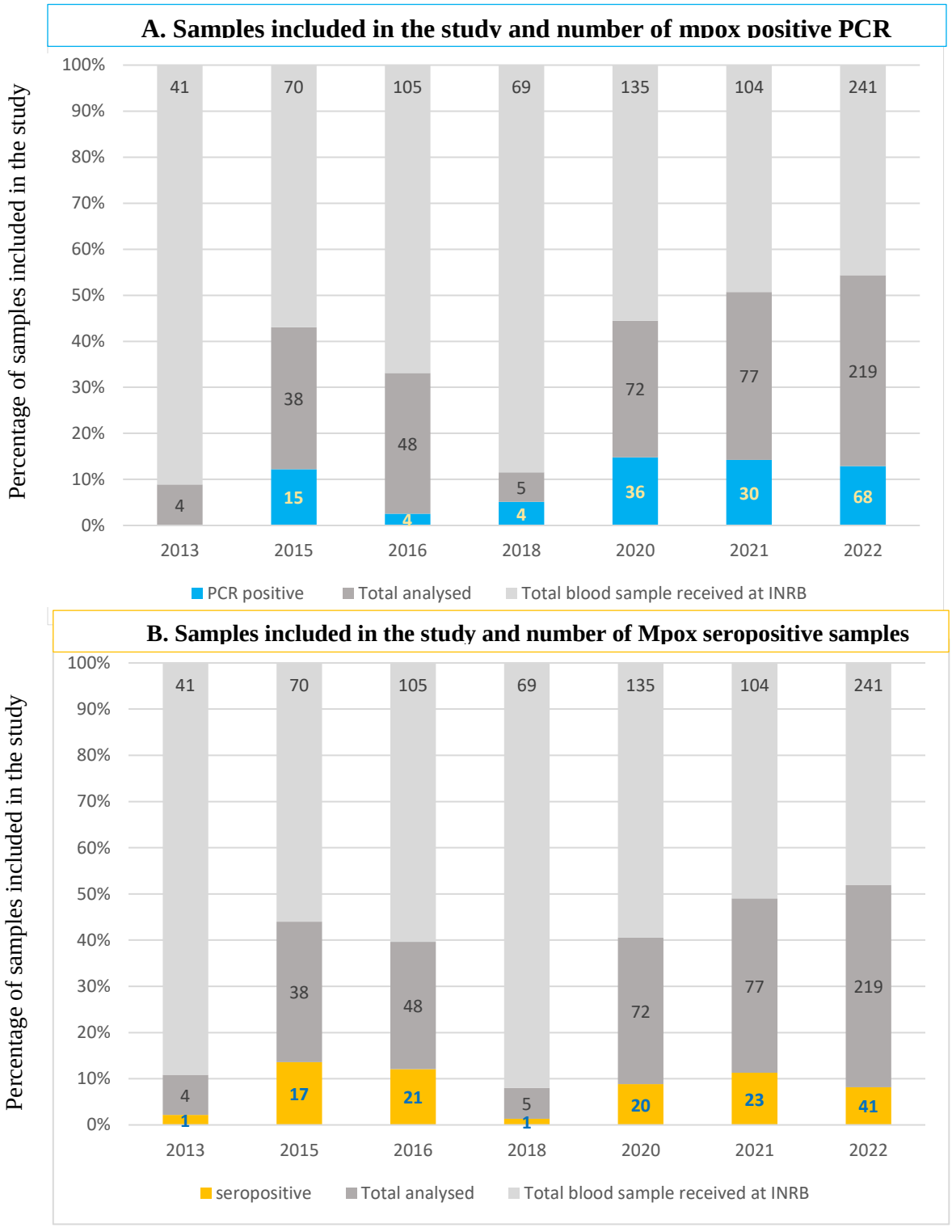


Figure 41 : *Graph bars showing the percentage of samples analyzed in this study (dark grey bar) of the total number of samples tested for mpox per year at INRB (light grey bar). The absolute number of samples included in the study or received at the INRB each year is displayed in the dark grey area and light grey area, respectively. The numbers displayed in the blue areas (upper graph) or yellow areas (lower graph) correspond to the total number of positive samples analyzed each year by PCR or serology, respectively*

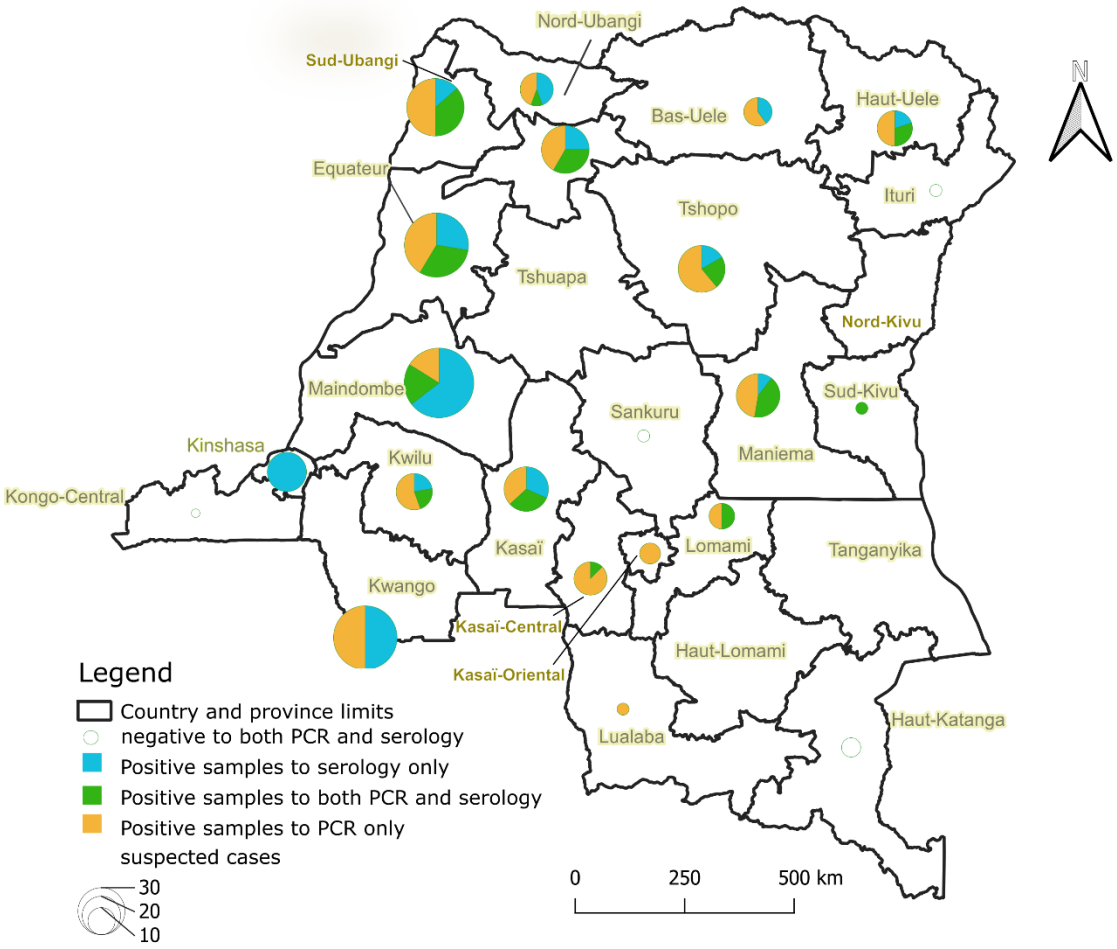


Figure 42 : *Map of DRC Map showing the number of clinical mpox suspected samples tested by province and proportions of samples confirmed by PCR only (yellow), serology only (blue) and samples positive by serology and PCR (green)*

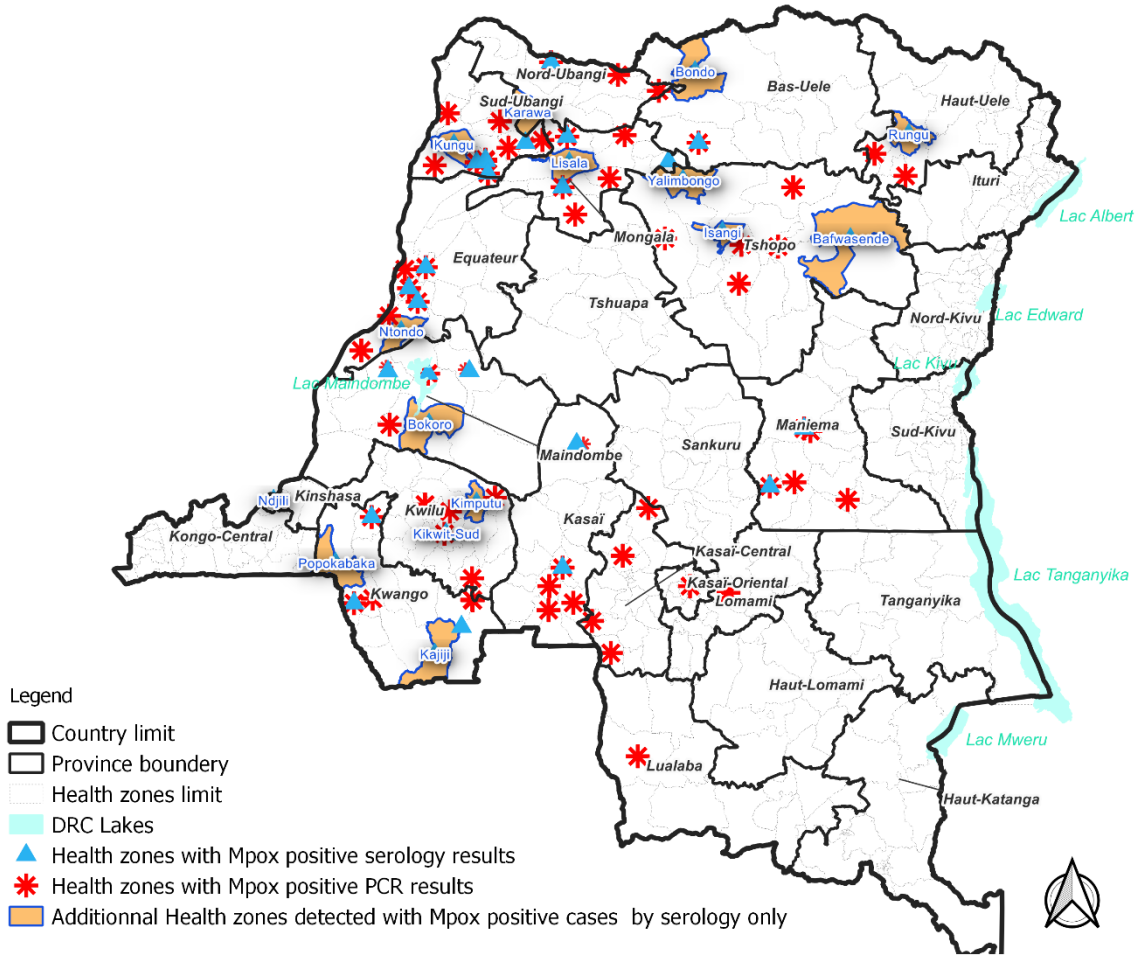


Figure 43 *: DRC map representing health zones in which outbreaks were not detected by PCR with serology evidence of mpox circulation(yellow) and health zones where originated mpox positive cases by PCR(blue triangle) or Serology (red asterisk fill)*

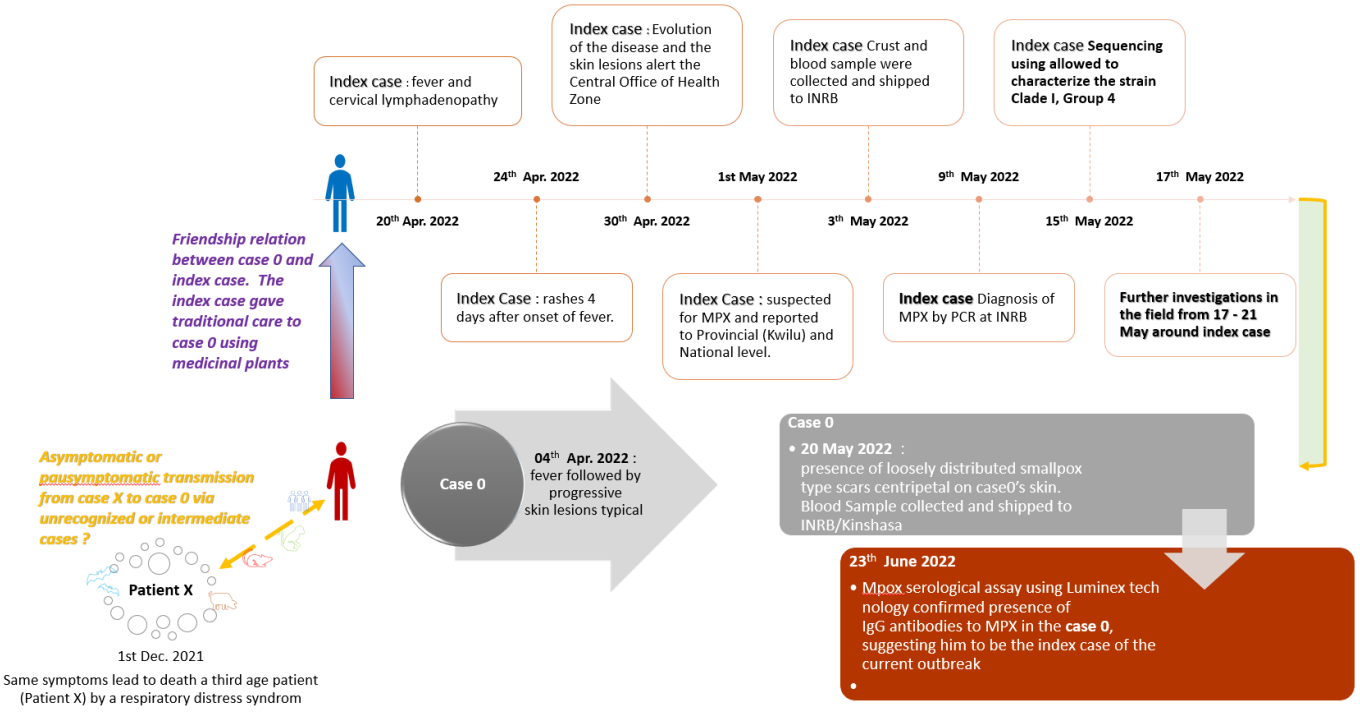


Figure 44: *Masimanimba Health zone in the Kwilu Province and main events around the first mpox confirmed case*

Tableau 15 *: Characteristics of patients and samples per serological results*

Variable	mpox serology positive N=124	mpox serology negative N=339	Total N=463	P
Age[1], years				
median (IQR[#])	14 (7-25)	12 (5-25)	13 (5-25)	0.3578
Range	<1-60 years	<1-76 years	<1-76 years	
Sex[2],				0.461
Female	55 (44.4%)	159 (46.9%)	214 (46.2%)	
Male	66 (53.2%)	163 (48.1%)	229 (49.5%)	
Missing	3 (2.4%)	17 (5.0%)	20 (4.3%)	
Delay symptoms and sampling[3]				
Days (IQR)	8 (5 – 11)	6 (4-9)	6 (4-10)	0.0016
Range	0–52 days	0 – 95 days	0 – 95 days	
Delay sample shipment[4]				
Days (IQR)	12 (8-18)	13 (8-21)	12 (8-20)	0.590
Range	3 – 66 days	0 – 57 days	0 – 66 days	

[1] Age is documented for 440 patients (120 mpox seropositive and 320 negative)
[2] Sex is documented for 443 patients (121 mpox seropositive and 322 negative), reported proportions in the manuscript don't take in account the missing data.
[3] Delay symptoms and sampling is documented for 378 patients (104 mpox seropositive and 274 seronegative)
[4] Delay sample shipment is documented for 431 patients (121 mpox seropositive and 310 seronegative)
[#]IQR; interquartile range

Chapitre 2 : Cas de mpox clade I, associés à des contacts sexuels dans la province de Kwango, République démocratique du Congo

a. Résumé :

Contexte :

Les infections du MPXV clade I circulant Afrique Centrale et en RDC, sont associées à une plus grande gravité de la maladie, avec des éruptions cutanées généralisées et plus prononcées. Historiquement elles avaient démontré une plus grande transmissibilité par rapport au clade II avant l'émergence mondiale du clade IIb, responsable de l'épidémie globale ayant conduit à la déclaration d'une urgence de santé publique de portée internationale par l'Organisation mondiale de la santé.

Au cours de l'épidémie de 2022, >90 % des infections étaient liées à une transmission secondaire, principalement par contact sexuel entre hommes ayant des rapports sexuels avec d'autres hommes (HSH).

Bien que les infections liées au clade I puissent survenir par contacts étroits, y compris par des vecteurs passifs, la transmission par contact sexuel n'a jamais été documentée auparavant. Cependant, compte tenu de l'homologie de séquence élevée entre les clades du MPXV et de la gravité accrue de la maladie associée au clade I, il est essentiel de déterminer si des infections liées au contact sexuel se produisent dans les deux clades du MPXV.

Etude et conclusion :

Dans cette étude nous documentons les premiers cas de mpox clade I associée à un contact sexuel, suggérant un rôle plus large pour cette voie de transmission du MPXV en République démocratique du Congo, dans la province de Kwango durant le premier trimestre 2023. L'enquête

sur les cas a révélé cinq infections confirmées par RT-PCR et le séquençage du génome suggère qu'elles appartenaient à la même chaîne de transmission. Cela démontre que la transmission du MPXV par contact sexuel s'étend au-delà du clade IIb.

b. Dispatch, Emerging Infectious Diseases, 2024

Clade I-associated mpox cases associated with sexual contact in Kwango Province, Democratic Republic of the Congo

Emile M Kibungu[1], Emmanuel H. Vakaniaki[2], **Eddy Kinganda-Lusamaki[2,3,4]**, Thierry Kalonji-Mukendi[1], Elisabeth Pukuta[2], Nicole A. Hoff[5], Isaac I. Bogoch[6], Muge Cevik[7], Gregg S. Gonsalves[8,9], Lisa E. Hensley[10], Nicola Low[11], Souradet Y. Shaw[12], Erin Schillberg[12], Mikayla Hunter[13], Lygie Lunyanga[2], Sylvie Linsuke[2], Joule Madinga[2], Martine Peeters[4], Jean-Claude Makangara[2,3], Steve Ahuka-Mundeke[2,3], Jean-Jacques Muyembe[2,3], Anne W. Rimoin[5*#], Jason Kindrachuk[13,14*#], Placide Mbala-Kingebeni[2,3*#], Robert S. Lushima[1*#] and the International mpox Research Consortium.

Affiliations:

[1] Monkeypox and viral hemorrhagic fever control program, Ministry of Public Health, Democratic Republic of the Congo

[2] Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[3] Service de Microbiologie, Departement de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa (CUK), Université de Kinshasa (UNIKIN), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[4] TransVIHMI (Recherches Translationnelles sur le VIH et les Maladies Infectieuses endémiques et émergentes), University of Montpellier (UM), French National Research Institute for Sustainable Development (IRD), INSERM, Montpellier, France

[5] Department of Epidemiology, University of California, Los Angeles, USA

[6] Division of Infectious Diseases, Toronto General Hospital, University Health Network, Toronto, Ontario, Canada

[7] University of St Andrews, School of Medicine, Division of Infection and Global Health Research. Scotland, UK

[8] Public Health Modeling Unit, Yale School of Public Health, New Haven, USA

[9] Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven, USA.

[10] Zoonotic and Emerging Disease Research Unit, National Bio and Agro-Defense Facility USDA Agricultural Research Service (ARS), Manhattan KS, USA

[11] Institute of Social and Preventive Medicine, University of Bern, Bern, CH-3012, Switzerland

[12] Institute for Global Public Health (IGPH), University of Manitoba, Winnipeg, Canada

[13] Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

[14] Manitoba Centre for Proteomics and Systems Biology, Department of Internal Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Canada

*Authors contributed equally

[#]Corresponding authors: Anne W. Rimoin (arimoin@ucla.edu), Jason Kindrachuk (Jason.Kindrachuk@umanitoba.ca), Placide Mbala-Kingebeni (mbalaplacide@gmail.com), Robert S. Lushima (robert_shongo@yahoo.fr)

Emerging Infectious Diseases, www.cdc.gov/eid, Vol. 30, No. 1, January 2024

Original Publication Date: November 28, 2023

DOI: https://doi.org/10.3201/eid3001.231164

Abstract

We report a cluster of clade I monkeypox virus infections linked to sexual contact in the Democratic Republic of the Congo. Case investigations resulted in 5 reverse transcription PCR–confirmed infections; genome sequencing suggest they belonged to the same transmission chain. This finding demonstrates that mpox transmission through sexual contact extends beyond clade IIb.

1. Introduction :

Human mpox, caused by monkeypox virus (MPXV), is an emerging zoonotic viral disease first identified in the Democratic Republic of the Congo (DRC) (1). MPXV is endemic in multiple regions of Central and West Africa (2,3). The virus is subclassified into 2 clades: clade I, formerly Congo Basin (Central Africa) clade, and clade II, formerly West African clade. Clade II is further subdivided into 2 subclades, IIa and IIb; subclade IIb was responsible for the 2022 global epidemic (4; *https://www.who.int/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variants-new-names*). Clade I infections are associated with greater disease severity and more pronounced rash and had demonstrated increased human-to-human transmission compared with clade II before the global emergence of clade IIb (5). Those difference are likely influenced by factors such as clade-specific genomic differences in host response modifier proteins, exposure type and dose, and vaccination status (*https://www.who.int/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variants-new-names*). Travel-related and animal importation–related cases have been reported in nonendemic regions (6). In 2022, rapid spread of MPXV to new geographic regions resulted in >86,000 confirmed infections in nonendemic regions and declaration of a public health emergency of international concern by the World Health Organization (7).

During the 2022 epidemic, >90% of infections were linked to secondary transmission, mainly through sexual contact among men who have sex with men (MSM) (8–11). The disease appeared to affect younger populations in endemic regions because of increased contact with zoonotic sources; the average age at infection was <25 years, and the case-fatality rate was higher among children. In nonendemic regions, however, the average age at infection was >30 years, and infection occurred predominantly in men (>95%) who self-identify as MSM (>80%) (10,11). Clinical characteristics during the 2022 epidemic included fever, physical asthenia or lethargy, and lymphadenopathy with high concentrations of papules, pustules, and vesicles on the skin of the genital and perianal organs. Rectal pain, bleeding, and purulent bloody stools were also common (12,13). A recent case series assessing data from clade IIb infections in persons living with HIV demonstrated that increased disease severity and fatal disease were also linked to CD4 counts (11). Although clade I–related infections can occur through close contacts, including through fomites, transmission through sexual contact has not been reported previously (14,15). However, given the high sequence homology across MPXV clades and the increased disease severity associated with clade I, clarifying whether sexual contact–related infections occur across MPXV clades is critical. We report a confirmed cluster of clade I–associated mpox associated with sexual contact.

2. The Study :

An alert was issued by the Kwango Provincial Health Division, DRC, after reports from civil society organizations in March 2023 regarding a resident with skin rashes and pruritus. Teams from the National Programme for the Control of Monkeypox and Viral Hemorrhagic Fevers and the Institut National de Recherche Biomédicale, accompanied by members of the senior team from the Kwango Provincial Health Division, the senior team from the Kenge Health Zone, the provincial team from the National Programme for the Control of HIV, and the provincial civil

society representative, conducted an investigation. During the investigation, the national and provincial health teams instituted training for local healthcare clinics to raise awareness of the clinical signs and mode of transmission for mpox and HIV, including sexual contact in MSM.

A man from DRC in his late 20s (case-patient 1) reported having 2 sexual encounters with a man (suspected primary case-patient) in Europe 1 week before returning to DRC. The suspected primary case-patient frequently visited DRC. Case-patient 1 reported that the primary case-patient had general clinical symptoms including genital pruritus, joint pain, and physical asthenia. Nine days after contact, case-patient 1 began experiencing pruritus, vesicular skin eruptions, and genital and perianal ulcerations. He contacted a local civil organization, which initiated a preliminary investigation and alerted the National Programme for the Control of Monkeypox and Viral Hemorrhagic Fevers. He had penile lesions and penile papules (***Figure 45***); localized redness on the lips and in the oral buccal mucosa were also noted, and he had 1 lesion on the middle finger of the right hand. Blood samples, oropharyngeal swab samples, swab samples from rectal and genital lesions, and swab samples from vesicles on the skin of the penis and pubis were taken.



Figure 45 *: Penile lesions or papules associated with clade I MPXV infection.*

Presentation of penile lesions or papules associated with Case 1 in this study.

Case-patient 1 reported having sexual contact with 9 partners (6 men and 3 women) after arriving in DRC. A prescreening of those contacts identified suspected mpox in 3 sexual contacts (2 men and 1 woman, 30–35 years of age) who had fever and lesions in the genital and perianal region. Blood samples and oropharyngeal swab samples were taken from all 9 partners; additional rectal or vaginal swab samples were taken from the men and woman suspected to be secondary case-patients. Investigation of all sexual contacts yielded an additional 36 sexual contacts. Samples from case-patient 1 and 3 suspected secondary case-patients were confirmed to be MPXV-positive by PCR using samples from vesicles, crusts, or blood. One of the 36 sexual contacts was also PCR-positive for MPXV. We performed viral genome sequencing on PCR-positive samples; phylogenetic analysis showed tight clustering among 3 positive samples, suggesting they belong to the same chain of transmission. The closest related sequence beyond this cluster was a 2022 clade I MPXV sequence from DRC (***Figure 46***).

We treated the 5 PCR-positive case-patients with supportive care and pain control on an outpatient basis. We performed a follow-up investigation to further investigate transmission chains and identify additional contacts; follow-up was conducted for each contact through individual case report forms. We monitored a total of 120 contacts over 21 days. The contacts were categorized into 3 groups: sexual contacts (n = 5), family members (n = 45), and persons associated with close nonsexual contact (n = 70). None of the persons monitored during the 21 days experienced clinical signs.

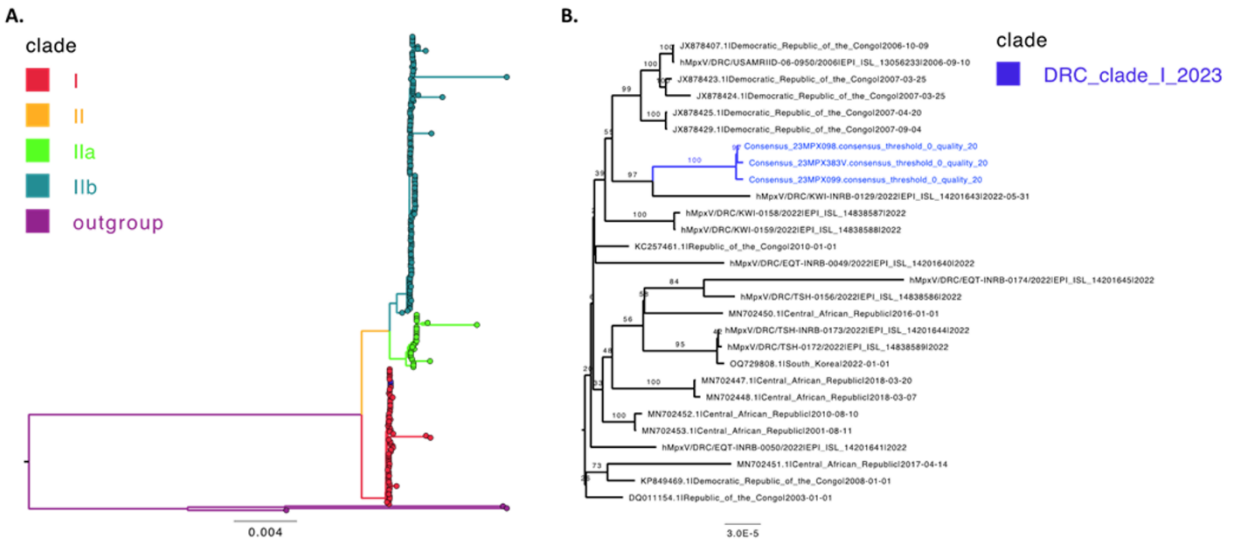


Figure 46 *: Phylogenetic analysis of MPXV sequences from the mpox cases described in Kwango Province, DRC.*

A) MPXV global phylogeny showing that the Kwango Province outbreak cluster belongs to clade I MPXV; B) Phylogenetic analysis of MPXV genome sequences from the reported cases and clade I MPXV sequences from Central Africa. Scale bar is in substitutions per site; posterior support values are shown at branch points. DNA was extracted at INRB using a Qiagen DNA Mini kit from blood samples and subsequently screened for MPXV with an Orthopoxvirus-specific real-time PCR assay. Whole genome sequencing was attempted on samples from the index case by Next Generation Sequencing (NGS). The library preparation was performed using Illumina DNA Prep with Enrichment and the libraries were enriched for MPXV using biotinylated custom probes synthesized by Twist Biosciences. Note that 23MPX098 (or 23MPX0245V) and 23MPX099 (or 23MPX0245C) are vesicle and crust from Case 1, respectively

3. Conclusions :

This study describes a cluster of clade I MPXV-associated infections related to sexual contact in DRC, which has previously only been described for clade II MPXV. Of note, MPXV transmission through sexual contact is not exclusive to clade IIb and can occur during heterosexual and same-sex contact. This study demonstrates that MPXV infections can occur through additional exposure routes in MPXV-endemic regions and that the current understanding of mpox burden in clade I–endemic regions is based on classical transmission exclusively; recognizing those factors is critical. Our findings highlight additional considerations for MPXV circulation and transmission

containment in endemic areas. Thus, increased MPXV surveillance, diagnostic testing access, and equitable access to both vaccines and therapeutics for persons at increased risk for infection are needed for ongoing mitigation strategies. Given the increased disease severity associated with clade I MPXV, the potential implications of sexual transmission on broadening geographic distribution for MPXV across clades I and II must be considered. In addition, long-term immunity to mpox inferred by vaccination is unknown, including the role of mucosal immunity against clade I MPXV infections. This report highlights multiple critical global health considerations that must be addressed. Ongoing support for community engagement and educational efforts focusing on mpox recognition and reporting, including within sexual networks and for specific groups who might suffer from lack of care or experience stigma when seeking care.

This report highlights historically unrecognized MPXV transmission through sexual contact and indicate the need for increased routine screening in sexual health clinics in mpox-endemic and nonendemic regions. Population movement and previously unreported routes of transmission could exacerbate global distribution of MPXV, which could be compounded by the lack of routine diagnostic testing or inadequate access to rapid point-of-care testing. In view of this investigation, epidemiologic and genomic surveillance for MPXV, in both endemic and nonendemic regions, should be improved and strengthened.

Dr. Kibungu is a senior expert epidemiologist with a primary research interest in emerging infectious diseases, including response and containment efforts from the Ministry of Public Health, Hygiene and Prevention, Democratic Republic of the Congo. His primary research interests are emerging infectious diseases, including response and containment efforts.

Acknowledgment

We are grateful to the residents of Kwango province, DRC, and to the Ministry of Health, DRC, for their cooperation and assistance during this outbreak investigation. We would also like to thank Sophie Gabia, Franc Kasongo, Jackie Muteba and MoH, who assisted in field investigations, as well as Eric Delaporte, Ahidjo Ayouba and all members from the AFROSCREEN Consortium (https://www.afroscreen.org/en/network/) for their work and support on genomic surveillance in DRC. This work was supported by the International mpox Research Consortium (IMReC) through funding from the Canadian Institutes of Health Research and International Development Research Centre (Grant No. 202209MRR-489062-MPX-CDAA-168421), and Department of Defense, Defense Threat Reduction Agency, Monkeypox Threat Reduction Network (MPX-TRN) grant #HDTRA1-21-1-0040 and United States Department of Agriculture Non-Assistance Cooperative Agreement #20230048. Additional laboratory support was provided by Agence Française de Développement through the PANAFPOX and AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209), coordinated by ANRS Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut Pasteur and IRD. EL received a PhD grant from the French Foreign Office. The content of the information does not necessarily reflect the position of the policy of the US Federal Government, and no official endorsement should be inferred.

References

1. Ladnyj ID, Ziegler P, Kima E. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. Bull World Health Organ. 1972;46(5):593-7.

2. Breman JG, Kalisa R, Steniowski MV, Zanotto E, Gromyko AI, Arita I. Human monkeypox, 1970-79. Bull World Health Organ. 1980;58(2):165-82.

3. Durski KN, McCollum MA, Nakazawa Y, Petersen BW, Reynolds MG, Briand S, et al. . Emergence of Monkeypox - West and Central Africa, 1970-2017. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018;67:306-10.

4. WHO. Monkeypox: experts give virus variants new names. 12 August 2022.

5. Ulaeto D, Agafonov A, Burchfield J, Carter L, Happi C, Jakob R, et al. New nomenclature for mpox (monkeypox) and monkeypox virus clades. Lancet Infect Dis. 2023 Mar;23(3):273-5.

6. McCollum AM, Damon IK. Human monkeypox. Clin Infect Dis. 2014 Jan;58(2):260-7.

7. Reynolds MG, Yorita KL, Kuehnert MJ, Davidson WB, Huhn GD, Holman RC, et al. Clinical manifestations of human monkeypox influenced by route of infection. J Infect Dis. 2006 Sep 15;194(6):773-80.

8. Minhaj FS, Ogale YP, Whitehill F, Schultz J, Foote M, Davidson W, et al. Monkeypox Outbreak — Nine States, May 2022. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2022;71:764–9.

9. Thornhill JP, Palich R, Ghosn J, Walmsley S, Moschese D, Cortes CP, et al. Human monkeypox virus infection in women and non-binary individuals during the 2022 outbreaks: a global case series. Lancet. 2022 Dec 3;400(10367):1953-65.

10. Thornhill JP, Barkati S, Walmsley S, Rockstroh J, Antinori A, Harrison LB, et al. Monkeypox Virus Infection in Humans across 16 Countries - April-June 2022. N Engl J Med. 2022 Aug 25;387(8):679-91.

11. WHO. mpox (monkeypox) outbreak 2022 - Global. World Health Organization; 2023.

12. Girometti N, Byrne R, Bracchi M, Heskin J, McOwan A, Tittle V, et al. Demographic and clinical characteristics of confirmed human monkeypox virus cases in individuals attending a sexual health centre in London, UK: an observational analysis. Lancet Infect Dis. 2022 Sep;22(9):1321-8.

13. Philpott D, Hughes CM, Alroy KA, Kerins JL, Pavlick J, Asbel L, et al. . Epidemiologic and Clinical Characteristics of Monkeypox Cases — United States, May 17–July 22, 2022. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2022;71:1018.

14. Van Dijck C, Hoff NA, Mbala-Kingebeni P, Low N, Cevik M, Rimoin AW, et al. Emergence of mpox in the post-smallpox era - a narrative review on mpox epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2023 Aug 11.

15. Titanji BK, Tegomoh B, Nematollahi S, Konomos M, Kulkarni PA. Monkeypox: A Contemporary Review for Healthcare Professionals. Open Forum Infect Dis. 2022 Jul;9(7):ofac310.

Chapitre 3 : Co-circulation du mpox et du swinepox dans la province de Tshuapa

3.1.Résumé :

Contexte :

Des recherches précédentes menées dans la province de Tshuapa, en RDC, ont montré une augmentation de l'incidence des cas de MPXV par rapport aux études menées entre 1981 et 1986 dans des zones géographiques similaires, suggérant une augmentation des taux de propagation du MPXV du clade I dans les populations humaines. Face aux difficultés logistiques, la confirmation des cas suspects en RDC est entravée, notamment la collecte d'échantillons et la disponibilité de laboratoires de diagnostic dans les régions reculées endémiques et prévalentes, l'intégration de l'approche « Une seule santé » pourrait être une stratégie d'enquête plus informative. En plus, les efforts jusqu'alors concentrés sur la faune sauvage et les petits animaux, ont récemment été étendus aux animaux domestiques et d'élévage.

Investigations et conclusion

Dans le cadre de cette approche, les enquêtes ont été mené à la suite de décès de porcs qui présentaient des éruptions cutanées en septembre 2022, et ont permis d'identifier deux porcs présentant des lésions semblables à celles de la variole dans une seule ferme, décédés dans l'espace d'une semaine, et dont l'un a testé positif pour le SWPV. Les investigations supplémentaires ont déterminé que des contacts à haut risque entre les porcs malades et les enfants du fermier qui ont développé des symptômes 12 jours après l'apparition de la maladie chez le premier porcet ont été testé positifs au MPXV. Ce rapport soulève des inquiétudes quant à la transmission interespèces et aux interactions virales potentielles, de type recombinaison et souligne l'importance d'une surveillance intégrée.

3.2.Dispatch, Emerging Infectious Diseases, 2024

Evidence of co-circulating poxviruses in the Democratic Republic of the Congo: mpox and Swinepox

Thierry Kalonji[1], Emile Malembi[1], Jean Paul Matela[2], Toutou Likafi [2], **Eddy Kinganda-Lusamaki**[3,9,13], Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki[3], Nicole A. Hoff[4], Amuri Aziza[3], Francisca Muyembe[3,13], Joelle Kabamba[5], Tine Cooreman[6], Béatrice Nguete[7], Danae Witte[8], Ahidjo Ayouba[9], Nicolas Fernandez[9], Stijn Roge[10], Martine Peeters[9], Sydney Merritt[4], Steve Ahuka-Mundeke[3,13], Eric Delaporte[9], Elisabeth Pukuta[3], Joachim Mariën[6], Eugene Bangwen[11], Steven Lakin[12], Charles Lewis[12], Jeffrey B. Doty[5],Laurens Liesenborghs[11], Lisa E. Hensley[12], Andrea McCollum[5], Anne W. Rimoin[4], Jean Jacques Muyembe-Tamfum[3,13], Robert Shongo[1], Didine Kaba[7], Placide Mbala Kingebeni[3,13]

Affiliations:

1. Program National Lutte Contre MPX-VHF, Kinshasa, DRC,
2. Province Health Division – Tshuapa,
3. Institute National de Recherche Biomedical, Kinshasa, DRC,
4. UCLA Fielding School of Public Health, Los Angeles, USA
5. Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA,
6. University of Antwerp, University of Antwerp, Evolutionary Ecology group, Antwerp, Belgium
7. Kinshasa School of Public Health, Kinshasa, DRC,
8. University of Florida, Gainsville, USA

9. TransVIHMI, University of Montpellier, IRD, INSERM; Montpellier, France,

10. Institute of Tropical Medicine (ITM), Antwerp, Belgium,

11. Institute of Tropical Medicine, Department of Clinical Sciences, Antwerp, Belgium,

12. US Department of Agriculture, Manhattan, USA

13. Service de Microbiologie, Département de Biologie médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Université de Kinshasa

Emerging Infectious Diseases, www.cdc.gov/eid, Vol. 30, No. 4, April 2024

DOI: 10.3201/eid3004.231413

Original Publication Date: February 28, 2024

Abstract

In September 2022, deaths of pigs manifesting pox-like lesions caused by swinepox virus were reported in Tshuapa Province, Democratic Republic of the Congo. Two human mpox cases were found concurrently in the surrounding community. Specific diagnostics and robust sequencing are needed to characterize multiple poxviruses and prevent potential poxvirus transmission.

1. Background

Until recently, the Democratic Republic of the Congo (DRC), located in an mpox-endemic region, has had the highest global burden of mpox (1). Mpox is caused by the monkeypox virus (MPXV), which belongs to the Orthopoxvirus genus of the Poxviridae family. Within Poxviridae, 10 other genera are known to infect animals and reptiles (2), including Suipoxvirus (3). The only known species of Suipoxvirus causes swinepox, a pox-like disease in pigs.

Two genetically distinct clades of MPXV cause disease in humans. Clade I (formerly Congo Basin clade) is endemic in Central Africa, and outbreaks are thought to result mainly from zoonotic spillover; squirrels or other small mammals are suspected reservoirs or hosts (4; J. Mariën et al., unpub. data, https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-414280/v2External Link). Clade II (formerly West African clade) is endemic in West Africa; suspected reservoirs and transmission routes are historically similar to those of clade I. In 2022, MPXV subclade IIb spread beyond West Africa, causing an unprecedented global outbreak, leading the World Health Organization to declare mpox as a Public Health Emergency of International Concern (5).

During 2011–2015, the incidence of MPXV cases in DRC's Tshuapa Province increased compared with the incidence during 1981–1986 in similar geographic areas (6). This observation is not unique, suggesting expanding spillover rates of MPXV clade I into the human population and highlighting the possibility of increasing human-to-human virus transmission (1,4)..

Confirmation of suspected MPXV cases in DRC is hindered by logistical difficulties, such as complications involving sample collection and lack of available diagnostic laboratories in remote regions (4). Reported increases in mpox cases without well-defined origins suggest that a One Health investigation might be a more informative strategy. As part of this approach, investigations by DRC's National Program for Mpox and Viral Hemorrhagic Fevers (PNLMPX-

VHF) and its partners, including the US Centers for Disease Control and Prevention (CDC) and Belgium Institute of Tropical Medicine, have begun sampling mammals in areas with mpox cases and animals manifesting pox-like lesions (7). Previous sampling focused on wildlife and small animals but has recently been expanded to include domestic animals because animal husbandry is widespread throughout DRC (8). Yet, areas with livestock have not been regularly surveilled for health, hygiene, or suspected viruses, including MPXV. Close proximity of humans and animals provides an environment conducive to virus spillover (9). We report on the co-circulation of MPXV and swinepox virus in the same locality within DRC.

2. The Study

In early September 2022, provincial authorities in Tshuapa, a heavily forested province in northwest DRC, alerted PNLMPX-VHF regarding the deaths of pigs in the Boende health zone that manifested vesicular, pox-like lesions. Authorities also reported several suspected mpox cases among farm owners and residents in the area; clinical samples were not collected from those persons. Tshuapa is considered an MPXV-endemic area and has a robust surveillance program through PNLMPX-VHF, Kinshasa School of Public Health, and CDC. Through this program, suspected mpox case samples are sent to DRC's reference laboratory, the Institute National de Recherche Biomedical (INRB), for testing and, when requested, sequencing (6).

After the alert, during September 9–19, two pigs with pox-like lesions were identified at a domestic farm where pigs roamed freely. The first diseased pig had died on September 1; no samples had been collected. On September 10, the second pig, which had predominant umbilicated nodular dermatitis between the ears and on the face and chest, died. We collected a vesicle swab sample from the cadaver for analysis at INRB. MPXV PCR (10) results were negative, and we sequenced the sample by using an Illumina platform (*Illumina, https://www.illumina.com*) probe

enrichment-based protocol and a custom-made virus research panel (Twist Biosciences, *https://www.twistbioscience.com*). We used the open source bioinformatics pipeline, GeVarLi (*https://forge.ird.fr/transvihmi/nfernandez/GeVarLi*), to clean and align sequences and assign virus lineages. We completed de novo sequence assembly by using SPAdes Genome Assembler (*https://github.com/ablab/spades*). Sequencing results and phylogenetic analysis indicated that the second pig had been infected with swinepox virus (***Figure 47***, panel A) (11).

After identifying a swinepox-positive pig, we launched an expanded poxvirus investigation on October 2. In the Boende health zone, we identified 16 suspected human mpox cases, all occurring within 400 m of the farm that had a confirmed swinepox case. None of the persons with suspected mpox reported having mpox vaccinations, nor did they have scars indicating past mpox or variola vaccination. We collected skin swab, oropharyngeal lesion swab, and venous blood samples from case-patients with suspected active (n = 2) and convalescent (n = 4) MPXV infections and analyzed those samples at INRB. The 2 suspected active case-patients (both children) were MPXV positive. Sequencing confirmed infection with MPXV; however, we did not detect swinepox co-infection (***Figure 47***, panel B). We deposited the 2 MPXV sequences in the GISAID database (*https://www.gisaid.org; accession nos. EPI_ISL_18857033–4*). We determined that the farm owner, not realizing his pigs were sick, permitted his 2 children to directly contact the pigs during feeding without protection. Both children exhibited mild symptoms of fever, colds, headaches, and physical asthenia and developed a rash and papules 12 days after disease onset in the first pig. Both MPXV PCR-positive children recovered without complications; in addition, the family reported that they had previously recovered from PCR-confirmed MPXV. No epidemiologic link was established between the mpox-positive children and the swinepox-positive pig.

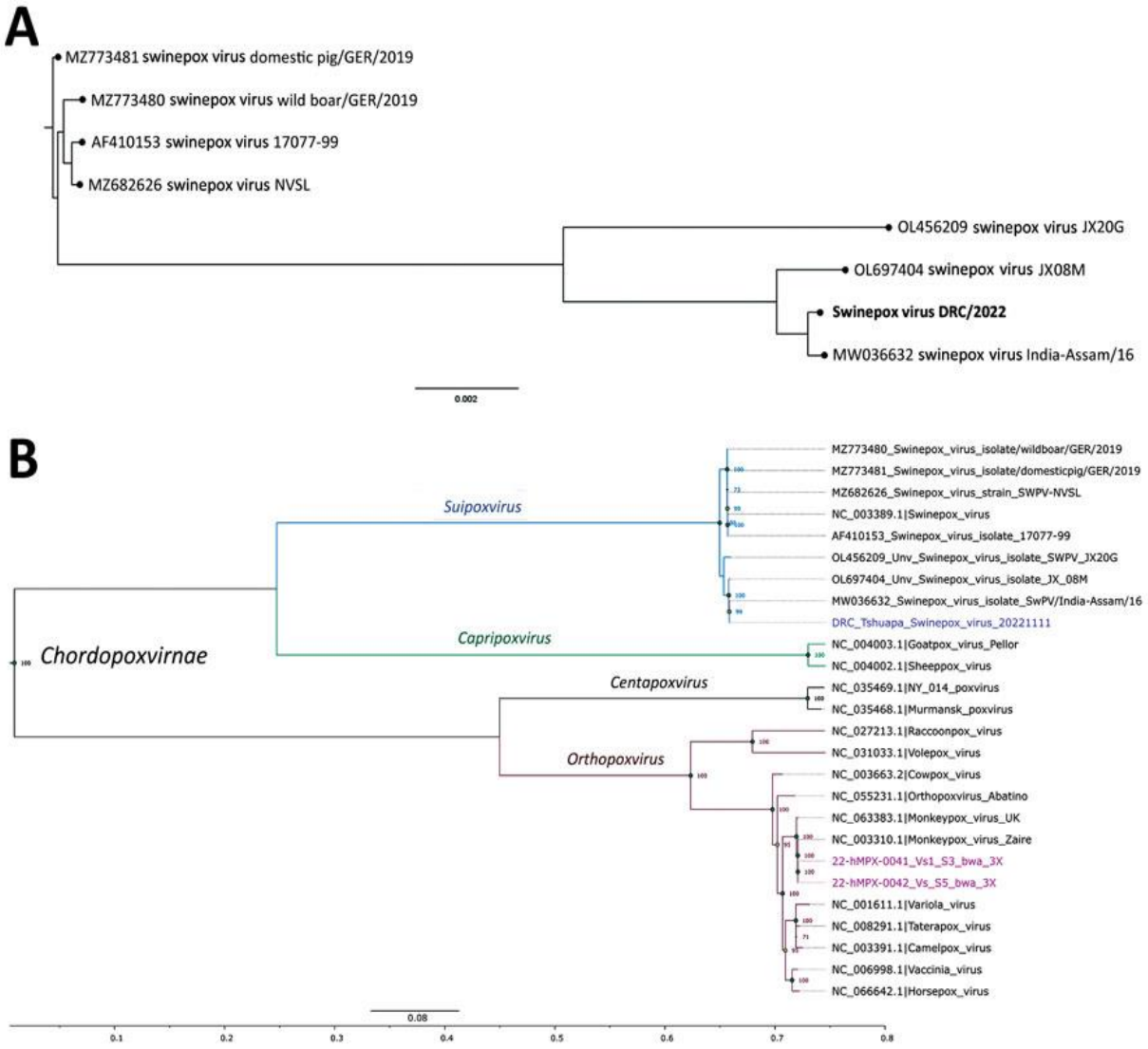


Figure 47 *: Phylogenetic analysis of swinepox virus*

(A) and monkeypox virus (B) in study of co-circulating viruses, Democratic Republic of the Congo, 2022. Poxvirus sequences for comparison were obtained from GenBank. Trees were constructed by using the maximum-likelihood method and the general time reversal substitution model with gamma distribution and proportion of invariable sites. In panel A, bold text indicates the swinepox sequence from this study; in panel B, magenta-colored text indicates monkeypox virus sequences and blue text indicates swinepox virus sequence from this study. The monkeypox virus samples belong to clade I and correspond to those previously described (11). Scale bars indicate nucleotide substitutions per site. DRC, Democratic Republic of the Congo.

We returned to the area to identify additional pigs with symptoms of pox-like virus infections and found 4 suspected cases, of which 3 were in a neighboring farm. All pigs with suspected infections had pox-like skin lesions on the face, mouth, or tongue and had liver

pathology similar to clinical manifestations of pox-like virus infections. A third pig from the original farm died on October 24; we collected lesion crust, vesicle, and rectal swab samples and internal organs where vesicular lesions were noted (***Figure 48***, panels A, B). Small mammals found in the vicinity of the original farm and that farmer's house also showed similar skin lesions (***Figure 48***, panel C). We collected lung, spleen, kidney, liver, oral, and rectal swab samples from 28 small mammals (shrews and black rats [Rattus rattus]) for analysis at INRB; 2 rats exhibited lesions. All samples tested negative for MPXV by PCR, and no additional sequencing was performed.



Figure 48 *: Animals with mpox-like lesions in study of co-circulating monkeypox and swinepox viruses, Democratic Republic of the Congo, 2022.*

A, B) Mpox-type lesions observed on internal tissues (A) and on the skin (B) of a pig. C) Lesion on the skin of a rodent that was found in the same geographic area as the pig.

Concurrently, medical staff reported periodic human outbreaks of suspected MPXV infections and wild and domesticated animal deaths in other health zones. In addition, outbreaks of pox-like disease in pigs preceded confirmed human mpox cases in the Bolomba health zone of Equateur Province in 2008 and the Masi-Manimba health zone of Kwilu Province in 2022 (12). Although no samples were collected from sick animals during those outbreaks, the overall frequency of reports warrants future use of One Health approaches in all investigations of pox-like diseases, regardless of the initial species in which the lesions are observed.

3. Conclusion

In environments endemic for zoonotic pathogens such as MPXV, the role of animal reservoirs and hosts must be considered in surveillance and outbreak control. Reports of multiple poxviruses (vaccinia virus, pseudocowpox virus, MPXV) co-circulating within a community are rare and have been primarily confined to Brazil (2,13). In addition to mpox, and now swinepox, DRC has reported cases of other poxviruses, including molluscum contagiosum and tanapox (14). The appearance of multiple poxviruses in the same region indicates sensitive, specific diagnostics and robust sequencing capacity are needed to characterize those agents, better understand poxvirus epidemiology, and prevent potential poxvirus transmission.

Dr. Kalonji is a disease surveillance officer with the National Viral Hemorrhagic Fevers and mpox Control Program of the DRC. His research interests include Mpox, COVID-19, Ebola virus disease, cholera, and vaccine-preventable diseases.

Acknowledgments: We are grateful to the Tshuapa Provincial health divisions staff and especially those in Boende and Mompono healths zones, and all health care workers involved in the mpox surveillance and animals health safety in DRC. We also thank the staff from the INRB Biorepository: Gabriel Kabamba, Raphael Lumembe, Andre Citenga, Fiston Cikaya, Sifa Kavira, Zadoc Yungwe and Michel Kenye, and the INRB Department of Epidemiology and Virology: Guy Midingi, Sophie Gabia, Akil Prince, Chloé Muswamba, Ola Rilia for their valuable involvement and support. We also think Yu Li from the Centers for Disease Control and Prevention for their review of the genetic sequencies.

Funding: This work was funded by a number of collaborators at the INRB, including: Research Foundation–Flanders (grant G096222N to L.L.), Department of Defense, Defense Threat Reduction Agency, Monkeypox Threat Reduction Network (MPX-TRN) (to A.W.R.), Centers for

Disease Control and Prevention (CDC) (to D.K.), project PANAFPOX funded by ANRS-MIE and Agence Française de Développement through the AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209), coordinated by ANRS Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut Pasteur and IRD (to M.P, and E.D.). Eddy Lusamaki received a PhD grant from the French Foreign Office.

The content of the information does not necessarily reflect the position of the policy of the US Federal Government, and no official endorsement should be inferred.

References

1. Hoff NA, Doshi RH, Colwell B, Kebela-Illunga B, Mukadi P, Mossoko M, et al. Evolution of a Disease Surveillance System: An Increase in Reporting of Human Monkeypox Disease in the Democratic Republic of the Congo, 2001-2013. Int J Trop Dis Health. 2017;25(2).

2. Bunge EM, Hoet B, Chen L, Lienert F, Weidenthaler H, Baer LR, et al. The changing epidemiology of human monkeypox-A potential threat? A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2022 Feb;16(2):e0010141.

3. Oliveira GP, Rodrigues RAL, Lima MT, Drumond BP, Abrahão JS. Poxvirus Host Range Genes and Virus-Host Spectrum: A Critical Review. Viruses. 2017 Nov 7;9(11).

4. Afonso C, Tulman E, Lu Z, Zsak L, Osorio FA, Balinsky C, et al. The genome of swinepox virus. Journal of virology. 2002;76(2):783-90.

5. Rimoin AW, Mulembakani PM, Johnston SC, Lloyd Smith JO, Kisalu NK, Kinkela TL, et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Sep 14;107(37):16262-7.

6. Mariën J, Laudisoit A, Patrono L, Baelo P, van Vredendaal R, Musaba P, et al. Monkeypox viruses circulate in distantly-related small mammal species in the Democratic Republic of the Congo. 2021.

7. Organization WH. WHO Director-General's statement at the press conference following IHR Emergency Committee regarding the multi-country outbreak of monkeypox - 23 July 2022. www.who.int; 2022.

8. Whitehouse ER, Bonwitt J, Hughes CM, Lushima RS, Likafi T, Nguete B, et al. Clinical and Epidemiological Findings from Enhanced Monkeypox Surveillance in Tshuapa Province, Democratic Republic of the Congo During 2011-2015. J Infect Dis. 2021 Jun 4;223(11):1870-8.

9. Prevention CfDCa. mpox in Animals. 2023 January 4, 2023 [cited 13 March 2023]; Available from: https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/veterinarian/mpox-in-animals.html

10. Mohapatra RK, Mishra S, Kandi V, Sarangi AK, Ansari A, Chakraborty C, et al. Monkeypox plays a similar role like SARS-CoV-2; intensive animal screening is crucial after the first human-to-dog transmission report–Correspondence. International Journal of Surgery (London, England). 2022.

11. Bosworth A, Wakerley D, Houlihan CF, Atabani SF. Monkeypox: An old foe, with new challenges. Infection Prevention in Practice. 2022;4(3):100229.

12. Vora NM, Hannah L, Walzer C, Vale MM, Lieberman S, Emerson A, et al. Interventions to Reduce Risk for Pathogen Spillover and Early Disease Spread to Prevent Outbreaks, Epidemics, and Pandemics. Emerg Infect Dis. 2023 Mar;29(3):1-9.

13. Kinganda-Lusamaki E, Black A, Mukadi DB, Hadfield J, Mbala-Kingebeni P, Pratt CB, et al. Integration of genomic sequencing into the response to the Ebola virus outbreak in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. Nat Med. 2021 Apr;27(4):710-6.

14. Mbala-Kingebeni P, Aziza A, Di Paola N, Wiley MR, Makiala-Mandanda S, Caviness K, et al. Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: a rapid genomic assessment. Lancet Infect Dis. 2019 Jun;19(6):648-57.

15. Whitehouse ER, Bonwitt J, Hughes CM, Lushima RS, Likafi T, Nguete B, et al. Clinical and epidemiological findings from enhanced monkeypox surveillance in Tshuapa province, Democratic Republic of the Congo during 2011–2015. The Journal of infectious diseases. 2021;223(11):1870-8.

16. Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. Journal of virological methods. 2010;169(1):223-7.

17. Organization WH. RD Congo : Rapport de mission d'investigation et riposte à l'épidémie de monkey pox à Djoa - Zone de santé de Bolomba. Kinshasa, DRC: World Health Organization; 2008 20 August 2008.

18. Luques MN, Oliveira RL, Hir S, dos Santos Nunes D, Higa LM, Mendonça AF, et al. Co-circulation of vaccinia and monkeypox viruses in rural areas of Brazil: Importance of differential molecular diagnosis. Travel Medicine and Infectious Disease. 2023;53:102578.

19. Miranda JB, Borges IA, Campos SP, Vieira FN, de Ázara TM, Marques FA, et al. Serologic and molecular evidence of vaccinia virus circulation among small mammals from different biomes, Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2017;23(6):931.

20. Monroe BP, Nakazawa YJ, Reynolds MG, Carroll DS. Estimating the geographic distribution of human Tanapox and potential reservoirs using ecological niche modeling. International journal of health geographics. 2014;13(1):1-9.

21. Sereni D. 22. New Trends in Opportunistic Infections in HIV Patients. Multi-drug Resistance in Emerging and Re-emerging Diseases. 2000:223.

Chapitre 4: Presumed Transmission of 2 Distinct Monkeypox Virus Variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo

a. Résumé :

Contexte :

La RDC assiste à une augmentation du nombre de notifications qui s'est accélérée à partir de 2022, et ce fait peut soit être entretenu par des introductions des pays frontaliers partageant la même écologie, ou alors résulter dans la propagation dans les pays frontaliers. Les provinces de l'Equateur et de la Tshuapa ont été en 2022 parmi les provinces notifiant le plus de cas dans le pays alors que les provinces voisines tel la Mongala, le Nord-Ubangi ou le Sud-Ubangi sont restées muettes dans les rapports nationaux.

Investigation et conclusion

En réponse à une alerte dans la province du Sud-Ubangi, voisine de la Tshuapa et de l'Equateur, une investigation a été conduite dans la zone de santé de Mbaya. Quatre cas positifs de mpox ont été confirmés biologiquement et les investigations épidémiologiques ont révélé qu'un des clusters investigués était lié à une probable transmission transfrontalière à partir de la République Centrafricaine partageant une large frontière avec la RDC. Le séquençage du génome viral montre que les séquences MPXV appartiennent à des groupes distincts de sous-clade Ia. Cela démontre le potentiel de transmission transfrontalière du mpox et souligne la nécessité d'une surveillance régionale vigilante, régionale renforcée et de collaborations internationales.

b. Dispatch, Emerging infectious Diseases, 2024

Presumed Transmission of 2 Distinct Monkeypox Virus Variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo

Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki[1,2], **Eddy Kinganda-Lusamaki[1,3,4]**, Sydney Merritt[5], Francois Kasongo[1], Emile Malembi[6], Lygie Lunyanga[1], Sylvie Linsuke[1], Megan Halbrook[5], Ernest Kalthan[7], Elisabeth Pukuta[1], Adrienne Amuri Aziza[1], Jean Claude Makangara Cigolo[1,3,8], Raphael Lumembe[1,3], Gabriel Kabamba[1,3], Yvon Anta[1], Pierrot Bolunza[9], Innocent Kanda[9], Raoul Ngazobo[10], Thierry Kalonji[6], Justus Nsio[11], Patricia Matoka[11], Dieudonné Mwamba[12], Christian Ngandu[12], Souradet Y. Shaw[13], Robert Shongo[6], Joule Madinga[1], Yap Boum[14], Laurens Liesenborghs[2], Eric Delaporte[4], Ahidjo Ayouba[4], Nicola Low[8,15], Steve Ahuka Mundeke[1,3], Lisa E. Hensley[16], Jean-Jacques Muyembe Tamfum[1,3], Emmanuel Nakoune[14], Martine Peeters[4], Nicole A. Hoff[5], Jason Kindrachuk[17,18], Anne W. Rimoin[5*], Placide Mbala-Kingebeni [1,3*]

*****These authors equally co-supervised this work.

Affiliations:

1. Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of Congo
2. Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium
3. Service de Microbiologie, Département de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Kinshasa University, Democratic Republic of Congo

4. TransVIHMI (Recherches Translationnelles sur le VIH et les Maladies Infectieuses endémiques et émergentes), Université de Montpellier, French National Research Institute for Sustainable Development (IRD), INSERM, Montpellier, France
5. Department of Epidemiology, Jonathan and Karin Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, CA, USA
6. Hemorrhagic Fevers and Monkeypox Program (PNLMPX-VHF), Ministry of Health, Democratic Republic of the Congo
7. Ministry of Health and Populations, Bangui, Central African Republic
8. Graduate School for Cellular and Biomedical Sciences, University of Bern, Bern, Switzerland
9. Provincial Health Division, South Ubangi, Democratic Republic of Congo
10. Mbaya Health Zone, South Ubangi, Democratic Republic of Congo
11. National Border Hygiene Program, Ministry of Health, Democratic Republic of Congo
12. National Institute of Public Health, Ministry of Health, Democratic Republic of Congo
13. Department of Community Health Sciences, Max Rady College of Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada
14. Pasteur Institute of Bangui
15. Institute of Social and Preventive Medicine (ISPM), University of Bern, Switzerland
16. Zoonotic and Emerging Disease Research Unit, National Bio and Agro-Defense Facility, USDA Agricultural Research Service (ARS), Manhattan, Kansas.
17. Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

18. Manitoba Centre for Proteomics & Systems Biology, Department of Internal Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

Corresponding Author(s):

Correspondence: Anne W. Rimon, PhD, MPH, Professor, Department of Epidemiology, Gordon-Levin Endowed Chair in Infectious Diseases and Public Health
UCLA Fielding School of Public Health, 650 Charles E. Young Dr, CHS 41-275, Los Angeles, CA 90095, USA; Phone: +1(310) 409-6299; arimoin@ucla.edu [ORCID : 0000-0002-0662-9067]

Co-correspondence: Placide Mbala-Kingebeni, MD, PhD, Associate Professor, School of Medicine, University of Kinshasa (UNIKIN)**;** Department of Epidemiology and Global Health; Head of Pathogen Genomics Laboratory, Institute National de la Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo (DRC); Phone: +243 822 851 584***;*** mbalaplacide@gmail.com [ORCID : 0000-0003-1556-3570]

Emerging Infectious Diseases, www.cdc.gov/eid, Vol. 30, No. 10, October 2024

DOI: 10.3201/eid3010.241118

Original Publication Date: August 29, 2024

This article was published as a preprint at

https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2024.08.13.24311555v1

Abstract

Four mpox-positive cases in South Ubangi, Democratic Republic of the Congo, were linked to transboundary transmission from Central African Republic. Viral genome sequencing demonstrated that the monkeypox virus sequences belonged to distinct clusters of subclade Ia. This finding demonstrates the borderless nature of mpox and highlights the need for vigilant regional surveillance.

1. Introduction

Mpox is a zoonotic viral infectious disease first identified in humans in the Democratic Republic of the Congo (DRC) in 1970 (1). Monkeypox virus (MPXV) is endemic to forested regions of Central and West Africa (2) and is subclassified into clade I and clade II; subclade IIb was responsible for a global epidemic in 2022 (3). We have recommended subdivision of clade I into subclades Ia and Ib, where subclade Ib is associated with sustained human-to-human transmission in the DRC (4). Clade I is endemic to Central Africa, particularly in the DRC, and infections are associated with greater disease severity than for clade II infection (5,6). Zoonotic spillover has been the primary driver of clade I MPXV infections; however, sustained human-to-human transmission is increasing, and spread of clade I MPXV through sexual contact has been reported in multiple regions of the DRC (4,7).

Among mpox-endemic regions, the DRC has been the most severely affected. The number of reported cases has increased since the cessation of smallpox vaccination campaigns in 1980 (8). This increase accelerated from 2022 onward (9), including into regions with no previously reported cases (10). Cross-border travel has been demonstrated as a factor in transmission of clade II MPXV, but less is known for clade I cases in regional settings. Given the recent geographic expansion for clade I MPXV and increasing observation of sustained human-to-human transmission,

considerable concerns exist about geographic expansion of mpox through cross-border transmission (10).

The Central African Republic (CAR) shares a >1,000-mile border with the DRC. CAR has reported 40 confirmed mpox outbreaks (95 suspected cases during 2001–2021), increasing from 0–2 annually during 2001–2017 to 9 annually since 2018 (11). Most of those outbreaks occurred in 2 regions along the border with the DRC. Here, we report suspected cross-border transmission of mpox between CAR and the DRC in 2023 and potential links to MPXV circulation in DRC.

2. The study

The South Ubangi Provincial Health Division in the DRC issued an alert for a suspected mpox case in January 2023 after the death of a fisherman displaying respiratory distress and skin lesions in Mbaya Health Zone. South Ubangi directly borders CAR, separated by the Ubangi River. The National Programme for Control of Mpox and Viral Hemorrhagic Fevers and the National Institute for Biomedical Research deployed a multidisciplinary team to investigate the case with the Provincial Health Division. As part of the investigation, the national and provincial health teams conducted supplemental training sessions to raise awareness of the clinical signs and transmission modes for mpox.

The index case was an adult man residing in Bangui, CAR, who moved frequently between CAR and the DRC by the Ubangi River (cluster 1, case 1: C1) (***Figure 49***). After suspected exposure to wildlife meat and the potential consumption of rodents in CAR in early January 2023, symptom onset began shortly after (day 0); symptoms were fever, headache, chills, and cutaneous rash. After traveling to the DRC, he was admitted to Mbaya General Reference Hospital 2 days later, where he died on day 9 after symptom onset, after experiencing respiratory distress. No samples or information on his immune status were collected from this probable mpox case-patient.

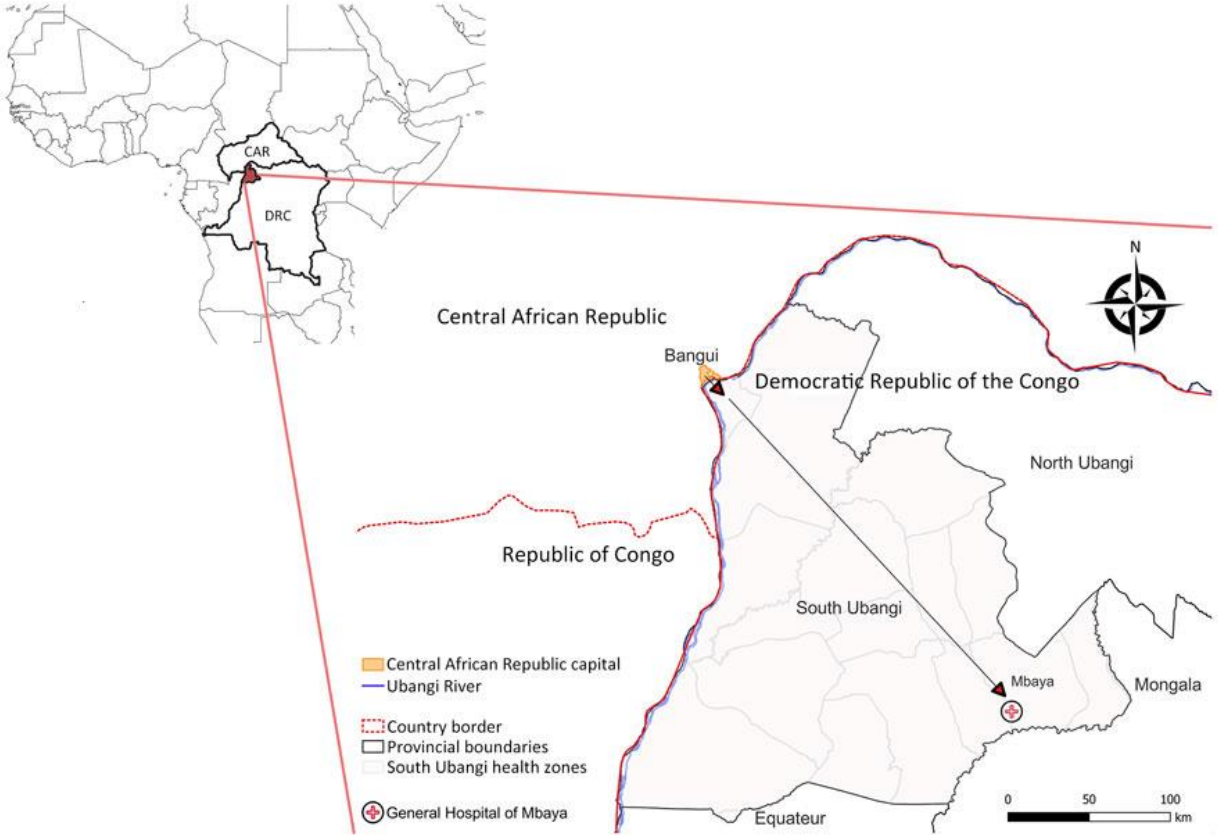


Figure 49 *: :Possible transmission route of monkeypox virus between Bangui, Central African Republic, and Mbaya Health Zone, South Ubangi Province, Democratic Republic of the Congo, January 2023.*

Inset map shows location of countries and study area within Africa. Created with BioRender.com.

We identified 15 contacts of the patient in Mbaya Health Zone, consisting of 5 healthcare workers and 10 close contacts (4 close friends and 6 family contacts). The investigation revealed a cluster of 3 symptomatic family contacts. Of those, 2 contacts had samples taken, and both tested positive for MPXV by PCR; those contacts were the adult female partner of C1 (C2) and their child (C3). A second child of C1 and C2 (C4) was treated locally for suspected mpox using traditional methods and was not investigated further. No suspected mpox cases were identified among family or close contacts of C1 in Bangui.

During the investigation, we identified a distinct second mpox cluster, which likely originated from a different source. We identified 3 suspected mpox cases in the same hospital at the same time as the first cluster that had no known epidemiologic link. An adult woman (cluster 2, case 1: D1) was hospitalized for nonspecific signs of mpox at the same time as C1 and reported contact with a child with mpox symptoms ≈28 days before. The 2 additional suspected cases were the child of D1 (D2), in whom mpox was subsequently confirmed by PCR, and a contact of D2 (D3), who tested negative by PCR (***Figure 50***).

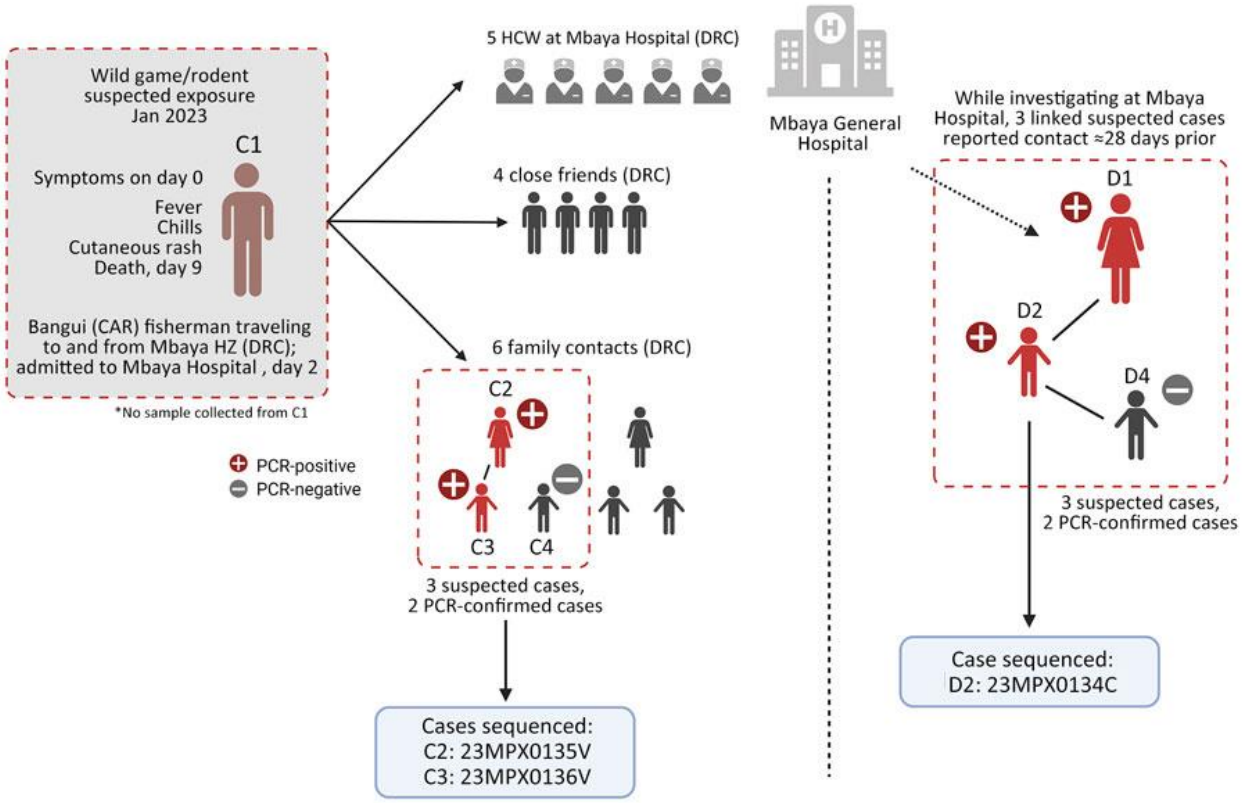


Figure 50 *: Possible transmission chain of monkeypox virus from CAR to the DRC and second identified chain at Mbaya General Reference Hospital, Mbaya, DRC. CAR, Central African Republic; DRC, Democratic Republic of the Congo; HCW, healthcare workers; HZ, health zone. Created with BioRender.com.*

Confirmed mpox clinical symptoms included multiple pustular and papular lesions (C2); disseminated pustules (C3); discreet lacrimation in the left eye and postinflammatory hyperpigmentation (D1); and hyperpigmented, disseminated macules and steep-edged ulcerations (D2) (***Figure 51***).

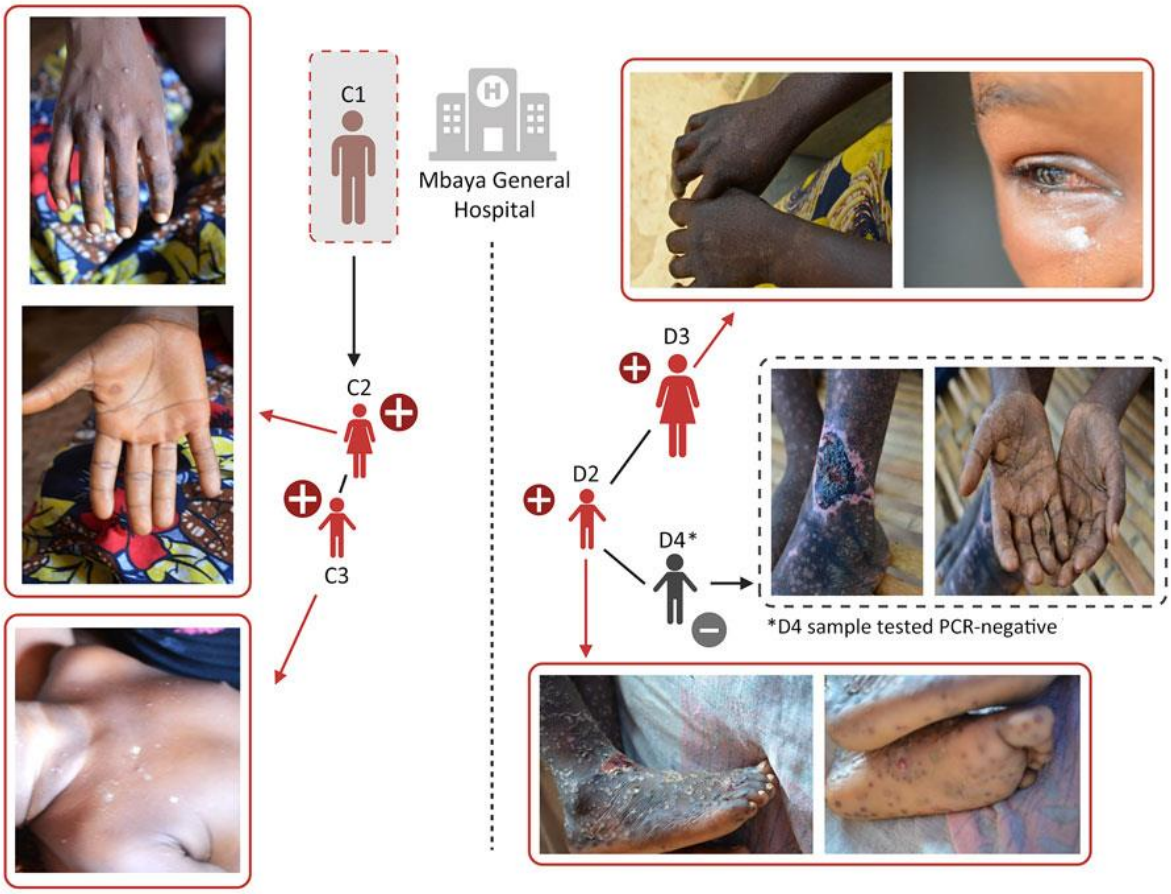


Figure 51 *: Clinical manifestations of suspected mpox from 2 mother-child pairs in study of presumed transmission of monkeypox virus variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo. One mother-child pair was linked to the deceased fisherman in Mbaya Health Zone, and the other pair were identified at Mbaya Hospital, Mbaya, Democratic Republic of the Congo. Created with BioRender.com.*

Subsequent viral genome sequencing was performed on three PCR-positive samples: two from the first mpox cluster (C2 and C3) and one from the second cluster (D2) **(*Figure 52*)**. Phylogenetic analysis included 98 clade I MPXV previously published genomes. The phylogenetic tree was generated by maximum likelihood using the K3Pu+F+I model (12, 13). The three sequences, all clade Ia, clustered with MPXV genome sequences isolated from CAR. The genetic distance between the new cases and the date between the CAR and DRC samples is too long to conclude direct links between the two countries. Nevertheless, the new samples from South-Ubangi cluster in the same subgroup (group II) according to previous classification of MPXV sequences in clade Ia (14).

Further, The PNLMPX-VHF investigated 109 suspected mpox cases from 15 health zones in South Ubangi from January to November 2023. Cases were predominantly male (60 males; 46 females; 3 unavailable) with an average age of 21 years (range 35 months to 63 years). Of these, 61 cases (56 %) were confirmed positive by PCR at INRB. Three mpox-negative cases were confirmed positive for varicella zoster virus (3/48; 6%).

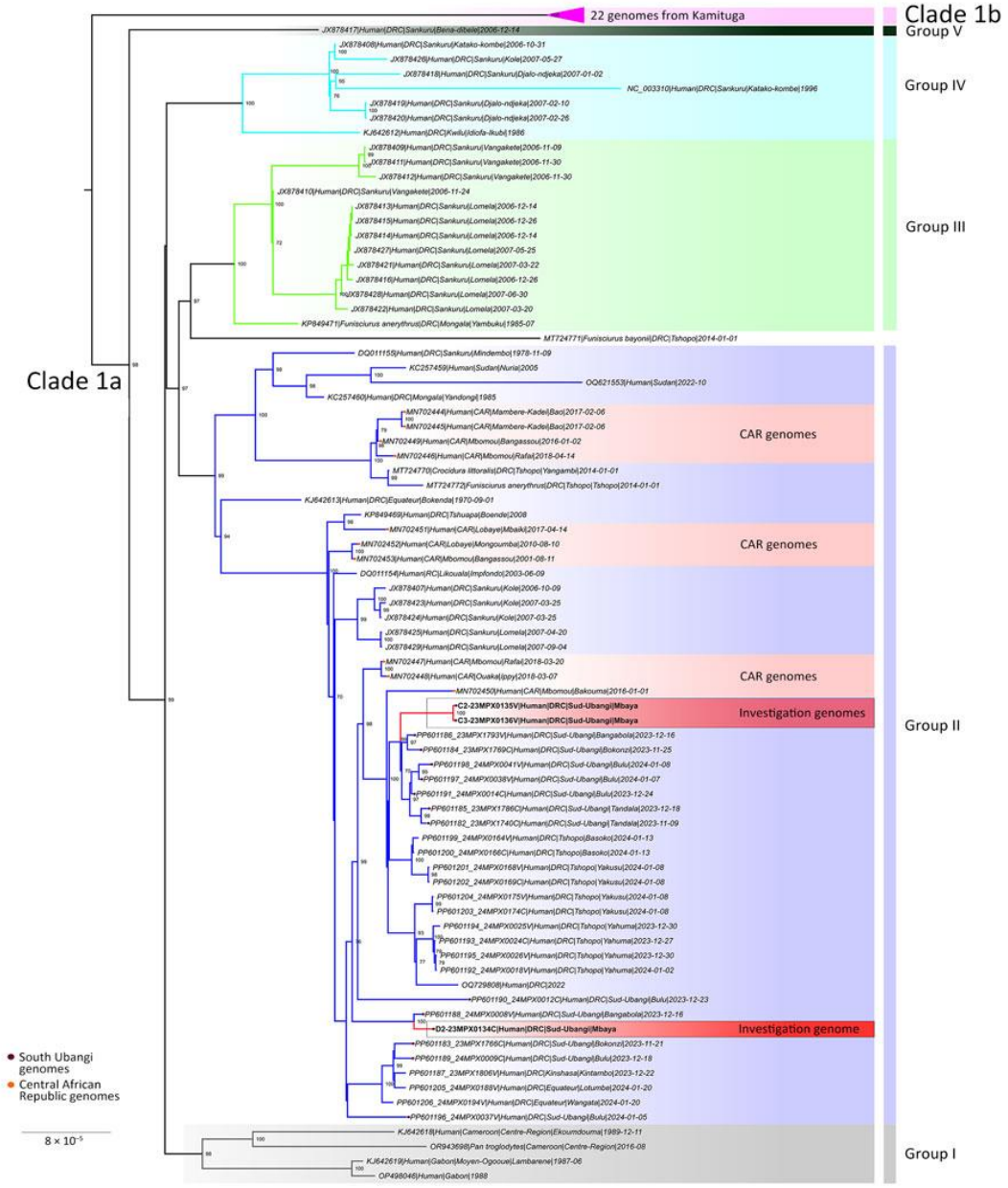


Figure 52 *: Phylogenetic analysis of monkeypox virus (MPXV) sequences from Mbaya Health Zone in study of presumed transmission of MPXV variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo.*

Phylogenetic analysis of MPXV genome sequences are from samples described in this study and clade I MPXV sequences from Central Africa. Bootstrap support values are shown at branch points. DNA was extracted at the National Institute for Biomedical Research using a QIAGEN DNA Mini Kit (https://www.qiagen.com) from blood samples and subsequently screened for MPXV with an orthopoxvirus-specific real-time PCR assay. Whole-genome sequencing was attempted on samples from the index case by next-generation sequencing. Library preparation was performed using Illumina DNA Prep with Enrichment (https://www.illumina.com), and libraries were enriched for MPXV using biotinylated custom probes synthesized by Twist Biosciences (https://www.twistbioscience.com). Note that 23MPX0134C(D2), 23MPX0135V(C2), and 23MPX0136V(C3) are samples from crust or vesicles from separate individuals. Sequences can be accessed with the following GISAID (https://www.gisaid.org) accession nos.: EPI_ISL_19287107 (D2), EPI_ISL_19287108 (C2), EPI_ISL_19287109 (C3). Scale bar indicates number of substitutions per site.

3. Conclusion

This investigation describes 2 distinct clusters of mpox cases in Mbaya Health Zone in South Ubangi Province in the DRC, presumably resulting from 2 different introductions. We identified epidemiologic links to cross-border travel from CAR for the first cluster and identified genomic links with historic CAR cases for both clusters. MPXV transmission in the DRC is currently driven by both zoonotic and human-to-human contact, thus increasing the complexity of containment and mitigation efforts. Wider regional and international expansion of mpox, specifically, the concentration of MPXV outbreaks in CAR and the DRC along the Ubangi River, recent sustained human-to-human transmission, resource limitations for identifying and treating mpox, disease stigma, population displacement because of conflict, and transient cross-border transit are serious concerns.

In August 2022, a first regional meeting involving 6 neighboring countries of Central and West Africa was held in Kinshasa, the DRC, to establish a regional mpox surveillance network, the Mpox Threat Reduction Network. Through this network, multiple teams including experts from the Health Ministries of the DRC and CAR were able to communicate rapidly on suspected cases crossing borders in South Ubangi while also reporting to International Health Regulations focal points. Considering the relatively porous borders in the Central African region and continuing increases in reported mpox cases, documenting transboundary mpox transmission is critical. This investigation highlights the importance of long-term collaborative partnerships for sustained mpox surveillance and containment in endemic regions.

Acknowledgements : We would like to thank Gradi Luakanda (INRB) for his continued support of this work. Figures included in this manuscript were generated using Biorender.com. All maps were generated using qGIS version 3.30.

Funding : The project or effort depicted is sponsored by the Department of Defense Threat Reduction Agency. The content of the information does not necessarily reflect the position or the policy of the federal government, and no official endorsement should be inferred. This work was also supported by the International mpox Research Consortium (IMReC) through funding from the Canadian Institutes of Health Research and International Development Research Centre (Grant No. 202209MRR-489062-MPX-CDAA-168421) and the Agence Française de Développement through the PANAFPOX and AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209), coordinated by ANRS Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut de Recherche pour le Développement (IRD). E.L. received a PhD grant from the French Foreign Office.

Ethical Considerations : All efforts presented in this work are part of regular public health surveillance conducted by the Ministry of Health and partners in the DRC and CAR.

Conflicts of Interest: The authors attest that they have no conflicts of interest to declare.

Author Biography : Dr. Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki is a medical researcher, Eco-Epidemiologist at the Institut National de Recherche Biomédicale and a pre-doctoral fellow at the Antwerp Institute of Tropical Medicine. After a long career in general clinical medicine, his research focuses on emerging and re-emerging infectious diseases, the contribution of vaccination to the control of vaccine-preventable diseases and health risks in the context of One Health.

References

1. Ladnyj ID, Ziegler P, Kima E. A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. Bull World Health Organ. 1972;46(5):593-7.
2. Titanji BK, Tegomoh B, Nematollahi S, Konomos M, Kulkarni PA. Monkeypox: A Contemporary Review for Healthcare Professionals. Open Forum Infect Dis. 2022 Jul;9(7):ofac310.
3. Happi C, Adetifa I, Mbala P, Njouom R, Nakoune E, Happi A, et al. Urgent need for a non-discriminatory and non-stigmatizing nomenclature for monkeypox virus. PLoS Biol. 2022 Aug;20(8):e3001769.
4. Vakaniaki EH, Kacita C, Kinganda-Lusamaki E, O'Toole A, Wawina-Bokalanga T, Mukadi-Bamuleka D, et al. Sustained Human Outbreak of a New MPXV Clade I Lineage in the Eastern Democratic Republic of the Congo. Nat Med. 2024 Jun 13.
5. Weaver JR, Isaacs SN. Monkeypox virus and insights into its immunomodulatory proteins. Immunol Rev. 2008 Oct;225:96-113.
6. McCollum AM, Damon IK. Human monkeypox. Clin Infect Dis. 2014 Jan;58(2):260-7.
7. Kibungu EM, Vakaniaki EH, Kinganda-Lusamaki E, Kalonji-Mukendi T, Pukuta E, Hoff NA, et al. Clade I-Associated mpox Cases Associated with Sexual Contact, the Democratic Republic of the Congo. Emerg Infect Dis. 2024 Jan;30(1):172-6.
8. MSPHP. REPORT ON THE EPIDEMIOLOGICAL SITUATION OF MONKEYPOX VIRUS—S1-S6 2024. Ministry of Public Health, Hygiene and Prevention of the Democratic Republic of the Congo; 2024.
9. WHO. Disease Outbreak News: mpox - Democratic Republic of the Congo; 2024 14 June 2024.
10. Mbala-Kingebeni P, Rimoin AW, Kacita C, Liesenborghs L, Nachega JB, Kindrachuk J. The time is now (again) for mpox containment and elimination in Democratic Republic of the Congo. PLOS Glob Public Health. 2024;4(6):e0003171.
11. Besombes C, Mbrenga F, Schaeffer L, Malaka C, Gonofio E, Landier J, et al. National Monkeypox Surveillance, Central African Republic, 2001-2021. Emerg Infect Dis. 2022 Dec;28(12):2435-45.
12. Kalyaanamoorthy S, Minh BQ, Wong TKF, von Haeseler A, Jermiin LS. ModelFinder: fast model selection for accurate phylogenetic estimates. Nat Methods. 2017 Jun;14(6):587-9.
13. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 2020 May 1;37(5):1530-4.
14. Berthet N, Descorps-Declere S, Besombes C, Curaudeau M, Nkili Meyong AA, Selekon B, et al. Genomic history of human monkey pox infections in the Central African Republic between 2001 and 2018. Sci Rep. 2021 Jun 22;11(1):13085.

Chapitre 5: Sustained Human Outbreak of a New MPXV Clade I Lineage in the Eastern Democratic Republic of the Congo

5.1.Résumé :

Background

Le MPXV a attiré l'attention du monde entier en 2022 lors d'une épidémie généralisée liée principalement à des contacts sexuels. Le clade I MPXV est répandu en Afrique centrale et se caractérise par une maladie grave et une mortalité élevée, tandis que le clade II est confiné à l'Afrique de l'Ouest et associé à une maladie plus bénigne. Le clade IIb est apparu au Nigeria en 2017 et la transmission interhumaine prolongée étant un précurseur de l'épidémie mondiale de la lignée B.1 du clade IIb en 2022. En octobre 2023, une importante épidémie de mpox est apparue dans la région minière de Kamituga, dans l'est de la République démocratique du Congo (RDC). En novembre 2023, un rapport de l'OMS a appuyé les inquiétudes quant à l'évolution de l'épidémiologie du mpox en République démocratique du Congo (RDC), avec en plus l'augmentation du nombre de cas. Nous avons ainsi mené une enquête dans la province du Sud-Kivu et réalisé une analyse génomique des souches de mpox contemporaines pendant la période de l'enquête.

Methodologie

L**es** données de surveillance et les dossiers hospitaliers ont été collectés entre octobre 2023 et janvier 2024. Des échantillons de sang et des écouvillons cutanés/oropharyngés ont été obtenus pour le diagnostic moléculaire à l'Institut national de recherche biomédicale de Kinshasa. Les

génomes du MPXV ont été séquencés et analysés à l'aide d'Illumina NextSeq 2000 et d'outils bioinformatiques.

Resultats et conclusion

L'épidémie de mpox de Kamituga s'est propagée rapidement, avec 241 cas suspects signalés dans les 5 mois suivant le premier cas signalé. Sur 108 cas confirmés, 29 % étaient des travailleurs du sexe, ce qui souligne que le contact sexuel est l'un des principaux modes d'infection. L'analyse génomique a révélé une lignée distincte, appelée clade Ib, divergente des souches du clade I précédemment séquencées en RDC. La prédominance des mutations de type APOBEC3 et le moment estimé de l'émergence vers la mi-septembre 2023 suggèrent une transmission interhumaine récente. Des mesures urgentes, notamment une surveillance renforcée et élargie, la recherche des contacts, un soutien à la prise en charge des cas et une vaccination ciblée, sont nécessaires pour contenir cette nouvelle épidémie potentielle de clade Ib.

5.2. Article en communication brève, Nature Medecine, 2024

Sustained Human Outbreak of a New MPXV Clade I Lineage in the Eastern Democratic Republic of the Congo

Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki[1,6*]; Cris Kacita[2*]; **Eddy Kinganda-Lusamaki**[1,3,4*]; Áine O'Toole[5*]; Tony Wawina-Bokalanga[1,3,6]; Daniel Mukadi-Bamuleka[1,3,7]; Adrienne Amuri-Aziza[1]; Nadine Malyamungu-Bubala[8]; Franklin Mweshi-Kumbana[8]; Léandre Mutimbwa-Mambo[9]; Freddy Belesi-Siangoli[10],Yves Mujula[1]; Edyth Parker,[11]; Pauline-Chloé Muswamba-Kayembe[1]; Sabin S. Nundu[1]; Robert S. Lushima[2]; Jean-Claude Makangara-Cigolo,[1,3]; Noella Mulopo-Mukanya[7]; Elisabeth Pukuta-Simbu[1]; Prince Akil-Bandali[1]; Hugo Kavunga[1,7]; Ombotimbe Abdramane[12]; Isabel Brosius[6]; Eugene Bangwen[6]; Koen Vercauteren[6]; Nadia A. Sam-Agudu[13,14,15]; Edward J Mills[16]; Olivier Tshiani-Mbaya[17]; Nicole A. Hoff[18]; Anne W. Rimoin[18]; Lisa E. Hensley[19]; Jason Kindrachuk[20]; Cheryl Baxter[21]; Tulio de Oliveira[21]; Ahidjo Ayouba[4]; Martine Peeters[4]; Eric Delaporte[4]; Steve Ahuka-Mundeke[1,3]; Emma L. Mohr[22]; Nancy J. Sullivan[23]; Jean-Jacques Muyembe-Tamfum[1,3]; Jean B. Nachega[24,25,26**]; Andrew Rambaut[5**]; Laurens Liesenborghs[6,27**]; Placide Mbala-Kingebeni[1,3**]

*Equal contributions; **Joint senior authors

Affiliations

1. Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo
2. Hemorrhagic Fever and Monkeypox Program, Ministry of Health, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

3. Service de Microbiologie, Département de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Université de Kinshasa
4. TransVIHMI (Recherches Translationnelles sur le VIH et les Maladies Infectieuses), Université de Montpellier, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM), Montpellier, France
5. Institute of Ecology and Evolution, University of Edinburgh, Edinburgh EH9 3FL, UK
6. Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium
7. Rodolphe Merieux INRB-Goma Laboratory, Goma, Democratic Republic of the Congo
8. Kamituga General Hospital, South Kivu, Democratic Republic of the Congo
9. Kamituga Health Zone, South Kivu, Democratic Republic of the Congo
10. Provincial Health Division, South Kivu, Democratic Republic of the Congo
11. African Center of Excellence for Genomics of Infectious Diseases, Redeemer's University, Ede, Osun State, Nigeria
12. Medical Department, The Alliance for International Medical Action (ALIMA), Goma, DRC
13. Department of Pediatrics and Child Health, School of Medical Sciences, University of Cape Coast, Cape Coast, Ghana
14. International Research Center of Excellence, Institute of Human Virology Nigeria, Abuja, Nigeria
15. Global Pediatrics Program and Division of Infectious Diseases, Department of Pediatrics, University of Minnesota Medical School, Minneapolis, MN, USA
16. Department of Health Research Methods, Evidence and Impact, Faculty of Health Sciences, McMaster University, Hamilton, Ontario, Canada

17. Frederick National Laboratory, Leidos Biomedical Research, Clinical Monitoring Research Program Directorate
18. Department of Epidemiology, Jonathan and Karin Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, CA, USA
19. US Department of Agriculture, Manhattan, KS, USA
20. University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada
21. Centre for Epidemic Response and Innovation (CERI), Stellenbosch University, Cape Town, South Africa
22. Department of Pediatrics, Division of Infectious Diseases, University of Wisconsin-Madison, Madison, Wisconsin, United States
23. National Emerging Infectious Diseases Laboratory (NEIDL), Boston University, Boston, MA, USA
24. Department of Epidemiology, Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, School of Public Health, Pittsburgh, PA, USA
25. Department of Epidemiology and International Health, Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health, Baltimore, MD, USA
26. Department of Medicine, Division of Infectious Diseases, Stellenbosch University Faculty of Medicine and Health Sciences, Cape Town, South Africa
27. Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium

Keywords: DRC, mpox, Sexual Transmission, APOBC3, Clade I, Pandemic

References*:* Main manuscript (**20**); Supplemental Online Methods (**5**)

Corresponding author:

Placide Mbala-Kingebeni, MD, PhD

Associate Professor, School of Medicine, University of Kinshasa (UNIKIN)

Department of Epidemiology and Global Health

Head of Pathogen Genomics Laboratory, Institute National de la Recherche Biomédicale (INRB).

Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

Phone: +243 822 851 584

E-Mail: Mbalaplacide@Gmail.Com

Institutional web page: https://inrb.net/

Alternative corresponding author:

Jean B. Nachega, MD, PhD, MPH, FRCP, DTM&H, FAAS

Associate Professor of Epidemiology, Infectious Diseases and Microbiology

Departments of Epidemiology and Center for Global Health

University of Pittsburgh School of Public Health

130 DeSoto Street, Crabtree Hall A532

Pittsburgh, PA 15261, USA

Phone : +1 240 234 0647 E-mail : jbn16@pitt.edu

Institutional web page: https://www.sph.pitt.edu/directory/jean-nachega

Received : 3 May 2024

Accepted : 11 June 2024

Published online: 13 june 2024

Nature Medicine :https://doi.org/10.1038/s41591-024-03130-3

Abstract

Outbreaks of mpox have historically resulted from zoonotic spillover of Clade I monkeypox virus (MPXV) in Central Africa and Clade II MPXV in West Africa. In 2022, subclade IIb caused a global epidemic linked to transmission through sexual contact. Here, we describe the epidemiological and genomic features of a an mpox outbreak in a mining region in the Eastern Democratic Republic of the Congo (DRC), caused by Clade I MPXV. Surveillance data collected between September 2023 and January 2024 identified 241 suspected cases. Genomic analysis demonstrates a distinct Clade I lineage divergent from previously circulating strains in the DRC. Of the 108 PCR-confirmed mpox cases, the median age of individuals was 22 years, 51.9% were female, and 29% were sex workers, suggesting a potential role for sexual transmission. The predominance of APOBEC3-type mutations and the estimated emergence time around mid-September 2023 imply recent sustained human-to-human transmission.

1. Main

Mpox attracted global attention in 2022 due to a widespread epidemic across non-endemic regions with transmission linked to sexual contact. For more than 50 years, mpox virus (MPXV) caused outbreaks in several endemic African countries, predominantly from zoonotic spillover with secondary transmission.[1] MPXV is an enveloped, double-stranded DNA virus of the *Poxviridae* family, which includes variola (the causative agent of smallpox, now eradicated), vaccinia (used in smallpox vaccination), and cowpox viruses. In humans, MPXV causes mpox, characterized by fever, lymphadenopathy, and vesiculo-papular rash. Two distinct genetic MPXV clades exist: Clade I mainly in Central Africa, especially the Democratic Republic of the Congo (DRC), and is associated with severe clinical symptoms and substantial mortality (4 - 11%).[2]

Whereas, Clade II, largely confined to West Africa until the 2022 global epidemic, causes less severe illness and lower mortality of <4%.[2]

Historically, Clade I MPXV has predominated, accounting for 95% of reported cases.[1] In 2017, a major outbreak of Clade IIb MPXV occurred in Nigeria, with sustained human-to-human transmission, including through sexual contact.[3] These findings were overlooked until a Clade IIb lineage —B.1[4]— spawned a global epidemic in May 2022, with 95,226 confirmed cases in 117 countries as of March 2024.[4] Genomic analyses of B.1 revealed a mutational pattern suggesting non-canonical evolution, driven by an apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic subunit 3 (APOBEC3) cytosine deamination, a characteristic feature of MPXV human-to-human transmission.[5,6] MPXV mutations have been confirmed *in vitro* as stemming from the apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3F (APOBEC3F)[7], suggesting that Clade IIb entered human populations as early as 2015. [6,7] As of April 2024, the global Clade IIb B.1 epidemic has largely subsided, although the virus continues to circulate in Nigeria and other countries.[4]

As Clade II outbreaks have waned, Clade I MPXV infections in Central Africa have been increasing,[4] especially in remote forest areas, likely from to zoonotic spillover with secondary human-to-human transmission within households.[8,9] Progressive annual increases in mpox cases were reported in the DRC, with a record 14,626 cases in 2023, possibly indicating a shift toward increased human-to-human transmission.[10] We recently documented a cluster of MPXV infections linked to sexual contact in the DRC.[11] Concurrently, new mpox cases have continued to emerge in several previously unaffected areas of the DRC. In September 2023, the first-ever mpox cases were detected in Kamituga Health Zone, a densely populated mining area in South Kivu province in Eastern DRC. Initial sequencing of six cases from January 2024 by Masirika *et al.*[12,13] revealed

the presence of a divergent lineage of Clade I. In this report, we describe the results of an investigation into this outbreak, including detailed genomic analysis of cases dating back to September 2023, to elucidate the origins and nature of this event.

Between September 29, 2023, and February 29, 2024, South Kivu's provincial surveillance authorities recorded 241 suspected cases that met the national case definition for mpox (***Figure 53A***). Most cases (93%) were in Kamituga Health Zone. Laboratory specimens from 119 (48.9%) of the patients hospitalized for mpox were collected for PCR testing. Of these, 108 (90.8%) were confirmed MPXV-positive. Demographic characteristics and clinical manifestations were similar between suspected and confirmed cases (***Tableau 16***).

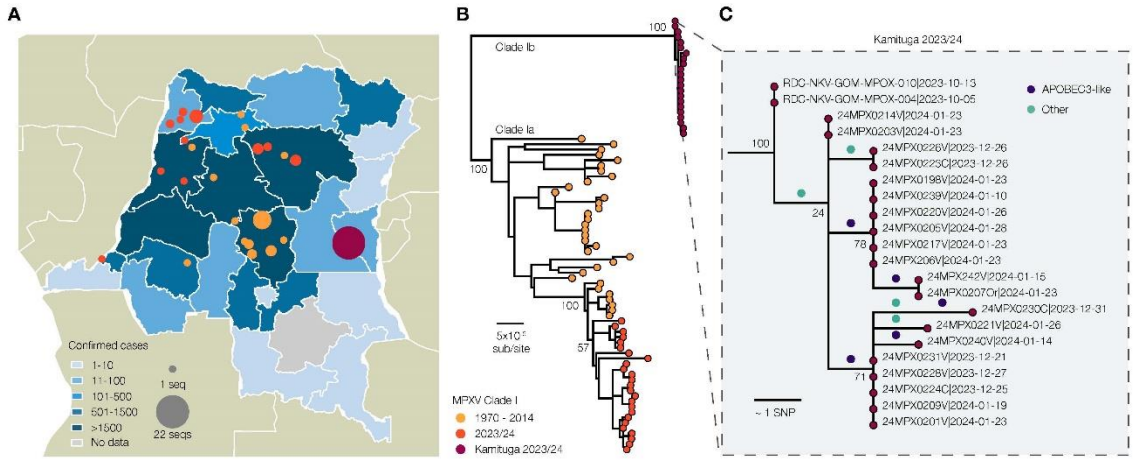


Figure 53 *: Mpox genomic surveillance in DRC in 2024*

*A) Map of the Democratic Republic of the Congo with Provinces colored by the number of reported cases. MPXV genomes available are indicated by colored circles (31 January 2024). These are placed at the centroid of the town, the health zone or the Province depending on the precision of the recorded location. B) Maximum likelihood phylogeny of Clade I genomes, including those from the present study (indicated as 2023/24 and Kamituga samples), with all previously sequenced genomes publicly available on GenBank. A version of this phylogeny where individual tips are labeled with accession numbers, locations and dates, can be found as Extended Data, **Figure 55**. C) The Kamituga cluster with reconstructed mutations indicated on the branches. Mutations are colored by whether they are consistent with APOBEC3 deamination (dark blue) or not (green).:*

Among individuals with PCR-confirmed mpox, the majority were female (56/108, 51.9%) and the median age was 22 years (IQR 18-27) (***Figure 53B***). Children <15 years constituted 14.8% (16/108) of confirmed cases, individuals aged 15-30 years accounted for 67% (73/108), and 17.6% (19/108) of cases were individuals 30-49 years. Additionally, 28.7% (31/108) of the confirmed cases and 29.5% (71/241) of all suspected cases indicated sex work as their profession during the survey conducted by the provisional health authorities (see methods). None among individuals with confirmed mpox had been vaccinated against smallpox, which was eliminated in the DRC in 1971 with vaccination campaigns ending in 1980 .[14]

The DRC Ministry of Public Health's investigation form for suspected mpox cases, included a limited number of clinical variables. All confirmed cases had a cutaneous rash, 64/108 (59%) had fever, and 45/108 (42%) had lymphadenopathy. Most suspected mpox cases (91%) were hospitalized mainly for isolation, not for disease severity. Among 108 confirmed cases, 10 (9.3%) were bedridden and 3 (2.7%) were known to be living with HIV (***Tableau 16***). We reviewed hospital records for 134 of 241 suspected cases to obtain additional clinical information. HIV status was known for 34.3 % (46/134), with 6.5% (3/46) positive. Eighty-five percent (114/134 patients) had genital lesions. Two patients with mpox (1.4%) died during hospitalization.

Near full-length MPXV genome sequences, including 12 with genome coverage above 99%, 3 between 95% and 99%, 2 between 90% and 95% and 5 between 80% and 89% were obtained from 22 patients examined during the outbreak investigation. Genomic analysis revealed that all MPXV strains isolated from Kamituga clustered tightly with each other on a distinct lineage from previously sequenced Clade I MPXV (***Figure 54***). The new lineage increases the known diversity of Clade I by an additional 54% (***Figure 56***). Within the clade that previously encompassed the entirety of Clade I, the maximum pairwise patristic distance totaled 4.89×10^{-4}

substitutions per site (equivalent to ~96 individual nucleotide changes). With the inclusion of genomes from the Kamituga outbreak, this increased to 7.55×10^{-4} substitutions per site, or ~149 nucleotide changes. Sequences from two MPXV samples, collected in 2011 and 2012 during an mpox outbreak in North-Kivu and South-Kivu provinces (15), clustered with the genomes sequenced in this study **(*Figure 55*).** However, due to limited genome coverage, their precise phylogenetic position relative to the Kamituga cluster could not be reliably determined.

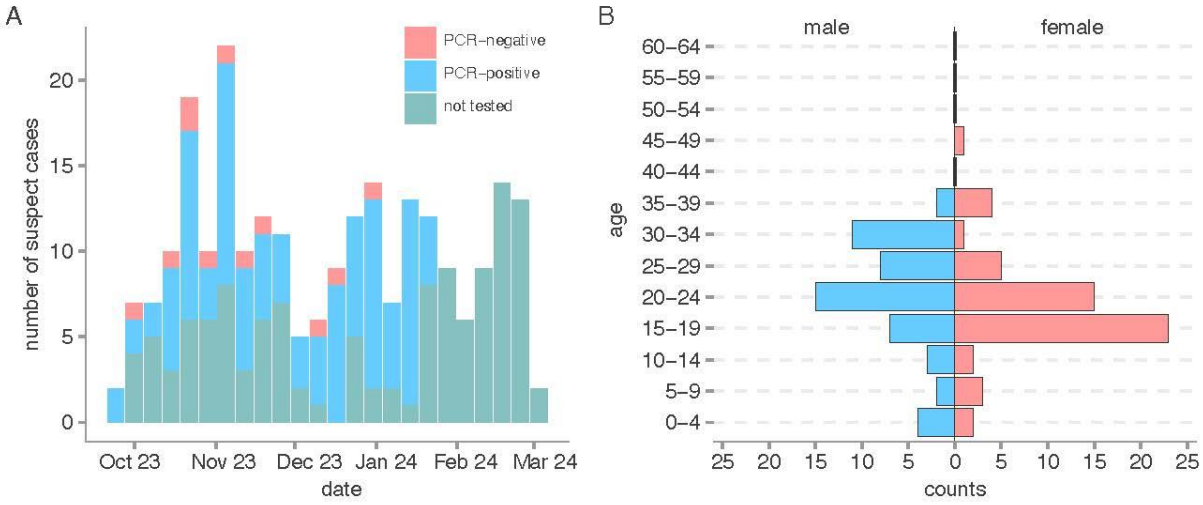


***Figure 54** : A) Epidemiologic curve of Kamituga mpox outbreak (October 2023 to March 2024), Democratic Republic of the Congo; B) Counts of suspected mpox cases disaggregated by age and sex (Male in blue; Female in pink).*

The 22 MPXV genome sequences from Kamituga formed a compact cluster with 9 reconstructed mutations (***Figure 53B*** and *Figure 53C*). Five of these mutations were consistent with APOBEC3-mediated cytosine deamination, indicating human-to-human transmission. Given the 8% rate of APOBEC3-like mutations in Clade I MPXV in reservoir hosts, fewer than one APOBEC3-type mutation would be expected out of nine[7]. Furthermore, if MPXV in this cluster continued to evolve as observed in rodent host species, the binomial probability of observing five

or more APOBEC3 mutations would be 0.0003. The predominance of APOBEC3-type mutations supports the finding that this entire cluster resulted from human-to-human transmission, while the low genomic diversity indicates recent outbreak.

Molecular clock analysis, using rate of evolution estimated for human Clade IIb MPXV outbreak [7], estimates that the most recent common ancestor of the Kamituga genomes existed around mid-September 2023, consistent with the earliest reported cases. However, the credible intervals of this estimate cannot rule out a date as early as July 2023 (mean estimate 13-Sep-2023 with 95% highest posterior density (HPD) intervals of 9-Jul-2023 to 3-Oct-2023). The estimated exponential growth rate was 10.8 per year (doubling time: 23 days), but the 95% HPD intervals include zero.

To compare strains isolated in Kamituga with those from the rest of the country we included an additional 25 isolates from other provinces, collected from late 2023 to early 2024. These sequences aligned with previous Clade I diversity (proposed to be identified as Clade Ia), indicating no connection to the Kamituga mpox outbreak (***Figure 54B***). Furthermore, the proportion of APOBEC3-type mutations compared to other mutations in samples collected outside the Kamituga area was only 15.3% (15 of 98 observed mutations), suggesting limited human-to-human transmission in those areas.

This report describes a novel Clade I MPXV lineage linked to sustained human-to-human transmission in an ongoing outbreak in eastern DRC. Identification of APOBEC3-related mutations – a hallmark of MPXV human-to-human transmission[7] – bolsters this assertion. Due to its distinct geographical location and phylogenetic divergence, we propose naming this lineage Clade Ib, with the previously described Clade I renamed Clade Ia (Clade I now encompassing both Ia and Ib). The distinction between Clades IIa and IIb was made based on a similar rationale.[16]

Of note, a large ~1 kbp deletion in the MPXV genome (Δ19,128-20,270 coordinates relative to the Clade I reference genome, GenBank accession: NC_003310) has been reported in genome sequences from Kamituga linked to this outbreak,[13] specifically in the OPG032 gene and interfering with the Clade I-specific diagnostic PCR originally developed by Li *et al.*[17] The new genomes associated with the Kamituga outbreak also contain this deletion, implying that all genomes sampled from proposed Clade Ib thus far exhibit this deletion and will not amplify with the specific diagnostic. Conversely, the MPXV Clade Ia genomes we sampled from 2023/2024 did not contain this deletion. Two mpox samples from a 2011-2012 outbreak in North-Kivu and South-Kivu provinces [15] clustered with the Kamituga outbreak genomes, but only five gene fragments were sequenced (with no coverage of the deleted region). We cannot therefore affirm whether this is a recent deletion specific to this outbreak or whether it is a viral feature of a non-human animal reservoir for this lineage. Although the proposed Clade Ib is currently only represented by genomes from the Kamituga outbreak, the short fragmentary sequences isolated from earlier zoonotic mpox cases in the area suggest that this lineage likely pre-existed in a local, non-human animal reservoir.[15]

Strengths of our study include novel and high-quality viral genomic sequencing performed at quality-controlled national and international laboratories in endemic mpox regions. However, limitations include the sparse availability of comprehensive clinical and demographic patient information in this retrospective case series. Despite these constraints, our data suggest that transmission in this outbreak was primarily linked to sexual contact: first, most affected individuals were adolescents and young adults, unlike previous DRC mpox outbreaks, in which children <15 years were most affected;[18,19] second, professional sex workers were disproportionately affected;

finally, hospital records indicate that most cases presented with genital lesions compatible with viral infection.

The sustained spread of Clade I MPXV in Kamituga, a densely populated, poor mining region, raises significant concerns. The local healthcare infrastructure is ill-equipped to handle a large-scale epidemic, compounded by limited access to external aid. The 241 reported cases are likely an underestimate of the true incidence of mpox cases occurring in the area. In conversations with local healthcare workers, they reported that many additional people in the community had mpox symptoms but did not seek care.

Frequent travel occurs between Kamituga and the nearby city of Bukavu, with subsequent movement to neighboring countries such as Rwanda and Burundi. Moreover, sex workers operating in Kamituga represent several nationalities and frequently return to their countries of origin. Although there is no current evidence of wider dissemination of the outbreak, the highly mobile nature of this mining population poses a substantial risk of escalation beyond the current area and across borders. The international spread of Clade I MPXV is particularly concerning due to its higher virulence compared to Clade II. Among the 241 cases documented, two patients died, indicating a higher case fatality rate than the global Clade IIb outbreak, but lower than the current Clade Ia outbreaks (4.6% reported among suspect cases in the DRC in 2024). This may be because Clade Ib more often affects adults compared to Clade Ia. However, additional data is needed to accurately assess Clade Ib infection severity.

Our data confirm human-to-human transmission in MPXV genomes from Kamituga, supporting epidemiological findings of sexual contact transmission. However, this cluster of patients in Kamituga represents a minority of mpox cases reported during the 2022/2023 MPXV surge in the DRC. Genomic evidence demonstrates that most cases were not due to a single human

outbreak or increased transmissibility from virus changes, but instead due to several independent spillover events with subsequent secondary and onward transmission from reservoir hosts. It is unclear why this surge in Kamituga cases has occurred, and further investigation is needed to understand the drivers of these spillover events.

The situation in Kamituga echoes the 2017-2018 outbreak of Clade IIb MPXV in Nigeria. Without intervention, this localized Kamituga outbreak harbors the potential to spread nationally and internationally. Urgent measures must be implemented, including intensifying local surveillance, enhancing community engagement and case management, and implementing targeted mpox vaccination for individuals at risk, such as contacts of index cases, HCWs, and key populations, including sex workers and men who have sex with men.[20] Given the recent history of mpox outbreaks in the DRC, we advocate for swift action by endemic countries and the international community to avert broader geographic expansion of Clade I MPXV both regionally and globally, with special attention to the needs of vulnerable key populations.

2. Online Methods

Research ethics committee approval

This study used anonymized data and samples from mpox surveillance activities, outbreak response surveys, and retrospective medical chart reviews. The secondary use of surveillance data and samples was approved by the Ethics Research Committee of the University of Kinshasa School of Public Health (Approval ID: ESP/CE/78/2024). As part of surveillance activities, individuals were investigated, and diagnostic samples were collected by. health officials from the national mpox program or provincial health authorities. Patients consented orally to the collection of information and samples. Since the analyses conducted in this study were done retrospectively and

the information and diagnostic samples were collected for surveillance and clinical care purposes, no written informed consent for research was provided by the patients.

Population and setting

This study included patients hospitalized at the General Hospital of Kamituga, a gold mining town with approximately 242,000 inhabitants.

Sampling and Data Collection

In January 2024, a multidisciplinary team comprising representatives from the Ministry of Public Health, provincial health authorities, the National Institute for Biomedical Research (INRB) and the Institute of Tropical Medicine (ITM) investigated the mpox outbreak in Kamituga. We collated mpox monitoring data collected by provincial surveillance authorities. Local surveillance teams investigated and collected data from each suspected mpox case using a standardized Ministry of Public Health and Prevention form, which contains questions on demographics (age, sex, residence, profession, nationality), clinical symptoms, outcome, and type of sample and collection date. For additional clinical data, we reviewed medical records of patients with suspected mpox admitted to the hospital between October 6, 2023, and January 23, 2024.

We then conducted interviews with local HCWs and local provincial and municipal health authorities. The INRB team interviewed and examined patients with suspected mpox, collecting samples from blood, skin lesions, and oropharyngeal swabs for molecular diagnosis. Real-time PCR assays were performed at INRB Goma using the Light Mix Modular Monkeypox virus kit (Roche, Germany) according to manufacturer's instructions.

The DRC national case definition was used for defining suspected mpox cases: an individual with a vesicular or pustular rash with deep-seated, firm pustules, and ≥1 of the following

symptoms: fever preceding the eruption, lymphadenopathy (inguinal, axillary, or cervical), or pustules or crusts on hand palms or foot soles. A confirmed mpox case was identified when laboratory testing confirmed the presence of MPXV in the patient's specimen, by real-time PCR and/or sequencing, following the diagnosis of a suspected case.[21] However, not all suspected cases of mpox were confirmed through PCR testing due to resource constraint in this setting.

MPXV Genome Sequencing

Sequencing was performed at the INRB's Pathogen Genomics lab in Kinshasa. Samples testing positive with Cycle threshold (Ct) values <31 underwent sequencing using Illumina DNA Prep with Enrichment kit (Illumina) and Comprehensive Viral Research Panel (Twist Biosciences). Following the manufacturer's protocol, libraries were prepared and loaded onto the NextSeq 2000 sequencer. FASTQ files were processed through GeVarLi (*https://forge.ird.fr/transvihmi/nfernandez/GeVarLi*), CZid (*https://czid.org/*) and iVar pipelines for read quality control, consensus genome coverage, and variant calling using a Clade I reference genome (an early MPXV genome from DRC, accession: NC_003310).

Phylogenetic analysis

We compiled a dataset including all high-quality Clade I MPXV genome sequences from GenBank (accessions and author list in ***Tableau 17***) and used Clade IIa MPXV genomes from Nigeria dated 1978 and 1971 as outgroups (accession numbers KJ642615 and KJ642617, respectively). We estimated a maximum likelihood phylogeny using IQ-TREE 2 version 2.2.522 with the HKY substitution model.[23] Ancestral reconstruction was performed for each internal node on phylogeny using IQ-TREE 2, enabling mapping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) along branches. SNPs were categorized based on whether they were consistent with the signature

of APOBEC3-editing, assuming this process induced specific mutations (TC→TT and GA→AA). To estimate the date of the most recent common ancestor of the Kamituga MPXV genomes, and thus a bound on when the outbreak started, we followed the method described by O'Toole *et al.*[7] implemented in BEAST v1.10.4[24] with BEAGLE v4.0[25]. This approach divides the alignment into a partition containing all the sites that could potentially be edited by APOBEC3 and a partition containing the remaining sites. This allows faster rate of evolution for the accumulation of APOBEC3 induced mutations than the background rate resulting from replication errors. As there is insufficient temporal information in these data to independently estimate the rate of evolution, we constrained the rates of these two partitions using posterior estimates from O'Toole *et al.*[7] (approximated by a normal with mean 1.3×10^{-4} substitutions/site/year and standard deviation 1.0×10^{-4}; and mean 4.2×10^{-6} and standard deviation 0.49×10^{-6}, respectively). We used an exponential growth coalescent model as a prior on the tree. Finally, we estimated a maximum likelihood phylogeny of a sample of all Clade I, IIa and Ib to look for relative divergence within and between clades for comparison with the divergence of putative Clades Ia and Ib (***Figure 56*** : maximum patristic distance in the maximum likelihood phylogeny).

Data Availability

All epidemiological data produced in this study are de-identified and available upon request to the authors. Sequencing data are publicly accessible at *https://github.com/inrb-labgenpath/mpox_sequencing_Kamituga*, and the 47 complete or near full-length MPXV genomes from this study have been deposited in the NCBI GenBank repository under accession numbers PP601182-PP601228 (see ***Tableau 18*** and ***Tableau 19***).

Acknowledgments : We thank John L. Johnson, MD, Case Western Reserve University, CL, OH, USA; Philip J Rosenthal, MD and Monica Gandhi, MD, University of California San Francisco, CA, USA; Michel P. Hermans, MD, PhD, Université Catholique Louvain, Brussels, Belgium; and Wolfgang Preiser, MD, PhD, Stellenbosch University, Cape Town, South Africa; and Lee Harrison, MD, University of Pittsburgh, PA, USA; as well as Rosamund Lewis, MDCM, MSc, World Health Organization, Geneva, Switzerland, for critical review of the manuscript. We are sincerely grateful to all Kamituga staff involved in the management of this outbreak, the health division province in South Kivu, and the DRC's Ministry of Public Health. Thanks also to the clinical and provincial staff in Kamituga (Justin Bengehya Mbiribindi, Gaston Lubambo, Willy Kasi), Leandre Murhula Masirika for providing sampling kits, and the logistics team in Goma for helping with the transfer of samples to Kinshasa. We also acknowledge the support of Elise Muyamuna, Sophie Gabia, Andre Citenga, Francisca Muyembe, Ola Rilia, Gradi Luakanda, Emmanuel Lokilo, Princesse Paku, Sifa Kavira, Michel Kenye, Raphael Lumembe and Gabriel Kabamba. We also thank all members of the mpoxReC as well as members of the Africa Pathogen Genomics Initiative (CARES), AFROSCREEN, DTRA, USDA, and IMReC for supporting the outbreak response and the genomic surveillance in DRC.

Author Contributions : EHV, CK, EKL, AOT, LL, JBN, AR, PMK, and NH drafted one or more sections of the manuscript. EHV, CK, NMB, FMK, LMM, FBS, YM, SSN, OA, IB, EB, and LL conducted field epidemiological investigations and data collection. DMB, AAA, PCMK, NM, EPS, PAB, and HK supported analysis. AOT, TWB, DMB, JCMC, EKL, DMB, AAA, PCMK, JCMKC, NMM, EPS, PAB, AR, PMK, KV supported genomic analysis, and contributed to the

review and editing of the manuscript. EHV, CK, EKL, AOT, AR, PMK, LL, YM, IB, EB supported data analysis. AWR, LEH, JK, MP, ED, RSL, SAM, HK, JBN JJMT, LL, PMK supervised the field work. All authors contributed to the writing, revisions, and approval of the final version of the manuscript.

Inclusion & ethics statement: All collaborators in this study meet the authorship criteria specified by Nature Portfolio journals and have been listed as authors, given their vital contributions to the study's design and execution. Roles and responsibilities were defined collectively prior to the research. Our findings hold global significance and were identified in conjunction with local and international research collaborators. This research was conducted without severe restrictions or prohibitions and posed no risks of stigma, incrimination, discrimination, or personal harm to participants. We have considered relevant local and regional research in our citations.

Competing Interests: None of the other authors declare competing interests.

Funding : This work was funded by the Belgian Directorate-general Development Cooperation and Humanitarian Aid and the Research Foundation - Flanders (FWO, grant number G096222 N to L.L.); the International mpox Research Consortium (IMReC) through funding from the Canadian Institutes of Health Research and International Development Research Centre (grant no. MRR-184813); Department of Defense, Defense Threat Reduction Agency, Monkeypox Threat Reduction Network; and USDA Non-Assistance Cooperative Agreement #20230048; Africa Pathogen Genomics Initiative helped acquiring and maintaining the sequencer; Agence Française de Dévelopement through the AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209, coordinated by ANRS-MIE Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut de Recherche pour le

Développement (IRD) and Pasteur Institute) for laboratory support and PANAFPOX project funded by ANRS-MIE. JBN is supported by the US National Institutes of Health (NIH; grant numbers NIH/FIC 1R25TW011217-01, NIH/FIC 1D43TW010937-01A1, NIH/FIC D43TW011827-01A1, NIH/FIC 1R21TW011706-0, and NIH/NIAID 5U01AI096299-13). ELM acknowledges the support of the NIH (R01AI182082-01). E.L. received a PhD grant from the French Foreign Office. A.O.T. and A.R. acknowledge the support of the Wellcome Trust (Collaborators Award 206298/Z/17/Z, ARTIC network).

References

1. Van Dijck C, Hoff NA, Mbala-Kingebeni P, et al. Emergence of mpox in the post-smallpox era-a narrative review on mpox epidemiology. Clin Microbiol Infect 2023;29(12):1487-1492. (In eng). DOI: 10.1016/j.cmi.2023.08.008.
2. Bunge EM, Hoet B, Chen L, et al. The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. PLOS Neglected Tropical Diseases 2022;16(2):e0010141. DOI: 10.1371/journal.pntd.0010141.
3. Ogoina D, Izibewule JH, Ogunleye A, et al. The 2017 human monkeypox outbreak in Nigeria-Report of outbreak experience and response in the Niger Delta University Teaching Hospital, Bayelsa State, Nigeria. PLoS One 2019;14(4):e0214229. (In eng). DOI: 10.1371/journal.pone.0214229.
4. World Health Organization. 2022-24 mpox (monkeypox) Outbreak: Global Trends. (https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/).
5. Isidro J, Borges V, Pinto M, et al. Phylogenomic characterization and signs of microevolution in the 2022 multi-country outbreak of monkeypox virus. Nat Med 2022;28(8):1569-1572. DOI: 10.1038/s41591-022-01907-y.
6. O'Toole Á, Neher RA, Ndodo N, et al. APOBEC3 deaminase editing in mpox virus as evidence for sustained human transmission since at least 2016. Science 2023;382(6670):595-600. (In eng). DOI: 10.1126/science.adg8116.
7. Suspène R, Raymond KA, Boutin L, et al. APOBEC3F Is a Mutational Driver of the Human Monkeypox Virus Identified in the 2022 Outbreak. J Infect Dis 2023;228(10):1421-1429. (In eng). DOI: 10.1093/infdis/jiad165.
8. Whitehouse ER, Bonwitt J, Hughes CM, et al. Clinical and Epidemiological Findings from Enhanced Monkeypox Surveillance in Tshuapa Province, Democratic Republic of the Congo During 2011-2015. J Infect Dis 2021;223(11):1870-1878. DOI: 10.1093/infdis/jiab133.
9. Charniga K, McCollum AM, Hughes CM, et al. Updating Reproduction Number Estimates for mpox in the Democratic Republic of the Congo Using Surveillance Data. Am J Trop Med Hyg 2024;110(3):561-568. DOI: 10.4269/ajtmh.23-0215.
10. Relief Web. Rapport de la situation épidémiologique de la variole simienne - sitrep no 1, 5-11 février 2024. (https://reliefweb.int/report/democratic-republic-congo/dr-congo-rapport-de-la-situation-epidemiologiue-de-la-variole-simienne-sitrep-no-1-5-11-fevrier-2024).
11. Kibungu EM, Vakaniaki EH, Kinganda-Lusamaki E, et al. Clade I-Associated mpox Cases Associated with Sexual Contact, the Democratic Republic of the Congo. Emerg Infect Dis 2024;30(1):172-176. (In eng). DOI: 10.3201/eid3001.231164.

12. Masirika LM, Udahemuka JC, Schuele L, et al. Ongoing mpox outbreak in Kamituga, South Kivu province, associated with monkeypox virus of a novel Clade I sub-lineage, Democratic Republic of the Congo, 2024. Euro Surveill 2024;29(11). DOI: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.11.2400106.
13. Masirika LM, Kumar A, Dutt M, et al. Complete Genome Sequencing, Annotation, and Mutational Profiling of the Novel Clade I Human mpox Virus, Kamituga Strain. J Infect Dev Ctries. 2024 Apr 30;18(4):600-608.
14. Fenner F, Henderson DA, Arita I, Jezek Z, Ladnyi ID. World Health Organization. 1988. Ch 18. Pp 921. Fig 18.4. (ISBN 9241561106). https://iris.who.int/handle/10665/39485
15. McCollum AM, Nakazawa Y, Ndongala GM, et al. Human Monkeypox in the Kivus, a Conflict Region of the Democratic Republic of the Congo. Am J Trop Med Hyg 2015;93(4):718-21. DOI: 10.4269/ajtmh.15-0095.
16. Ulaeto D, Agafonov A, Burchfield J, Carter L, Happi C, Jakob R, Krpelanova E, Kuppalli K, Lefkowitz EJ, Mauldin MR, de Oliveira T, Onoja B, Otieno J, Rambaut A, Subissi L, Yinka-Ogunleye A, Lewis RF. New nomenclature for mpox (monkeypox) and monkeypox virus clades. Lancet Infect Dis. 2023 Mar;23(3):273-275.
17. Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J Virol Methods. 2010 Oct;169(1):223-7
18. World Health Organization. 2022-24 mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends. (https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#2_Global_situation_update).
19. Sam-Agudu NA, Martyn-Dickens C, Ewa AU. A global update of mpox (monkeypox) in children. Current Opinion in Pediatrics 2023:10.1097/MOP.0000000000001232. DOI: 10.1097/mop.0000000000001232.
20. Nachega JB, Mbala-Kingebeni P, Rosenthal PJ, et al. The Human mpox Global Outbreak: Available Control Tools and the Opportunity to Break a Cycle of Neglect in Endemic Countries. Am J Trop Med Hyg 2023;109(4):719-724. (In eng). DOI: 10.4269/ajtmh.23-0161.
21. World Health Organization: Integrated Disease Surveillance and Response Technical Guidelines, Booklet One: Introduction Section. Brazzaville: WHO Regional Office for Africa; 2019
22. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol 2020;37(5):1530-1534. (In eng). DOI: 10.1093/molbev/msaa015.

23. Hasegawa M, Kishino H, Yano T. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. J Mol Evol 1985;22(2):160-74. DOI: 10.1007/BF02101694.
24. Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. Virus Evolution. vey016. DOI:10.1093/ve/vey016
25. Ayres DL, Cummings MP, Baele G, Darling AE, Lewis PO, Swofford DL, Huelsenbeck JP, Lemey P, Rambaut A, Suchard MA (2019) BEAGLE 3: Improved performance, scaling and usability for a high-performance computing library for statistical phylogenetics. Systematic Biology. 68, 1052-1061

Supplementary information



Figure 55 *: maximum likelihood phylogeny using IQTREE2, including all high quality MPXV Clade I genome sequences available on GenBank*

We estimated a labeled maximum likelihood phylogeny using IQTREE2, including all high quality MPXV Clade I genome sequences available on GenBank. We also include a set of sequences constructed from fragments sequenced from an outbreak in Sud-Kivu and Nord-Kivu, reported in 2011/2012 (McCollum et al 2015, doi: 10.4269/ajtmh.15-0095). These fragments represent only a small portion of the genome (five genes); the samples' exact positions on the phylogeny cannot be reliably reconstructed. With the available data, however, we can assert that two of the samples cluster with the recent MPXV sequences from Sud-Kivu (proposed Clade Ib), and, although divergent from the current outbreak, they likely represent some of the reservoir diversity present in the area surrounding the Kivu provinces (I14 and I37). The third sequenced sample from the 2011/2012 outbreak (I38) does not cluster with this diversity and lies in the distinct proposed Clade Ia.

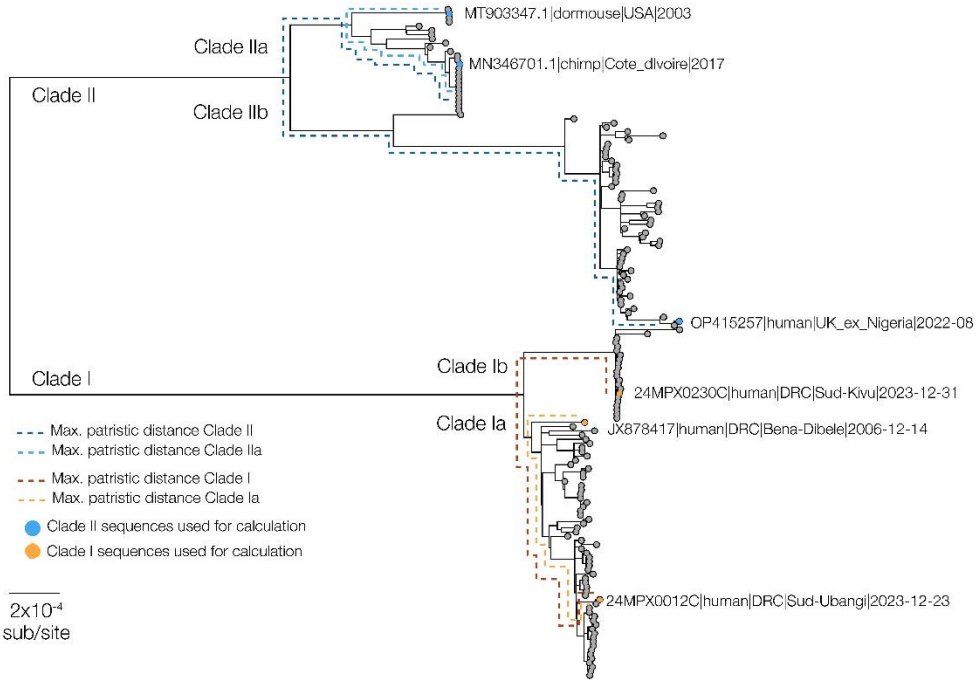


Figure 56 *: maximum patristic distance in the maximum likelihood phylogeny*

MPXV clades are indicated, including proposed Clade Ib, in the maximum likelihood phylogeny used to calculate maximum patristic distance and the increase in that with the addition of Clade IIb to Clade II and Clade IIb to Clade I. The sequences algorithmically identified for the calculation are indicated, and the backbone used for the pairwise calculations are marked with a dashed line.

Extended Data

Tableau 16 *: Clinical and demographic characteristics of mpox suspected and confirmed cases*

Characteristic	Suspected cases n = 241	Confirmed cases n = 108
Health zone where the diagnosis was made – no. (%)		
Kamituga	224 (93%)	103 (95%)
Other	17 (7.1%)	5 (4.6%)
Age (years) – median (IQR)	21 (18, 28)	22 (18, 27)
Sex – no. (%)		
Female	128 (54%)	56 (52%)
Male	111 (46%)	52 (48%)
Unknown	2	0
Professional sex worker – no. (%)	71 (29.5%)	31 (28.7% %)
Smallpox vaccinated – no. (%)		
No	239 (100%)	108 (100%)
Unknown	2	0
Nationality – no. (%)		
Congolese	217 (99%)	92 (99%)
Rwandese	1 (0.5%)	1 (1.1%)
Burundese	2 (0.9%)	0 (0%)
Unknown	21	15
Hospitalized – no. (%)		
Yes	217 (91%)	104 (96%)
No	22 (9.2%)	4 (3.7%)
Unknown	2	
Bedridden – no. (%)		
Yes	9 (3.8%)	10 (9.3%)
No	224 (95%)	98 (91%)
Unknown	3	0
Fever at presentation – no. (%)		
Yes	148 (62%)	64 (59%)
No	91 (38%)	44 (41%)
Unknown	2	0 (0%)
Skin rash at presentation – no. (%)		
Yes	239 (100%)	108 (100%)

Characteristic	Suspected cases n = 241	Confirmed cases n = 108
No	0 (0%)	0 (0%)
Unknown	0	0
Cough at presentation – no. (%)		
Yes	41 (18%)	20 (19%)
No	191 (82%)	85 (81%)
Unknown	9	3
Adenopathy at presentation – no. (%)		
Yes	99 (42%)	45 (42%)
No	138 (58%)	62 (58%)
Unknown	4	1
Throat ache at presentation – no. (%)		
Yes	57 (24%)	29 (27%)
No	180 (76%)	78 (73%)
Unknown	4	1
Oral ulcers at presentation – no. (%)		
Yes	24 (10%)	13 (12%)
No	213 (90%)	94 (88%)
Unknown	4	1
Headache at presentation – no. (%)		
Yes	43 (18%)	19 (18%)
No	194 (82%)	88 (82%)
Unknown	4	1
Myalgia at presentation – no. (%)		
Yes	41 (17%)	20 (19%)
No	196 (83%)	87 (81%)
Unknown	4	1
Fatigue at presentation – no. (%)		
Yes	30 (13%)	19 (18%)
No	207 (87%)	88 (82%)
Unknown	4	1
Conjunctivitis at presentation – no. (%)		
Yes	9 (3.8%)	8 (7.4%)
No	229 (96%)	100 (93%)
Unknown	3	0

Tableau 17 *: Previously published MPXV genomes used in this study with NCBI Genbank accession number (Accession), country of origin (Country), top level administration region (Admin 1), date of sample collection to highest known precision (Date), reference for the genome sequence (Genome Reference), and reference for case description were available (Case Reference).*

Accession	Country	Admin 1	Date	Genome reference	Case reference
KJ642618	Cameroon	Centre	1989-12-11	Nakazawa et al. 2015	Tchokoteu et al. 1991
KJ642613	DRC	Equateur	1970-09-01	Nakazawa et al. 2015	Ladnyj et al. 1972
DQ011155	DRC	Sankuru	1978-11-09	Likos et al. 2005	Breman et al. 1980
NC_003310	DRC	Sankuru	1996	Senkevich et al. 2021	Mukinda et al. 1997
DQ011154	Congo	Likouala	2003-06-09	Likos et al. 2005	Likos et al. 2005
KJ642612	DRC	Mongala	1986	Nakazawa et al. 2015	Jezek et al. 1987
KC257460	DRC	Mongala	1985	Nakazawa et al. 2015	Jezek et al. 1987
KJ642619	Gabon	Moyen-Ogooue	1987-06	Nakazawa et al. 2015	Müller et al. 1988
JX878417	DRC	Sankuru	2006-12-14	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878408	DRC	Sankuru	2006-10-31	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878423	DRC	Sankuru	2007-03-25	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878424	DRC	Sankuru	2007-03-25	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878426	DRC	Sankuru	2007-05-27	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878413	DRC	Sankuru	2006-12-14	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878414	DRC	Sankuru	2006-12-14	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878415	DRC	Sankuru	2006-12-26	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878416	DRC	Sankuru	2006-12-26	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878421	DRC	Sankuru	2007-03-22	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878422	DRC	Sankuru	2007-03-20	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014

Accession	Country	Admin 1	Date	Genome reference	Case reference
JX878425	DRC	Sankuru	2007-04-20	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878427	DRC	Sankuru	2007-05-25	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878428	DRC	Sankuru	2007-06-30	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878429	DRC	Sankuru	2007-09-04	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878418	DRC	Sankuru	2007-01-02	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878419	DRC	Sankuru	2007-12-10	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878420	DRC	Sankuru	2007-02-26	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878407	DRC	Sankuru	2006-10-09	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878409	DRC	Sankuru	2006-11-09	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878410	DRC	Sankuru	2006-11-24	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878411	DRC	Sankuru	2006-11-30	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
JX878412	DRC	Sankuru	2006-11-30	Kugelman et al. 2014	Kugelman et al. 2014
MT724770	DRC	Tshopo	2014	Mariën et al. 2021	Mariën et al. 2021
MT724772	DRC	Tshopo	2014	Mariën et al. 2021	Mariën et al. 2021
KP849469	DRC	Tshuapa	2008	Nakazawa et al. 2015	
KP849471	DRC	Yambuku	1985-07	Nakazawa et al. 2015	Khodakevich et al. 1986

Tableau 18 *: NCBI Genbank accession number (Accession) for sequences generated during this study*

Accession	Isolate	Clade	Country	Province	Health zone	Collection date
PP601182	23MPX1740C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Tandala	November 2023
PP601183	23MPX1766C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bokonzi	November 2023
PP601184	23MPX1769C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bokonzi	November 2023
PP601185	23MPX1786C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Tandala	December 2023
PP601186	23MPX1793V	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bangabola	December 2023
PP601187	23MPX1806V	Ia	DRC	Kinshasa	Kintambo	December 2023
PP601188	24MPX0008V	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bangabola	December 2023
PP601189	24MPX0009C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bulu	December 2023
PP601190	24MPX0012C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bulu	December 2023
PP601191	24MPX0014C	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bulu	December 2023
PP601192	24MPX0018V	Ia	DRC	Tshopo	Yahuma	January 2024
PP601193	24MPX0024C	Ia	DRC	Tshopo	Yahuma	December 2023
PP601194	24MPX0025V	Ia	DRC	Tshopo	Yahuma	December 2023
PP601195	24MPX0026V	Ia	DRC	Tshopo	Yahuma	December 2023
PP601196	24MPX0037V	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bulu	January 2024
PP601197	24MPX0038V	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bulu	January 2024
PP601198	24MPX0041V	Ia	DRC	Sud-Ubangi	Bulu	January 2024
PP601199	24MPX0164V	Ia	DRC	Tshopo	Basoko	January 2024
PP601200	24MPX0166C	Ia	DRC	Tshopo	Basoko	January 2024
PP601201	24MPX0168V	Ia	DRC	Tshopo	Yakusu	January 2024
PP601202	24MPX0169C	Ia	DRC	Tshopo	Yakusu	January 2024
PP601203	24MPX0174C	Ia	DRC	Tshopo	Yakusu	January 2024
PP601204	24MPX0175V	Ia	DRC	Tshopo	Yakusu	January 2024
PP601205	24MPX0188V	Ia	DRC	Equateur	Lotumbe	January 2024
PP601206	24MPX0194V	Ia	DRC	Equateur	Wangata	January 2024
PP601207	24MPX0198V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601208	24MPX0201V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601209	24MPX0203V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601210	24MPX0205V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601211	24MPX0206V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024

Accession	Isolate	Clade	Country	Province	Health zone	Collection date
PP601212	24MPX0207Or	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601213	24MPX0209V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601214	24MPX0214V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601215	24MPX0217V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601216	24MPX0220V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601217	24MPX0221V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601218	24MPX0223C	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	December 2023
PP601219	24MPX0224C	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	December 2023
PP601220	24MPX0226V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	December 2023
PP601221	24MPX0228V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	December 2023
PP601222	24MPX0230C	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	December 2023
PP601223	24MPX0231V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	December 2023
PP601224	24MPX0239V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601225	24MPX0240V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601226	24MPX0242V	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	January 2024
PP601227	RDC-NKV-GOM-MPOX-004	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	October 2023
PP601228	RDC-NKV-GOM-MPOX-010	Ib	DRC	Sud-Kivu	Kamituga	October 2023

Tableau 19 *: Reconstructed Mutations in Outbreak Genomes*

Genomes	Nucleotide	Gene	Amino Acid	APOBEC3
242V, 0207Or	C4025T			TC->TT
242V, 0198V, 0239V, 0220V, 0217V, 206V, 0207Or, 0205V	C13862T	OPG025	E528K	TC->TT
0240V	G57493A	MPXVgp059	S28L	GA->AA
0230C	G89161A			GA->AA
0240V, 0231V, 0230C, 0228V, 0224C, 0221V, 0209V, 0201V	G115644A			GA->AA
0230C	A127779C	OPG145	K464E	
All but October	C168528A			
0226V, 0223C	A170739G	OPG193	T249A	
0221V	G186202A			

1 Genomes that share this mutation
2 Nucleotide position in genome
3 Gene for non-synonymous mutations
4 Amino acid residue mutation
5 APOBEC3 context (not APOBEC3 if missing)

Chapitre 6 : Premiers cas importés de MPXV Clade Ib à Goma, en République démocratique du Congo : implications pour la surveillance mondiale et la dynamique de transmission

6.1.Résumé

Contexte :

L'émergence du Clade Ib du MPXV, qui est lié à une transmission interhumaine plus soutenue, a été associée à des impacts croissants sur la santé publique dans l'est de la RDC. Identifié pour la première fois dans la province du Sud-Kivu, le Clade Ib a été rapporté pour la première fois dans plusieurs pays d'Afrique de l'Est non endémiques, voire même en dehors de l'Afrique (Suède, Thaïllande, Inde). En RDC, des inquiétudes ont été exprimées quant à une expansion plus large du clade Ib dans le pays, ce qui pourrait compliquer davantage les mesures de riposte visant au contrôle de la souche par la rupture de chaines de transmission débouchant sur le confinement et l'atténuation de la morbidité.

Résultats et conclusion :

Cette investigation compile un rapport épidémiologique des 9 premières introductions du clade Ib dans la province du Nord-Kivu, y compris au sein des camps de déplacés internes. De ces 9 patients qui incluent les contacts non intimes et les enfants, 6 échantillons de 3 patients ont confirmé qu'il s'agissait des souches du clade Ib avec un nombre plus important de mutations de type APOBEC3, suggestive d'une transmission interhumaine. Ces résultats démontrent que les enquêtes sur les cas de mpox et les campagnes de communication communautaire devraient aussi tenir compte de la transmission non sexuelle du clade Ib par contact qui inclut les enfants de < 15 ans.

6.2. Article, preprint MedRix, 2024

First imported Cases of MPXV Clade Ib in Goma, Democratic Republic of the Congo: Implications for Global Surveillance and Transmission Dynamics

Daniel Mukadi-Bamuleka[1, 2], **Eddy Kinganda-Lusamaki[1,3,4]**, Noella Mulopo-Mukanya[2], Adrienne Amuri-Aziza[3], Áine O'Toole[5], Brigitte Modadra-Madakpa[2], Guy Mutombo Ndongala[6], Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki[3], Sydney Merritt[7], Cris Kacita[8], Gaston Lubambo Maboko[6], Jean-Claude Makangara-Cigolo[1, 3], Michel Ngimba[2], Emmanuel Lokilo[3], Elisabeth Pukuta-Simbu[3], Gradi Luakanda[3], Tavia Bodisa-Matamu[2], Zephanie Paluku Kalimuli[2], Prince Akil-Bandali[3], Sifa Kavira[3], Daan Jansen[9], Adèle Kavira Kamaliro[3], Emile Muhindo-Milonde[3], Jeriel Mufungizi[2], Yves Birindwa Hamisi[2], Hugo Kavunga[2], Olivier Tshiani[3], Sabin S. Nundu[3], Laurens Liesenborghs[9], Nicole A. Hoff[7], Jean Nachega[10], Robert Shongo[8], Ahidjo Ayouba[4], Genay Pilarowski[11], Alain Kakule Mangolopa[12], Amos Kiuka Ebondo[12], Nicola Low[13], Souradet Y. Shaw[14], Sam Wilkinson[15], Sofonias Kifle Tessema[16], Lorenzo Subissi[12], Eric Delaporte[4], Koen Vercauteren[9], Tony Wawina-Bokalanga[1, 3, 9], Anne W, Rimoin[7], Martine Peeters[4], Nicholas Loman[15], Andrew Rambaut[4], Jean-Jacques Muyembe-Tamfum[1, 3], Lisa E. Hensley[17], Jason Kindrachuk[18]*, Placide Mbala-Kingebeni[1, 3]*, Steve Ahuka-Mundeke[1, 3]

Affiliations

[1]Service de Microbiologie, Département de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Université de Kinshasa

[2]Rodolphe Merieux INRB-Goma Laboratory, Goma, Democratic Republic of the Congo

[3]Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[4]TransVIHMI (Recherches Translationnelles sur le VIH et les Maladies Infectieuses), Université de Montpellier, Institut de Recherche pour le Développement (IRD), Institut National de Santé et de Recherche Médicale (INSERM), Montpellier, France

[5]Institute of Ecology and Evolution, University of Edinburgh, Edinburgh, UK

[6]Provincial Health Division, North Kivu, Democratic Republic of the Congo

[7]Department of Epidemiology, Jonathan and Karin Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, California, USA

[8]Hemorrhagic Fever and Monkeypox Program, Ministry of Health, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[9]Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium

[10]Department of Epidemiology, Infectious Diseases and Microbiology, University of Pittsburgh, School of Public Health, Pittsburgh, Pennsylvania, USA

[11]Chan Zuckerberg Biohub, San Francisco, California, USA

[12]World Health Organization, Geneva, Switzerland

[13]University of Bern, Bern, Switzerland

[14]Community Health Sciences, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

[15]University of Birmingham, Birmingham, UK

[16]Africa Centres for Disease Control and Prevention, Addis Ababa, Ethiopia

[17]US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Manhattan, Kansas, USA

[18]Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada; Department of Internal Medicine, University of Manitoba, Canada

***Corresponding authors:** Jason Kindrachuk (Jason.Kindrachuk@umanitoba.ca); Placide Mbala-Kingebeni (mbalaplacide@gmail.com)

Keywords: mpox, Monkeypox virus, sexual transmission, Goma, cross-border transmission, epidemic spread, phylogenetics

Preprint posted on september 16, 2024;

medRxiv doi: https://doi.org/10.1101/2024.09.12.24313188

Abstract

The ongoing national mpox outbreak in the Democratic Republic of the Congo has resulted in more >30,000 suspected cases in the country from January 2023 to August 2024. While these historic case totals have been driven by primarily by zoonosis, the emergence of Clade Ib monkeypox virus, which is connected to more sustained human-to-human transmission, has been associated with increasing public health impacts in eastern DRC. First identified in South Kivu province, Clade Ib virus has been identified in multiple non-endemic East African countries for the first time. In DRC, there have been concerns over broader Clade Ib expansion in the country that could further complicate containment and mitigation responses. Here, we report the first introductions of Clade Ib into North Kivu province, including within internal displacement camps, with human-to-human transmission that includes non-intimate contacts and children. These findings demonstrate that mpox case investigations and community messaging campaigns should include considerations for non-sexual contact-mediated transmission of Clade Ib that includes children <15 years.

1. Introduction

Mpox, an emerging zoonotic disease caused by Monkeypox virus (MPXV), garnered significant international attention due to virus expansion and broad human-to-human transmission concentrated within dense sexual networks in more than 100 historically non-endemic countries (1). Human mpox was first described in 1970 in the Democratic Republic of the Congo (DRC) and is endemic among tropical forested regions of Central and West Africa (2). While outbreaks have been sporadic historically, there has been a generally increasing burden of disease across endemic areas with the DRC facing the greatest public health impact (3-5). This has coincided with decreasing immunity to human orthopoxviruses among the population over time following the cessation of the global smallpox vaccination program, and in increasing immune naive population (6-8). In 2022, rapid global expansion of MPXV to more than 100 non-endemic regions resulted in the first declaration of a public health emergency of international concern by the World Health Organization (4, 9, 10).

Historically, zoonosis has been the primary driver of human mpox within endemic regions with rodent species being the presumed reservoir and limited secondary transmission among close contacts. However, sustained human-to-human transmission has been increasingly associated with MPXV infections including in Nigeria following re-emergence of the virus in 2017 and during the global 2022 mpox outbreak (11, 12). Close sexual (intimate) contact and altered or atypical clinical disease presentation was highly overrepresented among cases during the global outbreak (9, 13).

Since early 2023, there has been an ongoing historic national mpox outbreak in DRC that has included virus expansion and transmission within communities in adjacent non-endemic countries. Notably, MPXV infections associated with sustained human-to-human transmission including sexual (intimate) contact have been reported for the first time in Kwango and South Kivu

provinces within the country (14, 15). In addition, suspected mpox cases have been reported in 25 of 26 of the provinces in DRC including multiple large urban centers. This has also included sustained virus transmission chains within regions having infrequent reports of suspected mpox cases. Notably, mpox has rapidly expanded in South Kivu province, with cases increasing from 10 suspected cases per week to >381 suspected cases per week in epidemiological week 31, 2024 (16). In Kamituga Health Zone, a mining region in South Kivu province, mpox cases were first reported in September 2023, with 51.9% of cases identified in women, 29% among professional sex workers (PSW), and a median age of 22 years among confirmed cases (14). We identified APOBEC3-like mutations in high-quality complete MPXV genomes from Kamituga, which led us to recommend the subdivision of Clade I MPXV into subclades Ia and Ib, with the latter related to sustained human-to-human transmission trends (14). Estimates from molecular clock analysis suggest that Clade Ib MPXV has been circulating locally in Kamituga since September 2023.

Given the ongoing historic impacts of mpox in DRC and further geographic expansion, the increasing burden of Clade Ib-associated infections, ongoing internal displacement due to armed conflicts, and the commercial activities within the region, there is a critical need for expanded mpox surveillance in Eastern DRC (17). Here, we describe the observed expansion of Clade Ib MPXV from South Kivu into North Kivu Province, including mpox circulation within internal displacement camps. Our results also provide evidence for Clade Ib transmission associated with both sexual (intimate) and non-sexual close contacts, including among children, with important implications for infection prevention and control recommendations in the recent declaration of the second PHEIC for mpox.

2. Materials and Methods

Ethical Considerations

Ethical approval for this investigation was provided by the Ministry of Higher and University Education, School of Public Health Ethics Committee, University of Kinshasa, DRC, (ESP/CE/05/2023) as part of the national surveillance activities and carried out in the public interest by the Ministry of Health, the Democratic Republic of the Congo. All activities described were undertaken as part of regular public health surveillance conducted and approved directly by the Ministry of Health, Democratic Republic of the Congo. Data was provided by the National Programme for Control of mpox and Viral Haemorrhagic Fevers and the National Institute for Biomedical Research, the Democratic Republic of the Congo, as part of the case investigations. No written informed consent for research was provided as the analyses conducted in this study were done retrospectively and the information and diagnostic samples were collected for surveillance and clinical care purposes.

Suspected mpox case investigations

Human mpox is a mandatory reportable disease in the DRC. An mpox case definition was implemented in October 2010 for enhanced surveillance in Tshuapa Province. A suspected case was defined as follows: a patient with a vesicular pustular eruption characterized by hard and deep pustules and with at least one of the following symptoms: fever preceding the eruption, lymphadenopathy (inguinal, axillary, or cervical), and/or pustules or crusts on the palms of the hands or soles of the feet, and having an exposure such as a travelling history from an affected area, a high risk contact with people coming from affected area or exposure to wild animal dead or with lesions (18). A formal investigation of a suspected mpox case included the collection of samples and the completion of a case investigation form by trained staff from Health zone and

Provincial Health division (DPS). Lesion swabs and/or lesion crusts are the preferred samples for MPXV diagnostics. Blood samples were rarely, but sometimes, collected.

Sample collection and laboratory diagnosis of mpox

Crust, vesicle, and nasopharyngeal swab samples, and blood samples were collected from mpox suspected individuals. These samples were then shipped to the Rodolphe-Merieux INRB-Goma Laboratory for PCR assay and whole genome sequencing (WGS). To confirm the diagnosis of mpox, the GeneXpert platform was used with clade IIb-specific cartridges, according to the manufacturer's instructions. mpox-positive samples with a Ct value < 30 were selected for subsequent WGS.

Bioinformatics analysis

FASTQ files from GridION were base called with the High accuracy model from Guppy v6, and reads were demultiplexed and adapter-trimmed by the GridION built-in MinKNOW software. MPXV consensus genomes were generated using the artic (https://github.com/artic-network/artic-mpxv-nf) and metatropics pipelines (https://github.com/DaanJansen94/nextflow-metatropics-INRB).

Phylogenetic and APOBEC-3 analysis

We estimated a maximum likelihood phylogeny using IQ-TREE 2 version 2.2.5 (19) with the HKY substitution model. Ancestral reconstruction was performed for each internal node on phylogeny using IQ-TREE 2, enabling mapping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) along branches. SNPs were categorized on the basis of whether they were consistent with the signature of APOBEC3 editing, assuming this process induced specific mutations (TC → TT and GA → AA) as previously described (20, 21).

3. Results

Case investigation and epidemiological assessment

We describe a total of nine confirmed mpox cases identified in North Kivu, DRC, and includes 6 cases confirmed as Clade Ib MPXV by WGS. A map of the geographic locations of the identified cases is presented in ***Figure 57***.

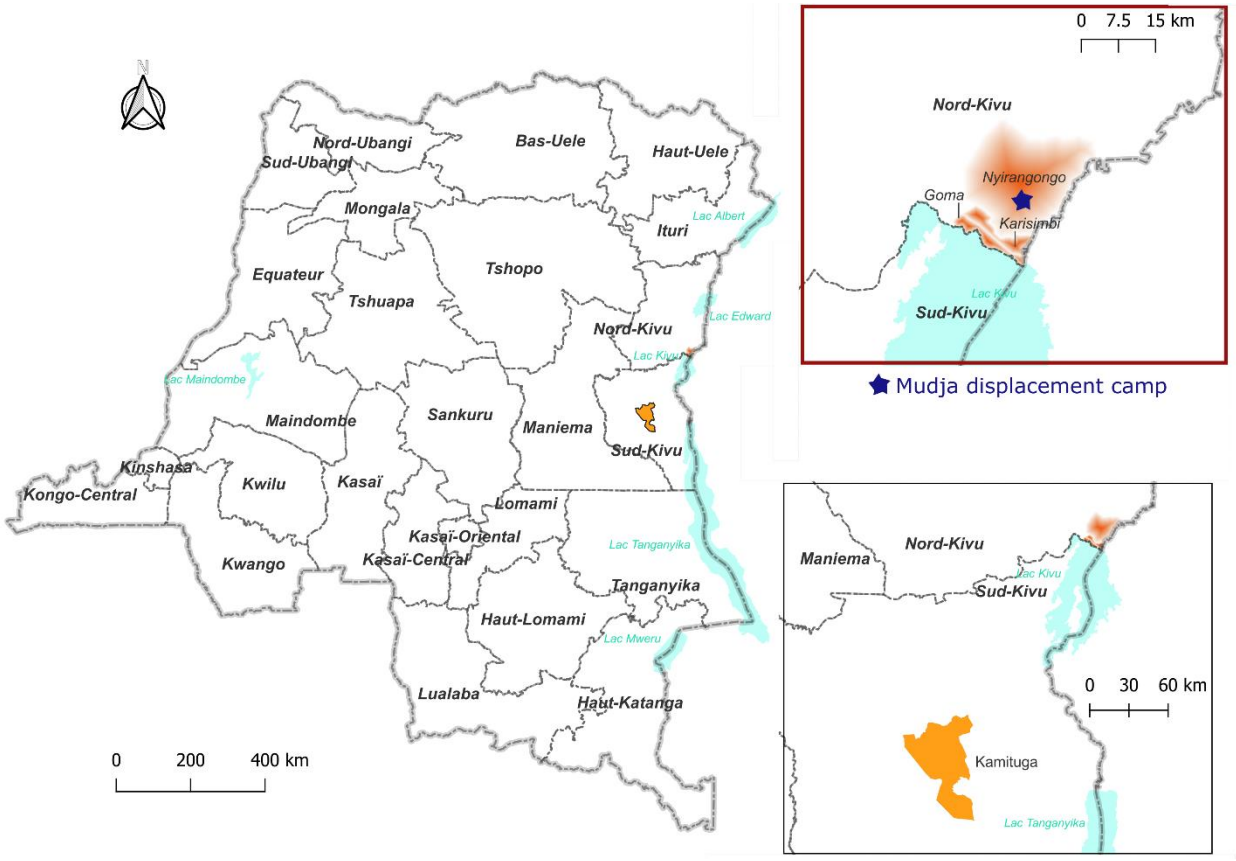


Figure 57 *: Geographic locations of cases identified in North Kivu including Mudja displacement camp. Map constructed using QGIS3.22.11.*

Epidemiological links among Cases 1-9 is presented in ***Figure 58***. In May 2024, an adult female (15-30 years) from North Kivu developed vesicular lesions and pustules on day 5 post-symptom onset and healthcare consultation (Case 1). The patient was discharged one day later (day 6) and cared for at home. Vesicle and nasopharyngeal swabs were collected on day 8 post-symptom onset and confirmed positive for orthopoxvirus by PCR. During the case investigation the individual reported travel to Bukavu, South Kivu, which is currently affected by an ongoing

Clade Ib MPXV outbreak, during the 21 days prior to symptom development. Follow up investigations of contacts from the healthcare consultation (n=23) and at their residence (n=19) did not identify any additional mpox cases. In June 2024, an adult male, 15-30 years, from North Kivu received consultation for management of vesicular lesions, which were in the process of healing (Case 2). Lesion swabs were collected and confirmed positive for mpox one day following consultation. Further case investigation confirmed sexual intercourse within 21 days of symptom onset with an occasional sexual partner from South Kivu though the individual did not recall any visible lesions. Case 3, an adult male aged 15-30 years from North Kivu received medical consultation eight days post-symptom onset. mpox was confirmed by PCR one day following consultation. The individual reported that his wife had received consultation for similar symptoms, and she had recent travel to Bukavu, South Kivu in the prior 21 days (suspect case 1). There were no epidemiological links established between Cases 1-3. Five additional confirmed mpox cases, Cases 4-8, were associated with residents of Mudja displaced persons camp, North Kivu. Case 4, a male child <15 years, developed fever and headache. The child reported common use of a sponge that had been used on his male sibling (<15 years) who recently had dermatological lesions similar to Case 4 though no confirmatory testing had been performed (suspected case 2). The male sibling of Case 4 had also interacted with a neighbor who had developed skin lesions a few days prior to the sibling though no further information or testing information was available (suspect case 3). It was also noted that Case 4 and their male sibling had shared sleeping quarters. Skin eruptions including vesicles and pustules were noted for Case 4 on day 3 post-symptom onset; mpox was confirmed from samples taken on day 5. Case 5, a female 15-30 years, developed symptoms in mid-June 2024 including chills, cough, headache, lymphadenopathy, eruptions on the lips, and pubic lesions. It was reported that a female child living within the same household had developed

similar symptoms ~14 days earlier but had not sought clinical consultation (suspected case 4). Case 6, a male child <15 years, presented with lesions on the back, face and abdomen. Case 6 was friends with the male sibling of Case 4 (suspect case 2). Case 7, a female >30 years, developed a rash on the buttock, thigh, hands, and feet at symptom onset. Case 7 had no epidemiological link to other cases in Mudja camp; however, she reported having provided recent care for her son (<15 years;) who had a similar illness presentation and with whom she shared a bed (suspect case 5). Probable epidemiological links were made among Cases 4-6 based on frequent interactions among residents within the camp, including suspect cases. Case 9, a female of 15-30 years, presented with vesiculo-pustular lesions on day 3 post-symptom onset (fever starting on day 0). Samples were taken for testing on day 10 and confirmed positive for MPXV. There were no epidemiological links to the any of the other cases.

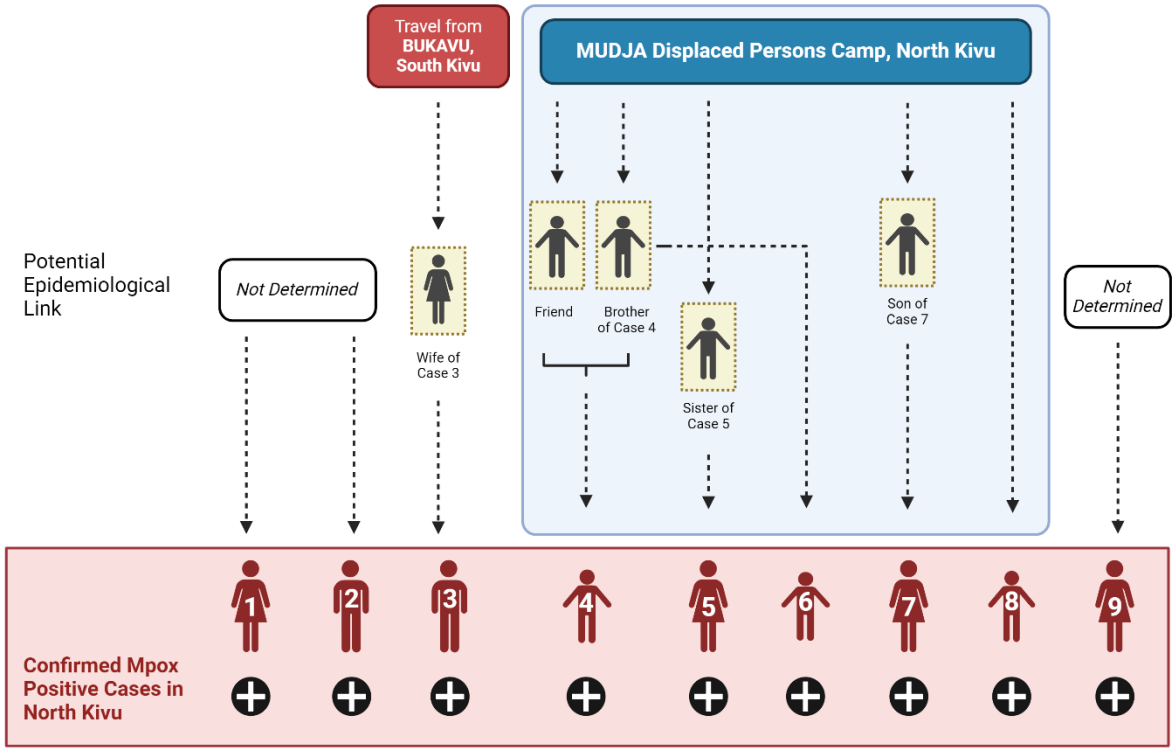


Figure 58 *: Epidemiological linkages and suspected transmission chains among Clade Ib mpox cases identified in Goma, North Kivu, DRC. Transmission chain at the Division Provincial de la Santé (DPS), North Kivu*

Case demographics and clinical symptoms

Demographic and clinical data for all nine confirmed mpox cases are presented in***Tableau 20***. Of all cases, five (5/9) were residents at the Mudja displaced persons site for internally displaced people. Males comprised 5/9 cases; 4/9 cases were female. The mean age was 18 years (6 - 45 years). The majority of cases were identified among those aged 15-30 years (5/9) and three cases were identified among those <15 years. Most patients (6/9) required hospitalization and included three males and three females. Of those hospitalized, 3/6 were aged 15-30 years, 2/6 were <15 years, and 1/6 was >30 years. There were no fatal infections recorded among the nine confirmed cases. Cutaneous eruptions were reported for all patients (9/9) with genital and oral eruptions frequently reported (7/9 and 6/9 cases, respectively). Genital eruptions were similarly reported whether male or female (4/5 and 3/4 cases, respectively); however, oral eruptions were reported more frequently among female cases than males (4/4 and 2/4 cases, respectively). Myalgia (8/9), headache, (7/9), and fever (6/9) were common among mpox patients. Lymphadenopathy was also frequently reported with cervical lymphadenopathy being the most commonly reported among cases (7/9) as compared to inguinal (5/9) or axillary (3/9).

Tableau 20 *: Demographic and clinical symptom data for mpox cases identified in Goma to date. Column percentages are presented in parentheses.*

Age group (years)	**Male**	**Female**	**Total**
<15	2	1	3
15-30	2	3	5
>30	1	0	1
Total	**5**	**4**	**9**
Hospitalization	3 (60%)	3 (75%)	6 (67%)
Clinical symptoms			
Cutaneous eruptions	5 (100%)	4 (100%)	9 (100%)
Genital eruptions	4 (80%)	3 (75%)	7 (78%)
Oral eruptions	2 (40%)	4 (100%)	6 (67%)
Fever	3 (60%)	3 (75%)	6 (67%)
Headache	4 (80%)	3 (75%)	7 (78%)
Myalgia	5 (100%)	3 (75%)	8 (89%)
Arthralgia	4 (80%)	3 (75%)	7 (78%)
Fatigue	1 (20%)	2 (50%)	3 (33%)
Cervical lymphadenopathy	3 (60%)	4 (100%)	7 (78%)
Inguinal lymphadeonpathy	3 (60%)	2 (50%)	5 (56%)
Axillary lymphadenopathy	2 (40%)	1 (25%)	3 (33%)

Genome sequencing identifies Clade Ib introduction into Goma, North Kivu, including an internal displacement camp.

Genomic analysis of the first three confirmed cases showed that they all clustered within MPXV Clade Ib together with mpox cases detected in South Kivu (***Figure 59***). Their position in the tree with MPXV sequences from South Kivu suggests they were part of the sustained human outbreak first reported in Kamituga health zone. These findings are consistent with the reported travel of the first case from South Kivu.

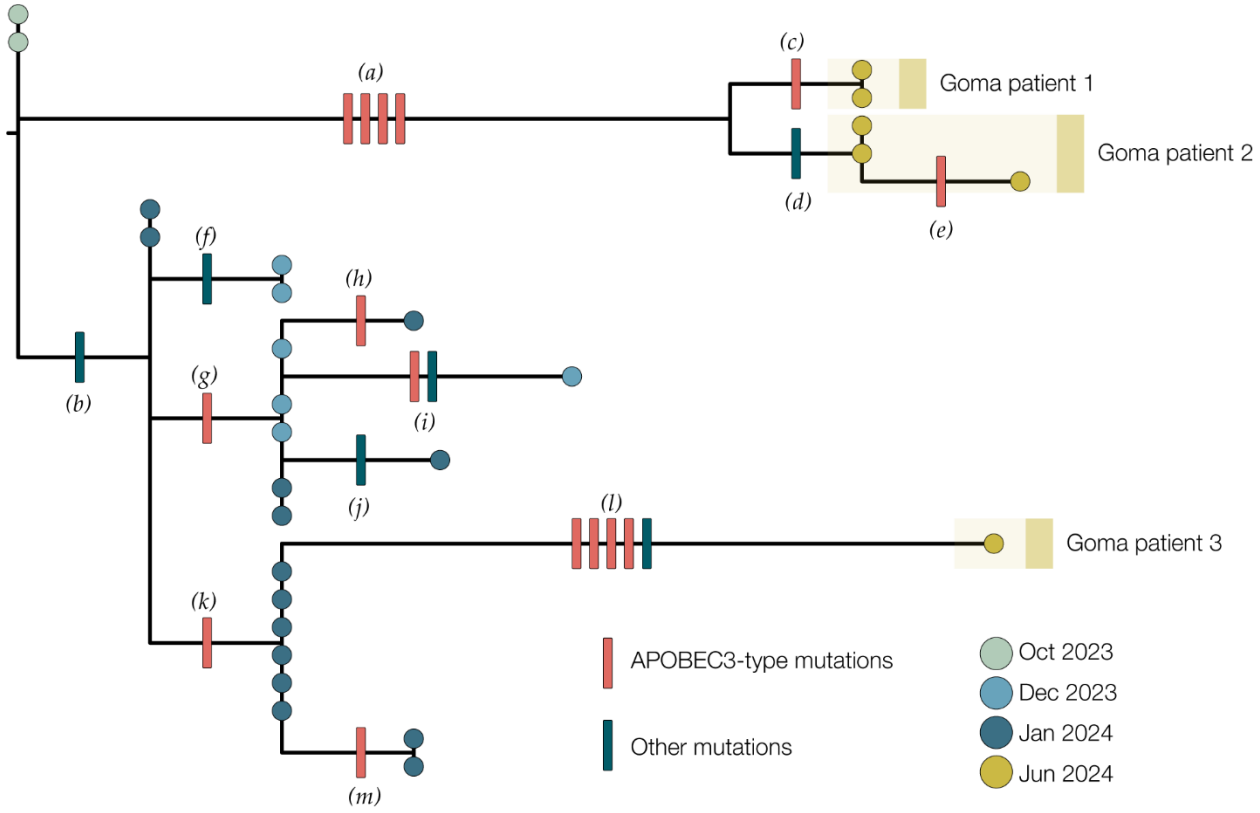


Figure 59 *: A maximum likelihood tree constructed using IQ-Tree 2 (19) with the HKY substitution model (23). We included a Clade Ia genome as an outgroup and then removed it after rooting. Single nucleotide mutations are reconstructed and displayed denoting whether they are APOBEC3-mediated (red bars) or other mutations (blue bars). Genomes from recent cases in Goma, North Kivu are denoted with yellow circles. Patients 1 and 2 each have multiple genomes sequenced from different samples. Blue circles are genomes from Kamituga, South Kivu from October and December 2023, and January 2024. Letters in parentheses are referenced in* **Tableau 21**

The genomes from the first and second cases are closely linked suggesting they are part of the same transmission chain. The third sequenced case is separated from the first two in the Clade Ib outbreak tree, implying an independent introduction into Goma. Of the 21 single nucleotide mutations reconstructed in this tree (***Tableau 21***), 15 are of the type expected due to the action of human APOBEC3. The viruses sequenced from patients 1 & 2 are descendants of viruses present in Kamituga in October 2023 or earlier. Furthermore, the branch leading to patient 1 & 2 has four APOBEC3-type mutations which even at the elevated rate of evolution induced by APOBEC3 would represent months of human transmission. In combination with the report of recent travel history means this is likely a recent introduction into the Goma area from an area of South Kivu with ongoing transmission.

The branch leading to patient 3 has four APOBEC3 mutations and one other mutation, possibly the result of an error during replication, indicating a similar timespan for this branch. However, this branch joins the Kamituga tree clustering with viruses sampled in January 2024, suggesting a direct link to that outbreak. The long unbroken branch with 5 single nucleotide mutations, and the fact that this lineage has not yet been sampled in Kamituga, may either be explained by undersampling in Kamituga, or an unresolved epidemiological link to South Kivu (i.e. by not having identified nor sequenced Goma Patient 3's contact whom could have gotten an epidemiological link to South Kivu as well). However, the third hypothesis, being that the virus has been circulating in Goma for weeks or months, can also not be entirely excluded.

Tableau 21 : *List of mutations in the 2023-2024 DRC mpox outbreak.*

Branch label[1]	Genome position[2]	Mutation[3]	APOBEC3?
(a)	103,660	GA->AA	yes
	130,155	GA->AA	yes
	142,587	GA->AA	yes
	161,978	TC->TT	yes
(b)	165,597	C->A	no
(c)	64,117	GA->AA	yes
(d)	30,660	T->C	no
(e)	181,268	GA->AA	yes
(f)	167,805	A->G	no
(g)	115,484	GA->AA	yes
(h)	57,332	GA->AA	yes
(i)	89,000	GA->AA	yes
	127,619	A->G	no
(k)	183,181	G->A	no
(l)	71,751	TC->TT	yes
	139,485	TC->TT	yes
	148,221	GA->AA	yes
	168,749	GA->AA	yes
	169,501	T->A	no

[1] Branch labels refer to ***Figure 59***
[2] Coordinates relative to Clade I reference genome, NCBI accession NC_003310
[3] Dinucleotide mutations are ascribed to APOBEC3 mutations

4. Discussion

Here, we present the first case series of mpox reported in North Kivu province, DRC. Case investigations suggested potential linkage of one of the mpox cases to recent travel to Bukavu, the capital of the South Kivu province, which has recently reported mpox cases. The introduction of mpox in large urban centers in DRC including Bukavu (urban pop. >1 million) and Goma (urban pop. ~2 million) further increase the risk for greater public health impacts from the ongoing outbreak, which has already far surpassed the scale of prior outbreaks across endemic regions. Of particular note is the identification of MPXV Clade Ib circulation, which is linked to sustained human-to-human transmission chains, among both urban centers (14, 22). This risk is further compounded by Goma's role as a major commercial hub and regional and international connection point, including air travel. Additionally, Goma's proximity to international borders with East African countries and frequent unmonitored cross-border movement increases the potential for the virus to spread to new regions through cryptic transmission.

A concerning finding from this investigation was the identification of mpox cases among individuals at Mudja displaced persons site. The introduction of MPXV to, and circulation within, displaced persons sites could have deleterious public health impacts. Importantly, this includes the potential for broad disease transmission given the poor sanitation conditions, highly dense populations, and very limited healthcare or surveillance support. Thus, ongoing political instability in the region could further destabilize mpox containment and mitigation efforts. Case investigations among the nine confirmed mpox cases in this study identified potential contacts with unreported symptomatic infections within households highlighting the need for greater community engagement focused on both case recognition as well as reporting of suspected mpox cases. Additionally, the case investigations also noted the potential for contacts among children

through common play areas. Given the cases identified herein among children and considering the disproportionate disease severity associated with mpox among children, additional vigilance should be undertaken to inform communities regarding the potential risks for mpox within children. Of important note was the potential linkage of Goma Patient 1 to recent travel to Bakavu, South Kivu, where there have been increasing deleterious public health impacts from mpox linked to sexual (intimate) contacts. Ongoing conflict within the region could also impact containment and mitigation efforts for MPXV circulation within Mudja given the potential for onward transmission among current residents as well as further introductions of virus through undiagnosed infections. Our investigation also demonstrated that infection risks for the recently identified MPXV Clade Ib extend beyond sexual (intimate) contacts to include caregivers and children as well as adults. Taken together, these factors create a critical bottleneck for response to public health emergencies reminiscent of those encountered in the region during the Ebola virus disease outbreak in 2018-2020. While the DRC already faces expansive public health hurdles, including extreme economic and development hardships, these impacts are further elevated within internal displacement sites (camps). The convergence of resource limitations within these sites including healthcare access, sanitation, clean water, and food as well as overcrowding could further facilitate rapid mpox circulation and broaden this outbreak to a larger humanitarian crisis. Consequently, the high risk of the mpox outbreak further expanding nationally and internationally must be considered an urgent issue and a priority for all stakeholders. These cases involved adult males and females, as well as children, who were infected by MPXV through various transmission routes, including close non-sexual contacts. Our analysis demonstrates the further expansion of Clade Ib MPXV and the first identification of cases within a displaced persons' site highlighting concerns for rapid expansion of the outbreak among highly vulnerable populations.

The spread of MPXV clade Ib in the city of Goma, DRC, is highly concerning, as the virus has the potential to extend not only throughout the DRC but also globally. This risk is exacerbated due to Goma's proximity to the international border regions, massive population displacement due to armed conflicts, and its international airport. Therefore, there is an urgent need for collaborative efforts and actions to combat mpox before its further spread to other countries.

Competing interests : None of the other authors declare competing interests.

Acknowledgements : This work was funded by the Department of Defense, Defense Threat Reduction Agency, Monkeypox Threat Reduction Network; and USDA Non-Assistance Cooperative Agreement #20230048; Africa Pathogen Genomics Initiative helped acquiring and maintaining the sequencer; Agence Française de Dévelopement through the AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209, coordinated by ANRS-MIE Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Pasteur Institute) for laboratory support and PANAFPOX project funded by ANRS-MIE ; Belgian Directorate-general Development Cooperation and Humanitarian Aid and the Research Foundation - Flanders (FWO, grant number G096222 N to L.L.); the International mpox Research Consortium (IMReC) through funding from the Canadian Institutes of Health Research and International Development Research Centre (grant no. MRR-184813); US NIAID/NIH grant number U01AI151799 through Center for Research in Emerging Infectious Disease-East and Central Africa (CREID-ECA); E.L. received a PhD grant from the French Foreign Office. We acknowledge the support of the Wellcome Trust (Collaborators Award 206298/Z/17/Z, ARTIC network)

References

1. El Eid R, Allaw F, Haddad SF, Kanj SS. Human monkeypox: A review of the literature. PLoS Pathog. 2022;18(9):e1010768.
2. Marennikova SS, Seluhina EM, Mal'ceva NN, Cimiskjan KL, Macevic GR. Isolation and properties of the causal agent of a new variola-like disease (monkeypox) in man. Bull World Health Organ. 1972;46(5):599-611.
3. Bunge EM, Hoet B, Chen L, Lienert F, Weidenthaler H, Baer LR, et al. The changing epidemiology of human monkeypox-A potential threat? A systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16(2):e0010141.
4. Van Dijck C, Hoff NA, Mbala-Kingebeni P, Low N, Cevik M, Rimoin AW, et al. Emergence of mpox in the post-smallpox era-a narrative review on mpox epidemiology. Clin Microbiol Infect. 2023;29(12):1487-92.
5. Simpson K, Heymann D, Brown CS, Edmunds WJ, Elsgaard J, Fine P, et al. Human monkeypox - After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication. Vaccine. 2020;38(33):5077-81.
6. Rimoin AW, Mulembakani PM, Johnston SC, Lloyd Smith JO, Kisalu NK, Kinkela TL, et al. Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107(37):16262-7.
7. Simpson K, Heymann D, Brown CS, Edmunds WJ, Elsgaard J, Fine P, et al. Human monkeypox - After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication. Vaccine. 2020;38(33):5077-81.
8. Shah HH, Molani MK, Shabbir N. Human monkeypox - After 40 years, an unintended consequence of smallpox eradication. Front Public Health. 2022;10:1082586.
9. Thornhill JP, Gandhi M, Orkin C. mpox: The Reemergence of an Old Disease and Inequities. Annu Rev Med. 2024;75:159-75.
10. Dodd LE, Lane HC, Muyembe-Tamfum JJ. Vaccines for mpox - An Unmet Global Need. NEJM Evid. 2024;3(3):EVIDe2300348.
11. Ndodo N, Ashcroft J, Lewandowski K, Yinka-Ogunleye A, Chukwu C, Ahmad A, et al. Distinct monkeypox virus lineages co-circulating in humans before 2022. Nat Med. 2023;29(9):2317-24.
12. Yinka-Ogunleye A, Aruna O, Dalhat M, Ogoina D, McCollum A, Disu Y, et al. Outbreak of human monkeypox in Nigeria in 2017-18: a clinical and epidemiological report. Lancet Infect Dis. 2019;19(8):872-9.
13. McCollum AM, Damon IK. Human monkeypox. Clin Infect Dis. 2014;58(2):260-7.
14. Vakaniaki EH, Kacita C, Kinganda-Lusamaki E, O'Toole A, Wawina-Bokalanga T, Mukadi-Bamuleka D, et al. Sustained human outbreak of a new MPXV clade I lineage in eastern Democratic Republic of the Congo. Nat Med. 2024.

15. Kibungu EM, Vakaniaki EH, Kinganda-Lusamaki E, Kalonji-Mukendi T, Pukuta E, Hoff NA, et al. Clade I-Associated mpox Cases Associated with Sexual Contact, the Democratic Republic of the Congo. Emerg Infect Dis. 2024;30(1):172-6.

16. INSP-RDC. Situation report No. 22, Data from epidemiological week 24. 2024.

17. Migration IU. Democratic Republic of the Congo Crisis Response Plan 2023. International Organization for Migration (IOM); 2023.

18. WHO. mpox (monkeypox) outbreak toolbox - Updated July 2024. World Health Organization; 2024 July 2024.

19. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 2020;37(5):1530-4.

20. Suspene R, Raymond KA, Boutin L, Guillier S, Lemoine F, Ferraris O, et al. APOBEC3F Is a Mutational Driver of the Human Monkeypox Virus Identified in the 2022 Outbreak. J Infect Dis. 2023;228(10):1421-9.

21. O'Toole A, Neher RA, Ndodo N, Borges V, Gannon B, Gomes JP, et al. APOBEC3 deaminase editing in mpox virus as evidence for sustained human transmission since at least 2016. Science. 2023;382(6670):595-600.

22. Masirika LM, Udahemuka JC, Schuele L, Ndishimye P, Otani S, Mbiribindi JB, et al. Ongoing mpox outbreak in Kamituga, South Kivu province, associated with monkeypox virus of a novel Clade I sub-lineage, Democratic Republic of the Congo, 2024. Euro Surveill. 2024;29(11).

23. Shapiro B, Rambaut A, Drummond AJ. Choosing appropriate substitution models for the phylogenetic analysis of protein-coding sequences. Mol Biol Evol. 2006;23(1):7-9.

Chapitre 7 : Co-circulation des sous-clades Ia et Ib du MPXV dans la province de Kinshasa, République démocratique du Congo, de juillet à août 2024

7.1.Résumé

Les chapitres précédents ont montré l'émergence du clade Ib et sa propagation rapide dans la région, atteignant les grandes villes de la région dont Bukavu et Goma, cette dernière étant doté d'un aéroport international.

A partir du mois de juillet 2024, une hausse du nombre tant des notifications que des cas confirmés a été notée à Kinshasa, la capitale, grande mégalopole. Le present travail dresse un premier rapport de la caractérisation génomique des échantillons prélevés entre juillet et août 2024 dans plusieurs zones de santé de Kinshasa. Il en a découlé la documentation de la cocirculation des sous-clades Ia et Ib dans la zone de santé de Limete, tandis que les analyses phylogénétiques suggèrent de multiples introductions des deux sous-clades à Kinshasa. Au-delà des risques relatifs à des recombinaisons, cette réalité susceptible de s'étendre devrait être intégrée dans la compréhension de la dynamique actuelle de transmission, déjà complexe.

7.2. Communication rapide, EuroSurveillance, 2024.

Co-circulation of monkeypox virus subclades Ia and Ib in Kinshasa Province, Democratic Republic of the Congo, July to August 2024

Tony Wawina-Bokalanga [1,2,3], Prince Akil-Bandali[1], **Eddy Kinganda-Lusamaki**[1,2,4], Emmanuel Lokilo[1], Daan Jansen[3], Adrienne Amuri-Aziza[1], Jean-Claude Makangara-Cigolo[1,2,5], Elisabeth Pukuta-Simbu[1], Rilia Ola-Mpumbe[1], Mamito Muyembe[1], Cris Kacita[6], Princesse Paku-Tshambu[1], Pedro HLF Dantas[3], Olivier Tshiani-Mbaya [1,2], Gradi Luakanda[1], Antoine Nkuba-Ndaye[1,2], Meris Matondo [1,2], Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki[1,3], Sofonias Tessema [7], Nicaise Ndembi [7], Áine O'Toole[8], Tessa De Block[3], Christian Ngandu[6], Nicole A Hoff[9], Nicola Low[10], Lorenzo Subissi[11], Sydney Merritt[9], Jean-Jacques Muyembe-Tamfum[1,2], Laurens Liesenborghs[3,12], Martine Peeters[4], Eric Delaporte[4], Jason Kindrachuk[13], Anne W Rimoin[9], Steve Ahuka-Mundeke[1,2], Andrew Rambaut[8], Dieudonné Mwamba[6], Koen Vercauteren[3,*], Placide Mbala-Kingebeni[1,2,*]

1. Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo
2. Service de Microbiologie, Département de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Université de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo
3. Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, Antwerp, Belgium
4. TransVIHMI, Université de Montpellier, INSERM, IRD, Montpellier, France
5. Graduate School of Cellular and Biomedical Sciences, University of Bern, Bern, Switzerland
6. Institut National de Santé Publique (INSP), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo
7. Africa Centres for Disease Control and Prevention, Addis Ababa, Ethiopia

8. Institute of Ecology and Evolution, University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom

9. Department of Epidemiology, Jonathan and Karin Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, CA, United States

10. Institute of Social and Preventive Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

11. World Health Organization, Geneva, Switzerland

12. Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, Leuven, Belgium

13. Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada; Department of Internal Medicine, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada

* These authors contributed equally to this work and share last authorship.

Correspondence: Tony Wawina-Bokalanga (tonywawinab@yahoo.fr; twawina@itg.be)

Keywords: mpox; Monkeypox virus (MPXV); Co-circulation; Clade I; Kinshasa; Democratic Republic of the Congo; public health policy; surveillance.

Euro Surveill. 2024 Sep; 29(38). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.38.2400592. Article received on 07 Sep 2024 / Accepted on 19 Sep 2024 / Published on 19 Sep 2024

Abstract

Between January and August 2024, mpox cases have been reported in nearly all provinces of the Democratic Republic of the Congo (DRC). Monkeypox virus genome sequences were obtained from 11 mpox cases' samples, collected in July–August 2024 in several health zones of Kinshasa. Characterisation of the sequences showed subclades Ia and Ib co-circulating in the Limete health zone, while phylogenetic analyses suggested multiple introductions of the two subclades in Kinshasa. This illustrates the growing complexity of Clade I mpox outbreaks in DRC.

1. Introduction

Mpox is a zoonotic disease caused by monkeypox virus (MPXV), which is endemic to Western and Central African countries and has the highest prevalence in the Democratic Republic of the Congo (DRC) [1]. There are two clades of MPXV, namely Clade I and Clade II, each respectively divided into two subclades a and b [2-4]. The geographic range of Clade I, and predominantly subclade Ib within, is currently expanding, with cases reported in countries historically non-endemic for mpox, including Burundi, Kenya, Rwanda and Uganda [5]. Travel-associated transcontinental importations have also occurred in Sweden and Thailand [6]. In this context, the situation regarding mpox in Kinshasa, the capital city of the DRC, represents a particular concern due to the city's (i) large population (> 17 million inhabitants) and population density, (ii) proximity to Brazzaville, the capital of the Republic of the Congo and (iii) international connections possible via air travel.

Here, characterisation of complete MPXV genome sequences derived from mpox cases in Kinshasa reveals co-circulation MPXV strains of subclades Ia and Ib in one health zone of the city. Moreover, phylogenetic analyses suggest multiple introductions of both subclades in the city. Here, characterisation of complete MPXV genome sequences derived from mpox cases in Kinshasa reveals co-circulation MPXV strains of subclades Ia and Ib in one health zone of the

city. Moreover, phylogenetic analyses suggest multiple introductions of both subclades in the city.

2. Mpox case sample collection, laboratory processing and bioinformatic analyses

Kinshasa, which is both a city and a province, is divided into 35 health zones in terms of healthcare services. All samples collected from suspected cases of mpox across the province are sent to the Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa.

As part of routine country-wide mpox surveillance, the INRB laboratory received 12 samples from 11 suspected mpox cases in Kinshasa, reported between July and mid-August 2024. The samples originated respectively from vesicle (n = 7) and crust (n = 4) swabs, along with one swab of conjunctival secretions. They had been collected by local surveillance teams, who provided data from each suspected case using the national investigation form. This form includes information on demographic characteristics (age, sex, residence, including health zone and province, profession and nationality), time of onset of clinical symptoms, type of sample and sampling date of cases.

Viral DNA was extracted from 140 µL of inactivated swab material resuspended in 1× phosphate buffered saline (PBS) solution using the QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions. Real-time PCR assays were performed using both Orthopoxvirus- and MPXV-generic primers/probes for mpox diagnosis [7,8]. The 12 samples from the 11 cases were subjected to sequencing; two samples, identified as 24MPX-1521GG and 24MPX-1521V, were collected from the same patient. To sequence the full-length MPXV genome, we used either the Comprehensive Viral Research Panel (Twist Biosciences) or the Clade I-optimised tiling sequencing protocol, which is a modified version of the Welkers et al. protocol (*https://www.protocols.io/view/monkeypox-virus-whole-genome-sequencing-using-comb-n2bvj6155lk5/v1*). Sequencing libraries were loaded onto either the MiSeq or GridION sequencer. FASTQ files from the MiSeq were processed using GeVarLi

(*https://forge.ird.fr/transvihmi/nfernandez/GeVarLi*), CZ ID (*https://czid.org/*), and iVar pipelines. FASTQ files from the GridION were processed with fastp to trim adapter sequences and filter out low-quality bases [9]. The trimmed reads were aligned to the human genome using Minimap2 [10], and those that aligned were removed. The remaining reads were classified with MetaMaps (*https://github.com/DiltheyLab/MetaMaps*) against the viral RefSeq database. Reference-based (GenBank ID: NC_003310) consensus genomes were built using iVar (*https://github.com/andersen-lab/ivar*), and indels were filtered out using Homopolish (*https://github.com/ythuang0522/homopolish*). Clade assignment was performed using Nextclade tool (*https://clades.nextstrain.org/*). Multiple sequence alignment against the Clade I MPXV reference genome (GenBank ID: NC_003310) was performed using SQUIRREL (*https://github.com/aineniamh/squirrel*). We Inferred a maximum-likelihood phylogenetic tree using IQ-TREE2 v2.1.4 [11] with the K3Pu + F + I' substitution model as the best fit. Branch support was estimated by the ultrafast bootstrap approximation with 10,000 replicates [12].

3. Description of cases

All 11 suspected mpox cases were PCR confirmed with quantification cycle (Cq) values ranging from 16.81 to 30.59 for the PCR with the MPXV-generic primers. Five cases were from the Limete health zone and two from the Kasa-Vubu health zone (***Figure 60***). The four remaining cases were respectively from the Gombe, Kokolo, Biyela, and Ngiri-Ngiri health zones. Overall, two cases were ≤ 10 years-old, while the remainder were evenly distributed in 11–21, 22–32 and 33–43 year-age groups, which comprised three cases each. In total, seven cases were of male and four of female sex.

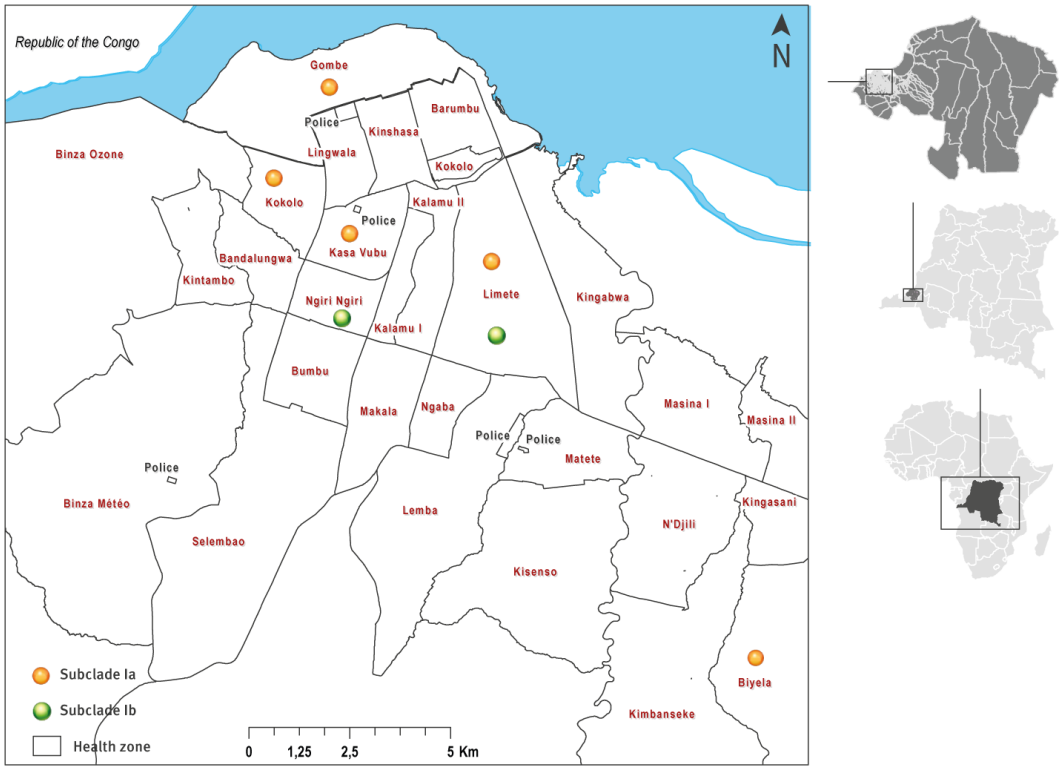


Figure 60 *: Geographic distribution of mpox confirmed cases, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, July–August 2024 (n = 11 cases)*

Names of the health zones figure in red font. Both subclades Ia and Ib are co-circulating in the health zone of Limete. A mono-circulation pattern of subclade Ia is observed in the following health zones: Gombe, Kokolo, Kasa-Vubu, Biyela, while a mono-circulation pattern of subclade Ib is observed in Ngiri-Ngiri. Blue colour indicates the Congo River.

MPXV genomes were generated from all 12 samples, collected from the 11 cases, with horizontal genome coverage ranging from 68.5% to 98.8%. Seven MPXV genomes were characterised as subclade Ia and five as subclade Ib MPXV (***Tableau 22***). MPXV subclade Ib was detected in age groups of 0–10, 11–21, and 22–32 years old. In the health zones of Biyela, Gombe, Kasa-Vubu and Kokolo, only viruses of subclade Ia were detected, while the single sample from Ngiri-Ngiri harboured a subclade Ib virus. In the Limete zone three cases had been infected by subclade Ib viruses and two by subclade Ia viruses (***Figure 60***).

Tableau 22 *: Cq values obtained by a PCR with MPXV-generic primers and genome coverage of MPXV genomes derived from samples of mpox cases, Democratic Republic of the Congo, July–August 2024 (n = 12 samples)* [a]

Sample ID	Sample type	Cq value	Consensus genome coverage	Subclade[b]
24MPX-1978V	Vesicle	17.15	98.82%	Ia
24MPX-2056V	Vesicle	17.01	95.78%	Ia
24MPX-1956V	Vesicle	19.46	93.77%	Ib
24MPX-2019V	Vesicle	17.85	90.40%	Ib
24MPX-2027V	Vesicle	21.64	89.10%	Ib
24MPX-2026C	Crust	16.81	88.60%	Ia
24MPX-1521GG[a]	CSS	26.92	88.06%	Ib
24MPX-1521V[a]	Vesicle	17.77	85.83%	Ib
24MPX-2024C	Crust	17.81	84.70%	Ia
24MPX-2091C	Crust	29.47	76.08%	Ia
24MPX-2092C	Crust	30.59	73.30%	Ia
24MPX-2057V	Vesicle	18.58	68.55%	Ia

Cq: quantification cycle; CSS: conjunctival secretion swab; ID: identification; MPXV: monkeypox virus.
[a] There were 12 samples from a total of 11 mpox cases. Samples identified as 24MPX-1521GG and 24MPX-1521V were collected from the same case.
[b] Subclades were determined using Nextclade (*https://clades.nextstrain.org*).

4. Phylogenetic analysis of monkeypox virus strains affecting the cases

Although contact-tracing information of mpox confirmed cases was incomplete, the constructed phylogenetic tree (***Figure 61***) suggests multiple independent introductions of both subclades Ia and Ib MPXV, in Kinshasa.

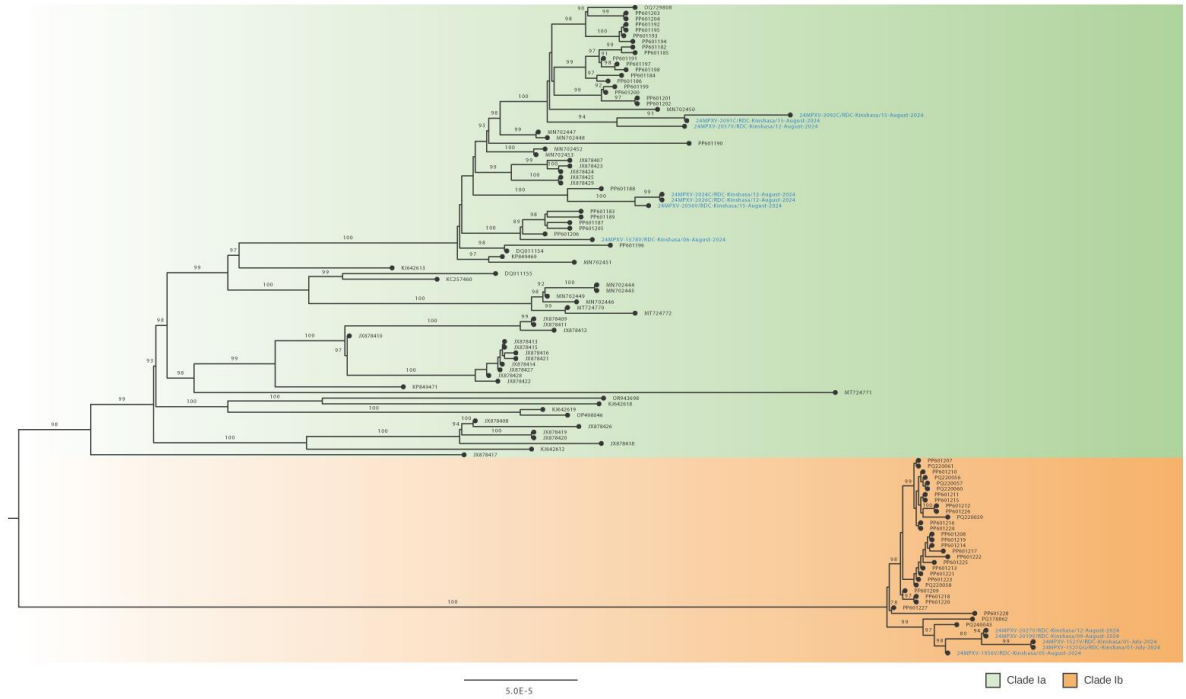


Figure 61 *: Phylogenetic tree of MPXV sequences (highlighted in blue) from confirmed cases of mpox, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo, July–August 2024 (n = 11 cases)*

Sequences are divided into two subclades: subclade Ia (green) and subclade Ib (orange). Genomes identified as 24MPX-1521GG and 24MPX-1521V were collected from the same patient. Concerning the subclade Ia genomes characterised in the current study: 24MPX-2092C and 2091C were both from samples collected in the Kasa-Vubu health zone, and they cluster with 24MPX-2057V, which is from the Biyela health zone; both 24MPX-2024C and 2026C are from the Limete health zone and they cluster with 24MPX-2056V from the Gombe health zone; 24MPX-1578V sequence is from the Kokolo health zone. For the subclade Ib, all genomes characterised in the current study are from the Limete health zone, except for 24MPX-1521V and 24MPX-1521GG which are from the Ngiri-Ngiri health zone.

5. Discussion

Since the first human case of mpox was identified in the DRC in 1970 [13], efforts to curb the spread of MPXV have been ongoing. Nevertheless, the number of reported cases has continued to increase over time [14]. According to the DRC Ministry of Public Health, from 1 January to 14 September 2024, there have been 25,757 suspected cases of mpox reported across nearly all 26 provinces, with 806 deaths, resulting in a case fatality (CF) of 3.1%.

In 2022, MPXV caused a large outbreak affecting many countries, leading the World Health Organization (WHO), at the time, to declare this outbreak a public health emergency of international concern (PHEIC) [15]. Prior to this, MPXV was classified into two major clades:

Clade I which has historically been reported as associated with more severe disease and a higher overall CF, and Clade II, which is typically associated with milder symptoms [16]. Each of these clades is further subdivided: Clade II into IIa and IIb, with IIb variants associated with the 2022 global mpox outbreak driven by human-to-human transmission [2] and Clade I into Ia and Ib, with Ib variants identified in 2023 [3,4].

While subclade Ia MPXV strains remain most commonly reported in DRC, those of subclade Ib have been receiving increased attention due to their recent spread [5,6]. The subclade Ib has been associated with sustained human-to-human transmission driven by close contact with infected individuals, including through sexual contact [3,4]. Since its emergence in 2023 in South Kivu province, eastern DRC [3,4], mpox cases caused by MPXV of subclade Ib have been reported in North Kivu province (https://virological.org/t/mpox-clade-ib-cases-in-goma/962) and also detected in multiple international locations [5,6], raising global public health concerns. On 13 August 2024 the Africa Centres for Disease Control and Prevention (Africa CDC) declared its first public health emergency of continental security [17], and on 14 August 2024, the WHO declared a PHEIC regarding mpox for the second time since 2022 [18].

In this study, mpox cases were confirmed in six of the 35 health zones of Kinshasa. Whereas we previously described different groups of subclade Ia lineages co-circulating in five health zones of the city, including Gombe, Lemba, Limete, Matete, and Nsele [19], we now demonstrate for the first time, a co-circulation of both subclades Ia and Ib, among five cases detected from the Limete health zone.

While surveillance of mpox cases continues in the different health zones of Kinshasa, we cannot exclude the possibility of undetected mpox cases. A limitation of the study is the lack of comprehensive contact-tracing information for all mpox confirmed cases.

Conclusion

This report describes co-circulation in Kinshasa of the two distinct MPXV subclades Ia and Ib between July and August 2024, illustrating the complexity of mpox outbreaks in DRC. Ongoing genomic investigations are expected to yield more insights into the circulation of these subclades across different provinces of the country. We, therefore, advocate for enhanced surveillance and further epidemiological investigations within the community to better understand and address the factors contributing to mpox outbreaks.

Ethical statement : Samples were collected as part of a routine country-wide mpox surveillance program and were therefore exempt from ethical approval. However, permission to use the data from the mpox national surveillance program for this publication was granted by the Ethics Committee of the Kinshasa School of Public Health (ESP-UNIKIN, Number ESP/CE/05/2023).

Funding statement : The project or effort depicted is sponsored in part by the Department of Defense Threat Reduction Agency (HDTRA1-21-1-0040). This work is also supported by the United States Department for Agriculture (USDA) Agriculture Research Service (ARS) (USDA ARS NACA number 20230048, grant number 58-3022-2-020). The content of the Information does not necessarily reflect the position or the policy of the federal government, and no official endorsement should be inferred. The Africa Pathogen Genomics Initiative helped acquiring and maintaining the sequencer; Agence Française de Développement through the AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209, coordinated by ANRS-MIE Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Pasteur Institute) for laboratory support and PANAFPOX project funded by ANRS-MIE; Belgian Directorate-general for Development Cooperation and Humanitarian Aid (DGD), the Department of Economy, Science, and Innovation of the Flemish government, the Research Foundation - Flanders (FWO, grant number G096222 N to L.L.), and EDCTP Grant 101195465

(MBOTE-SK); the International mpox Research Consortium (IMReC) through funding from the Canadian Institutes of Health Research and International Development Research Centre (grant no. MRR-184813); US NIAID/NIH grant number U01AI151799 through Center for Research in Emerging Infectious Disease-East and Central Africa (CREID-ECA). We acknowledge the support of the Wellcome Trust (Collaborators Award 206298/Z/17/Z, ARTIC network).

Use of artificial intelligence tools: None declared.

Data availability : Genomic sequences recovered in this work have been submitted to the GenBank database.

Preprint : This work was published as a preprint article on MedRxiv (Wawina-Bokalanga T, Akil-Bandali P, Kinganda-Lusamaki E, Lokilo E, Jansen D, Amuri-Aziza A, et al. Co-circulation of Clade Ia and Ib monkeypox virus in Kinshasa Province, Democratic Republic of the Congo, July - August 2024. MedRxiv. 2024 Sep 4).

https://www.medrxiv.org/content/10.1101/2024.09.03.24312937v1

Acknowledgements: The authors are grateful to Nelson Mapenzi, Sifa Kavira, Ange Museme, Chloé Muswamba, François Kasongo, Junior Bulabula and Raphael Lumembe.

Conflict of interest : None declared.

Authors' contributions: TWB, KV and PMK conceptualised and designed the study. PAB, EL, DJ, AAA, EPS, ROM, PPT, GL conducted the wet lab and dry lab works. TWB, PAB, EKL, EL, DJ, AAA, JCMC, MeM, CK, PPT, PHLFD, OTM, and GL contributed to data acquisition and interpretation. TWB drafted the first manuscript. TWB, EKL, DJ, JCMC, MaM, ANN, MeM, EHV, ST, NN, AOT, TdB, CN, NAH, NL, LS, SM, JJMT, LL, MP, ED, JK, AWR, SAM, AR, DM, KV and PMB edited and cross-reviewed the manuscript. All authors reviewed and approved the final version.

References

1. Di Giulio DB, Eckburg PB. Human monkeypox: an emerging zoonosis. Lancet Infect Dis. 2004;4(1):15-25. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00856-9 PMID: 14720564

2. World Health Organization (WHO). Monkeypox: experts give virus variants new names. Geneva: WHO; 2022. [Accessed 16 Aug 2024]; Available from: https://www.who.int/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variants-new-names

3. Vakaniaki EH, Kacita C, Kinganda-Lusamaki E, O'Toole Á, Wawina-Bokalanga T, Mukadi-Bamuleka D, et al. Sustained human outbreak of a new MPXV clade I lineage in eastern Democratic Republic of the Congo. Nat Med. 2024. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03130-3 PMID: 38871006

4. Masirika LM, Udahemuka JC, Schuele L, Ndishimye P, Otani S, Mbiribindi JB, et al. Ongoing mpox outbreak in Kamituga, South Kivu province, associated with monkeypox virus of a novel Clade I sub-lineage, Democratic Republic of the Congo, 2024. Euro Surveill. 2024;29(11):2400106. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.11.2400106 PMID: 38487886

5. World Health Organization (WHO). African region faces an unprecedent surge in mpox cases. Geneva: WHO; 2024. [Accessed 16 Aug 2024]. Available from: https://www.afro.who.int/news/african-region-faces-unprecedent-surge-mpox-cases

6. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Epidemiological update: Mpox due to monkeypox virus clade I. Stockholm: ECDC; 2024. [Accessed 02 Sep 2024]. Available from: https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-mpox-due-monkeypox-virus-clade-i

7. Schroeder K, Nitsche A. Multicolour, multiplex real-time PCR assay for the detection of human-pathogenic poxviruses. Mol Cell Probes. 2010;24(2):110-3. https://doi.org/10.1016/j.mcp.2009.10.008 PMID: 19879351

8. Li Y, Zhao H, Wilkins K, Hughes C, Damon IK. Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA. J Virol Methods. 2010;169(1):223-7. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012 PMID: 20643162

9. Chen S, Zhou Y, Chen Y, Gu J. fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics. 2018;34(17):i884-90. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560 PMID: 30423086

10. Li H. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. Bioinformatics. 2018;34(18):3094-100. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty191 PMID: 29750242

11. Minh BQ, Schmidt HA, Chernomor O, Schrempf D, Woodhams MD, von Haeseler A, et al. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era. Mol Biol Evol. 2020;37(5):1530-4. https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015 PMID: 32011700

12. Hoang DT, Chernomor O, von Haeseler A, Minh BQ, Vinh LS. UFBoot2: Improving the Ultrafast Bootstrap Approximation. Mol Biol Evol. 2018;35(2):518-22. https://doi.org/10.1093/molbev/msx281 PMID: 29077904

13. Marennikova SS, Seluhina EM, Mal'ceva NN, Cimiskjan KL, Macevic GR. Isolation and properties of the causal agent of a new variola-like disease (monkeypox) in man. Bull World Health Organ. 1972;46(5):599-611. PMID: 4340219

14. World Health Organization (WHO). Mpox (monkeypox) - Democratic Republic of the Congo. Geneva: WHO; 2023. [Accessed 16 Aug 2024]. Available from: https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON493

15. World Health Organization (WHO). WHO Director-General declares the ongoing monkeypox outbreak a Public Health Emergency of International Concern. Geneva: WHO; 2022. [Accessed 17 Sep 2024]. Available from: https://www.who.int/europe/news/item/23-07-2022-who-director-general-declares-the-ongoing-monkeypox-outbreak-a-public-health-event-of-international-concern

16. Chen N, Li G, Liszewski MK, Atkinson JP, Jahrling PB, Feng Z, et al. Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. Virology. 2005;340(1):46-63. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.030 PMID: 16023693

17. Africa Centres for Disease Control and Prevention (Africa CDC). Africa CDC Declares Mpox A Public Health Emergency of Continental Security, Mobilizing Resources Across the Continent. Addis Ababa: Africa CDC; 2024. [Accessed 02 Sep 2024]. Available from: https://africacdc.org/news-item/africa-cdc-declares-mpox-a-public-health-emergency-of-continental-security-mobilizing-resources-across-the-continent/#:~:text=Addis%20Ababa%2C%20Ethiopia%2C%2013%20Aug,since%20its%20inception%20in%202017

18. World Health Organization (WHO). WHO Director-General declares mpox outbreak a public health emergency of international concern. Geneva: WHO; 2024. [Accessed 21 Aug 2024]; Available from: https://www.who.int/news/item/14-08-2024-who-director-general-declares-mpox-outbreak-a-public-health-emergency-of-international-concern

19. Kinganda-Lusamaki E, Amuri-Aziza A, Fernandez N, Makangara-Cigolo J, Pratt C, Hasivirwe-Vakaniaki E, et al. Clade I Mpox virus genomic diversity in the Democratic Republic of the Congo, 2018 - 2024: Predominance of Zoonotic Transmission. medRxiv2024.08.13.24311951; 2024 . https://doi.org/10.1101/2024.08.13.24311951

Chapitre 8 : Caractérisation moléculaire du Monkeypoxvirus en RDC de 2018 à 2024

8.1. Résumé

Contexte

En novembre 2023, des rapports récents dont un de l'OMS ont soulevé des inquiétudes quant à l'évolution de l'épidémiologie du mpox en République démocratique du Congo (RDC), avec l'augmentation du nombre de cas, les clusters associés à la transmission sexuelle et la transmission interhumaine soutenue due clade Ib. Cependant, seul un nombre limité de génomes du MPXV du clade I a été caractérisé jusqu'à présent, dans un nombre limité de régions. Cette étude s'est donc assigné comme objectif de documenter la diversité génétique du MPXV clade I en vue de comprendre si l'augmentation du nombre de cas de mpox en RDC est due à la transmission zoonotique ou à l'évolution virale liée à l'adaptation humaine et à la transmission interhumaine soutenue.

Methodologie

Nous avons réalisé le séquençage du génome entier de 603 échantillons positifs au mpox qui ont été collectés chez 581 patients entre 2018 et 2024 dans 17 des 26 provinces de la RDC. Le séquençage à haut-débit a été effectué sur la plate-forme Ilumina et des analyses phylogénétiques ont été effectuées sur les séquences consensus obtenues.

Results et conclusion

La couverture génomique était d'au moins 70 % pour 429 échantillons sur 603 (71,1 %) et > 90% pour 348/603 échantillons (57,7 %) provenants de 337 patients. Toutes les séquences de MPXV nouvellement générées appartenaient au clade I, dont 17 étaient des souches du clade Ib, toutes provenant de patients infectés en 2024 dans la province du Sud-Kivu. La grande majorité (>95 %) des nouvelles souches appartiennent à des groupes de clade Ia précédemment décrits et de nouveaux groupes potentiels ont également été observés. Le faible nombre de

mutations de APOBEC3 trouvées dans le clade Ia suggère que la plupart des cas humains de mpox sont probablement liés à des transmissions zoonotiques. Des lignées génétiquement diverses de MPXV co-circulent dans de petites zones géographiques au cours de la même épidémie, ce qui suggère de multiples introductions zoonotiques sur une courte période à partir d'une ou de plusieurs espèces réservoirs. L'identification récente de cas de mpox à Kinshasa montre que plusieurs lignées circulent dans un grand centre urbain, indiquant des événements d'introduction distincts. L'épidémie de mpox en RDC présente deux tendances distinctes. Dans les régions endémiques traditionnelles, l'épidémie est prédominée par des événements de propagation zoonotique impliquant le clade Ia. À l'inverse, dans la partie orientale du pays, l'épidémie du clade Ib est due à la transmission interhumaine, ce qui souligne la nécessité d'un effort de réponse coordonné aux niveaux national, régional et international.

8.2. Article, Cell, 2024

Clade I Monkeypox virus genomic diversity in the Democratic Republic of the Congo, 2018 – 2024 : Predominance of Zoonotic Transmission

Eddy Kinganda-Lusamaki [1,2,3,18,20,*], Adrienne Amuri-Aziza [1,18], Nicolas Fernandez-Nuñez [3], Jean-Claude Makangara-Cigolo [1,2,4], Catherine Pratt [5], Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki [1], Nicole A. Hoff [6], Gradi Luakanda-Ndelemo[1], Prince Akil-Bandali [1], Sabin Sabiti Nundu [1], Noella Mulopo-Mukanya [7], Michel Ngimba [7], Brigitte Modadra-Madakpa [7], Ruth Diavita [1], Princesse Paku - Tshambu[1], Elisabeth Pukuta-Simbu [1], Sydney Merritt [6], Áine O'Toole [8], Nicola Low [9], Antoine Nkuba-Ndaye [1,2,3], Hugo Kavunga-Membo[7], Robert Shongo Lushima[10], Laurens Liesenborghs [11,12], Tony Wawina-Bokalanga [1,2,11], Koen Vercauteren [11], Daniel Mukadi-Bamuleka[1,2,7], Lorenzo Subissi [13], Jean-Jacques Muyembe [1,2], Jason Kindrachuk [14], Ahidjo Ayouba [3], Andrew Rambaut[8] , Eric Delaporte [3], Sofonias Tessema [15], Eric D'Ortenzio[16], Anne W. Rimoin [6], Lisa E. Hensley[17], Placide Mbala-Kingebeni [1,2, 19,****], Martine Peeters [3, 19,**], Steve Ahuka-Mundeke [1,2, 19,***]

[1] Institut National de Recherche Biomédicale (INRB), Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[2] Service de Microbiologie, Département de Biologie Médicale, Cliniques Universitaires de Kinshasa, Université de Kinshasa, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[3] TransVIHMI, Université de Montpellier, INSERM, IRD, 34394 Montpellier, France

[4] Graduate School of Cellular and Biomedical Sciences, University of Bern, 3012 Bern, Switzerland

[5] Biosurv International, Salisbury, SP4 0DQ, England, United Kingdom

[6] Department of Epidemiology, Jonathan and Karin Fielding School of Public Health, University of California, Los Angeles, CA 90095, USA

[7] Rodolphe Merieux INRB-Goma Laboratory, Goma, Democratic Republic of the Congo

[8] Institute of Ecology and Evolution, University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

[9] Institute of Social and Preventive Medicine, University of Bern, Bern, Switzerland

[10] PNLFHMPX, Hemorrhagic Fever and mpox Program, Ministry of Health, Kinshasa, Democratic Republic of the Congo

[11] Department of Clinical Sciences, Institute of Tropical Medicine, 2000 Antwerp, Belgium

[12] Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, KU Leuven, 3000 Leuven, Belgium

[13] World Health Organization, Geneva, Switzerland

[14] Department of Medical Microbiology & Infectious Diseases, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, MB R3E 0J9, Canada

[15] Africa Centers for Disease Control and Prevention (Africa CDC), Addis Abeba, Ethiopia

[16] ANRS Emerging Infectious Diseases (ANRS MIE), Inserm, 75015 Paris, France.

[17] US Department of Agriculture, Manhattan, KS 66502, USA

[18] these authors contributed equally

[19] senior author

[20] lead contact

Corresponding authors:

** Eddy Kinganda-Lusamaki (eddylusamaki@gmail.com): Lead contact*
*** Martine Peeters (martine.peeters@ird.fr);*
**** Steve Ahuka Mundeke (amstev04@yahoo.fr);*
***** Placide Mbala Kingebeni (mbalaplacide@gmail.com)*

Publication History: Received August 23, 2024; Revised September 27, 2024; Accepted October 11, 2024; Published online October 24, 2024
doi: 10.1016/j.cell.2024.10.017, Also available on ScienceDirect

Summary

Recent reports raise concerns on the changing epidemiology of mpox in the Democratic Republic of the Congo (DRC). High quality genomes were generated for 337 patients from 14/26 provinces to document whether the increase in number of cases is due to zoonotic spillover events or viral evolution with enrichment of APOBEC3 mutations linked to human adaptation. Our study highlights two patterns of transmission contributing to the source of human cases. All new sequences from the eastern South-Kivu province (n=17;4.8%) corresponded to the recently described Clade Ib, associated with sexual contact and sustained human-to-human transmission. In contrast, all other genomes are Clade Ia which exhibits high genetic diversity with low numbers of APOBEC3 mutations compared to Clade Ib, suggesting multiple zoonotic introductions. The presence of multiple Clade I variants in urban areas highlights the need for coordinated international response effort and more studies on the transmission and the reservoir of mpox.

Keywords : mpox, virus, genetic diversity, Democratic Republic of the Congo, Genomic, zoonotic spillover

1. Introduction

Mpox, a viral zoonosis caused by Monkeypox virus (MPXV), is endemic within regions of West and Central Africa. The first case of human mpox was identified in 1970 in the Democratic Republic of the Congo (DRC)(Ladnyj et al., 1972). Since its discovery, cases have been predominantly reported in rural and rainforest regions of the Congo Basin in DRC, its neighbouring countries, and in West Africa(Gessain et al., 2022). MPXV is divided into two major clades: Clade I and II in central and West Africa, respectively(Happi et al., 2022). Cameroon is the only country where Clade I and II are known to co-circulate with clades I and II segregated to regions east and west within the country, respectively(Djuicy et al., 2024). Clade II is subdivided into Clade IIa that contains the viruses from west of the Dahomey Gap in West Africa, and Clade IIb regroups all the sequences from the 2022 global mpox outbreak as well as sequences obtained from Nigeria and east of the Dahomey Gap (Cabanillas et al., 2023; Happi et al., 2022; WHO, 2022b, 2022d). Through recent genomic analysis of MPXV strains in eastern DRC we identified a distinct subclade within Clade I, designated as Clade Ib [8]. Previous phylogenetic studies of Clade I MPXV in central Africa showed the existence of five main groups (named I to V) in Clade I, now referred to as Clade Ia [9,10].

To date, thousands of human cases have been reported in Africa, with the highest burden in DRC (>95% of reported cases), where a national surveillance system has been in place since 2001 (Beer & Rao, 2019; Bunge et al., 2022; Gong et al., 2022; Rimoin et al., 2010; Sklenovská & Van Ranst, 2018). Historically, most mpox outbreaks in Africa have resulted from zoonotic spill-over events followed by limited human-to-human transmission through close contact. Additionally, sporadic travel- or wildlife-associated cases of Clade II have been documented in non-endemic regions with an epidemiological link to African foci (Erez et al., 2019; Mauldin et al., 2022; Ng et al., 2019; Reed et al., 2004; Vaughan et al., 2018). However, in May 2022, a large mpox outbreak with Clade IIb viruses affected 109 non-endemic countries, associated

with sexual contact and dense sexual networks among men who have sex with men (Sharif et al., 2023). The outbreak resulted in >102,000 cases worldwide and the declaration of the first mpox public health emergency of international concern (PHEIC) by the World Health Organization (WHO) (CDC, 2022). Despite a significant decrease in the number of cases worldwide, this outbreak is still ongoing (WHO, 2023)[-25].

Overall, the greatest historical burden of mpox globally has occurred within the DRC where the number of suspected mpox cases has doubled in recent years rising from approximately 3,000 cases in 2021 to 5,600 in 2022, >14,000 in 2023 and >20,000 as of 01 September 2024 with all 26 provinces now reporting at least one suspected case [26-28]. Since 2023, mpox cases have been reported from an increasing number of provinces, including new foci in large urban areas and transportation hubs, including Kinshasa (the capital city of the DRC), Bukavu, and Goma in eastern DRC (SGI-Mpox, 2024). Moreover, sexual contact-associated transmission has been reported in multiple regions of the country including Kwango province in the south-west and a large outbreak in South-Kivu province in the east, a region where mpox was rarely reported prior to 2023 [8,] (Kibungu et al., 2024)[,30]. The eastern DRC outbreak was first reported in September 2023 in Kamituga, a mining region, before spreading to other cities in South-Kivu province and Goma in the neighbouring North-Kivu province and cases with the new clade Ib have also been reported in Kinshasa, the capital city, since July 2024 [31-35]. Moreover, the outbreak reached also neighbouring countries in the east such as Rwanda, Uganda, Kenya and Burundi (INRB, 2024; Oude Munnink et al., 2024; SGI-Mpox, 2024; WHO, 2024d) and rare case have been reported in Europe and Asia [36, 37]. Signatures of APOBEC3-mediated mutation were observed in these Clade Ib strains which suggests human-to-human transmission and clinic-epidemiological data supports that the virus was likely also being spread through sexual-contact [8,32-34]. Taken together, these events have led to the declaration of a Public Health Emergency of Continental Security (PHECS) by Africa CDC on

August 13th and the declaration of a second PHEIC for mpox by the WHO Director-General on August 14th [36].

It is well-documented that human-to-human transmission is the primary driver behind the Clade Ib outbreak in South Kivu [8,32-34]. However, questions remain about whether the rising numbers of mpox infections in other parts of the country are also due to interhuman transmission or if they result from zoonotic spillover. Unfortunately few strains from central Africa have been sequenced so far and the number of publicly available Clade I genomes is insignificant compared to the number of reported cases [8-10,29,30,38]. In this study, we sequenced and characterized MPXV genomes from samples collected between February 2018 and March 2024 as part of the national surveillance network in order to better document: (i) the genetic diversity of Clade I MPXV in DRC and (ii) whether the increase in the number of mpox cases in DRC is due to zoonotic transmission or viral evolution that has been linked to human adaptation and sustained human-to-human transmission.

2. Results

Characteristics of patients and samples

A total of 603 samples, collected from 581 patients, were sequenced. The samples were collected between February 2018 and March 2024 as follows; 2018 (n=13), 2020 (n=3), 2021 (n=6), 2022 (n=138; 125 patients), 2023 (n=390; 382 patients) and 2024 (n=53; 52 patients). For a subset of 22 patients, more than one sample type was analysed. Samples originated from 17 of the 26 provinces and 102 of the 519 health zones in DRC (***Figure 62***). The genome coverage was at least 70% for 429 of the 603 (71.1%) samples. High quality genomes (>90% coverage with a minimum depth of 10x) were recovered for 348 (57.7%) samples, representing 337 patients from 14 provinces and 67 health zones. Demographic information including health zone and province locations are provided in ***Tableau 23***. Among the 581 patients, 319 (54.9%)

were male, 236 (40.6%) were female and no information was available for 26 (3.7%). The overall median age was 14 years (interquartile range, IQR: 7-27).

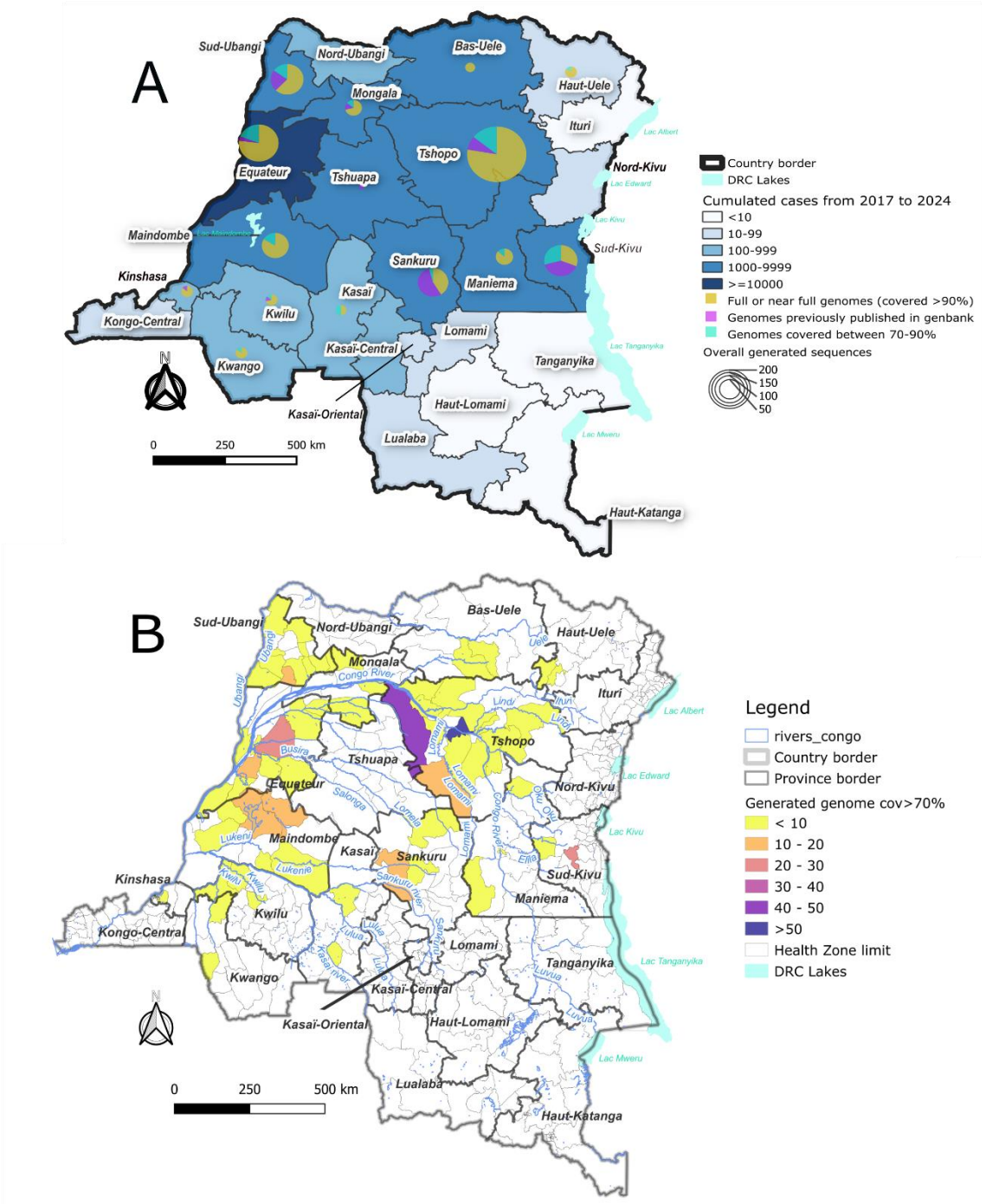


Figure 62 : *Maps with number of monkeypox virus (MPXV) samples sequenced per province between 2018 and March 2024 and in the different health zones (HZ) per province.*
(A) Map with number of monkeypox virus (MPXV) samples sequenced per province between 2018 and March 2024 represented by size of circles. Different colors illustrate genome coverage from samples in our study (>90%, brown; between 70-90%, turquoise) and strains available in GenBank (pink) from the same provinces. The background map illustrates the number of cumulative suspected mpox cases reported between 2018 and March 2024 in gradients of blue; (B) Map representing the number of monkeypox virus (MPXV) genomes with more than 70% of genome coverage in the different health zones (HZ) per province in a color gradient of range of samples sequenced.

Tableau 23 *: Demographic characteristics of mpox patients with viruses sequenced*

Province	Number HZ with samples / HZ province	HZ with MPXV genome coverage >90%, n (names)	Samples with genome coverage >90%, n	Patients sampled, n	Sex ratio (M/F); missing, n	Age in years, median (IQR)	Collection period, months	genomes, in genbank
Bas-Uele	3/11	2 (Buta,Titule)	5	8	1.7 (5/3)	29 (12.5-34.5)	2.5	-
Equateur	11/18	11 (see footnote)	60	91	1.1 (43/39); 9	11 (5-23)	24.8	3
Haut-Uele	2/13	2 (Isiro, Pawa)	6	10	1.5 (6/4)	25 (10-41)	21.8	-
Kasaï	4/18	2 (Kamuesha, Ndjoko-punda)	3	7	0.8 (3/4)	18 (9-31)	0.6	-
Kasaï-Central	1/26	-	-	1	NA (1/0)	17	-	-
Kinshasa	8/34	5 (Gombe, Lemba, Limete, Matete, N'sele)	6	12	2 (8/4)	20 (11-23)	2.3	1
Kwango	4/14	2 (Kasongo-Lunda, Kenge)	6	13	1.6 (8/5)	30 (24-40)	14	-
Kwilu	7/24	4 (Bagata, Kikongo, Masima-nimba, Vanga)	5	8	3 (6/2)	9 (8-20)	16.5	1
Lomami	1/16	-	-	1	NA (0/1)	36	-	-
Maindombe	7/14	5 (Banjow-Moke, Bosobe, Inongo, Kiri, Mushie)	30	58	1 (28/29); 1	14 (7-30)	9.2	-
Maniema	4/18	3 (Kindu, Obokote, Tunda)	13	15	0.9 (7/8)	9 (7-21)	8.3	-
Mongala	5/12	3 (Bongandaganda, Bosomanzi, Bosondjo)	10	16	3.7 (11/3); 2	10 (4-13)	11	2
North-Ubangi	2/11	-	-	3	0.5 (1/2)	18 (5-35)	-	-
Sankuru	5/16	5 (Bena-Dibele, Lodja, Lomela, Ototo, Vanga-kete)	19	26	1.4 (15/11)	15 (4-24)	67.3	25
South-Kivu	3/34	2 (Kadutu, Kamituga)	17	31	2 (18/9); 4	27 (21-32)	3	22
South-Ubangi	15/16	8 (see footnote)	33	57	1.8 (34/19); 4	11 (4.5-27)	14	12
Tshopo	19/23	13 (see footnote)	136	224	1.3 (125/93); 6	13 (7-25)	73	13
Tshuapa	0/12	-	-	-	-	-	-	1
Total	**101/330**		**348**	**581**	**1.4 (319/236); 26**	**14 (7-27)**	**NA**	**80**

HZ, health zone; IQR, interquartile range; NA, not applicable; Equateur health zones: Basankusu, Bikoro, Bolomba, Djombo, Ingende, Lilanga-Bobangi, Lotumbe, Lukolela, Mbandaka, Ntondo and Wangata; South-Ubangi health zones: Bangabola, Bogose-Nubea, Bokonzi, Boto, Budjala, Bulu, Libenge and Mbaya; Tshopo health zones: Bafwasende, Basali, Basoko, Bengamisa, Kabondo, Kisangani, Opala, Wanie-Rukula, Yabaondo, Yahuma, Yakusu, Yaleko and Yalimbongo.

Sample types used for sequencing included vesicle (n=267, 44.3%), crust (n=255, 42.3%), blood (n=64, 10.6%) and oropharyngeal swabs (n=17, 2.8%) with the highest genome coverage and sequencing depth obtained from vesicles and crusts. The sequence coverage and quality were highly correlated with viral load (R=-0.3696, 95%CI [-0.4392, -0.2955] and p<0.0001) with >90% coverage 69% (243/352) of samples with Ct-values <20, 43% (96/221) for Ct-values between 20 and 30, and 11.7% (2/17) with Ct-values >30, independent of the nature of samples (***Figure 65***).

Phylogenetic analysis of MPXV strains: phylogeographic subclusters and spread in urban settings

Analysis of the new MPXV sequences using Nextclade showed that all sequences belong to Clade I. We estimated a maximum likelihood (ML) phylogeny with 348 newly obtained and high quality MPXV genomes (genome coverage >90%) from this study and previously published reference sequences of the different clades and subclades. The 17 new sequences obtained from MPXV-infected individuals in the South-Kivu province in 2024 corresponded to the newly described Clade Ib with little genetic diversity. In contrast, all genomes analyzed from elsewhere in the country corresponded to Clade Ia in which high genetic diversity is seen (***Figure 63***). Using the maximum composite likelihood and 100 bootstraps, the genetic distance within clades Ia and Ib was calculated on the same alignment as used for the phylogenetic trees. The intra-clade genetic distance was ten-fold higher in clade Ia than Ib, i.e. $2.13x10^{-4}$ and $0.23x10^{-4}$ respectively. Between the two clades, the genetic distance was $6.20x10^{-4}$.

According to the previously described Clade Ia groups [8,9], none of the new sequences belonged to group I which includes only previously reported strains originating from Cameroon and Gabon (***Figure 63a*** and ***Figure 63b*****)**. Group II is the most diverse and widespread across DRC and contained 328 genomes (including 278 (79,9%) of the new genomes and 50

previously published). Group II also included previously reported sequences from neighbouring countries; i.e. Central African Republic (CAR) (n=10), Sudan (n=2) and Republic of Congo (n=1). Most of the group II sequences in this study came from health zones located around the Congo River or its tributaries such as Ubangi river (North East); Itimbiri, Aruwimi or Uele rivers (North Central); and Kasaï rivers network (South West) (***Figure 63b***). As highlighted in ***Figure 63a***, at least three subclusters were observed within group II, suggestive of potential new groups or subgroups. Group III and IV only had MPXV genomes from the DRC (***Figure 63a***). Group III strains were found in central DRC, mainly Sankuru and Tshopo provinces; group IV strains were observed across Kwilu, Sankuru, and Maniema provinces, corresponding mainly to the southern savannah area of the country (***Figure 63b***). Group V included only one previously described isolate from Sankuru District, DRC in 2006 (JX878417). We also identified a new group of 32 sequences that circulates in Tshopo province (***Figure 63a*** and ***Figure 63b***). The few previously reported Clade Ia genomes from wildlife fall in group I, for the strain obtained from a chimpanzee in Cameroon, and in groups II and III for squirrels (*Funisciurus sp*) and shrews (*Crocidura sp*) from DRC (***Figure 63a***). Interestingly, the six strains from Kinshasa fall into three different lineages from group II and cluster with strains from endemic provinces like Mai-Ndombe and Equateur (***Figure 66***).

The phylogenetic tree contains also information on the time period of sample collection as illustrated by colored boxes for each sample and illustrates that some sequences from strains collected before our study are close to recently obtained samples as shown in some subclusters of group II. ***Figure 63c*** shows the geographic location where ancient and recent strains co-circulate, however the number of sites overlapping with our and previous studies are low given the limited sites from which samples have been previously described.

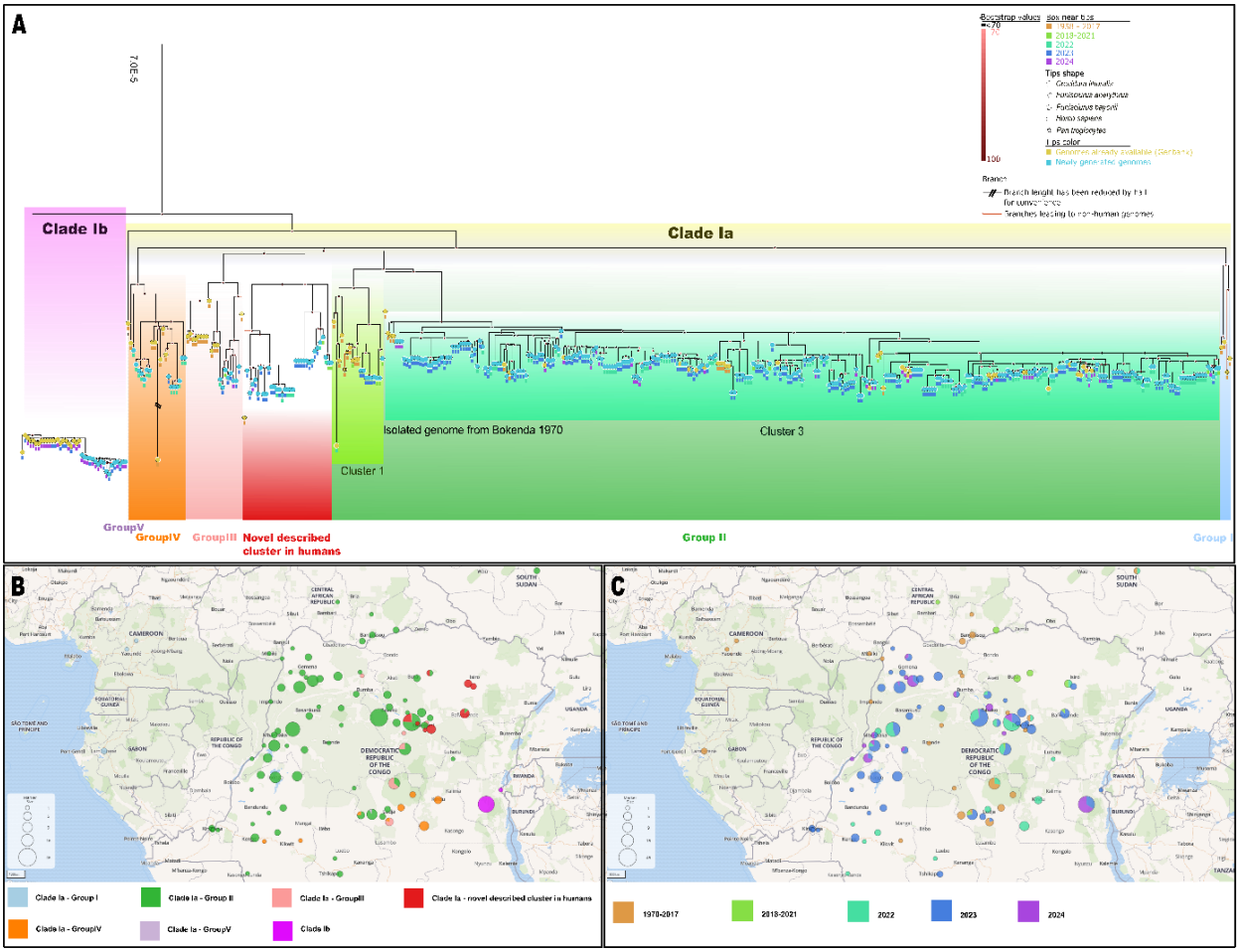


Figure 63 : *Phylogenetic tree analysis of newly obtained monkeypox virus (MPXV) strains and the geographical location of the different subclades and Clade Ia groups and period of sample collection.*

(A) Phylogenetic tree analysis of the 348 newly obtained monkeypox virus (MPXV) strains (> 90% coverage) from humans (blue dots) and reference strains available in GenBank (yellow dots for humans and other symbols for animals, see also figure S2), as described in Methods. Period (years) of sampling dates are highlighted by color codes in boxes near the tips (1958-2017, orange; 2018-2021, green; 2022, light blue; 2023, dark blue; 2024, purple). The different clades and groups within Clade Ia are highlighted in different colors; Clade Ib, pink; Clade Ia group I, blue; Clade Ia group II, green (different grades of green for potential subgroups); Clade Ia group III, light orange; Clade Ia group IV, dark orange; Clade Ia group V, a single branch and a potential new group in red; (B) circles on the map illustrate the geographical location of the different subclades and Clade Ia groups in the same colors as in the phylogenetic tree and the numbers are reflected by the size of the circles; (C) circles on the map illustrate the geographical location according to the period of sample collection in the same colors as the boxes near the tips in the phylogenetic tree and the numbers are reflected by the size of the circles. Bootstrap values (>70%) are shown on the nodes in different color grades of red (lowest) to black (highest).

Co-circulation of different MPXV sub-lineages

In several areas we observed co-circulation of different Clade Ia groups; in Sankuru province, groups II, IV, and V were present and given the large geographic spread of group II, co-circulation of group II alongside groups III or IV is seen in other provinces. Importantly, co-circulation of diverse MPXV variants from the same and different groups has also been observed at a smaller scale as shown on the examples in ***Figure 64*****.** In Bikoro health zone (Equateur province), three different viral variants were present between 22 April and 3 May 2023 (***Figure 64a***). Similar patterns were observed in Yakusu health zone (Tshopo province) where two viral strains circulated between 10 December 2022 and 2 January 2023 (***Figure 64b***) and Bolomba health zone (Equateur province) where two different viral strains were detected between 9 September and 1 October 2022 (***Figure 64c***). In the Inongo health zone (Maindombe province), three different outbreaks occurred in 2023, each with multiple co-circulating lineages (***Figure 64d***). In contrast, in South Kivu Province, no such diversity was observed and all genomes analysed in this and other studies belonged to a single lineage of Clade Ib.

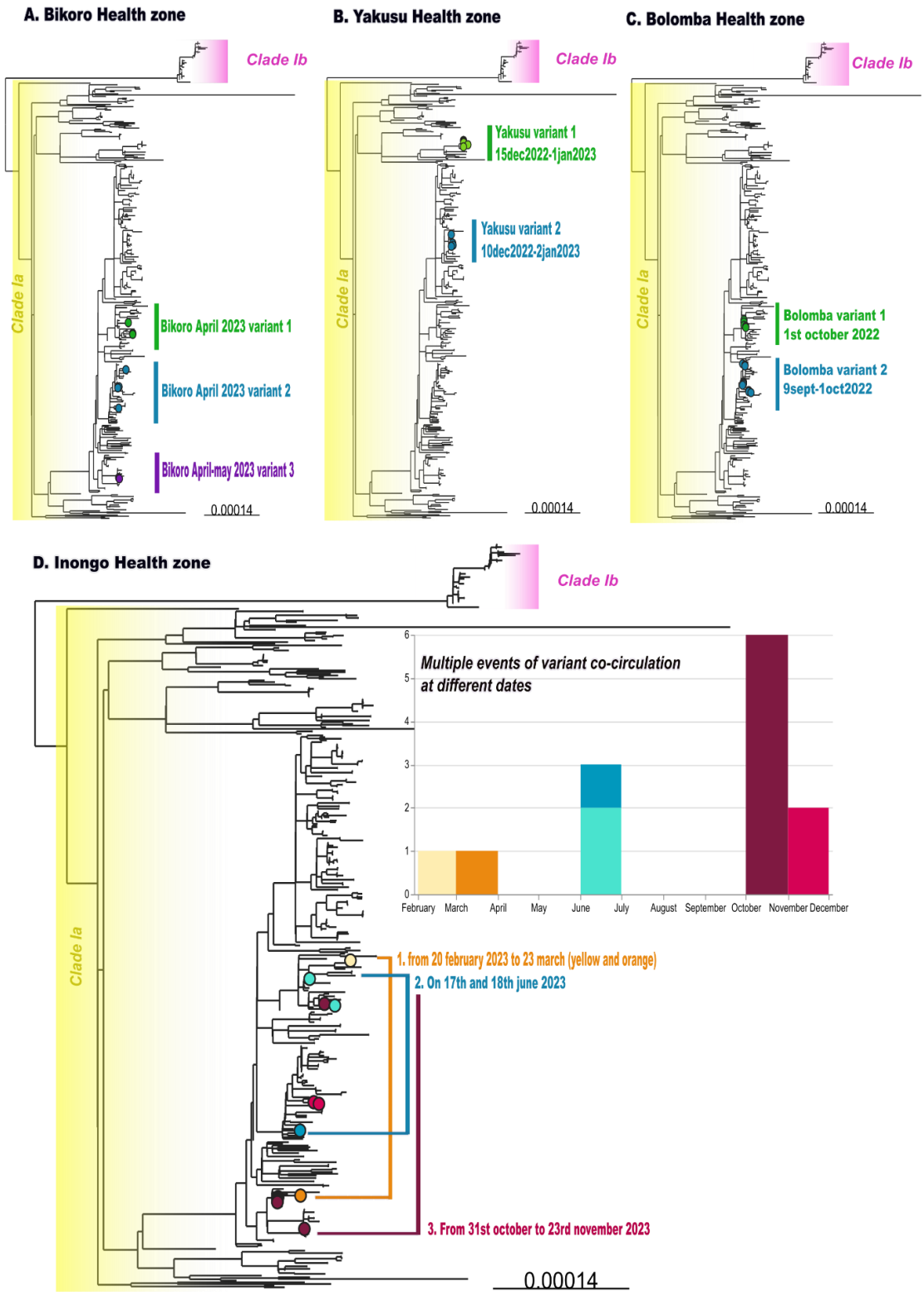


Figure 64 : *Phylogenetic trees showing examples of health zones where multiple monkeypox virus (MPXV) strains cocirculate in the same time period suggesting multiple introductions of viral strains.*

(A) Bikoro health zone in the Equateur Province, three variants cocirculate between April and May 2023; (B) Yakusu health zone in Tshopo province, two variants cocirculate in December 2022; (C) Bolomba health zone in the Equateur province, two variants cocirculate between September and October 2022; (D) Inongo health zone in the Maindombe Province, three events with cocirculation of multiple variants Inongo Health in the Maindombe Province, three events with co-circulation of multiple variants between February and November 2023 (shown in different colors).

APOBEC3 mutations observed among circulating strains

To study the extent of human-to-human transmission, we analysed the different genomes from this study for APOBEC3-related mutations. Here, we included all 429 MPXV sequences with >70% genome coverage and the previously published Clade I sequences (***Tableau 25***). Overall, our dataset shows very little signal of APOBEC3 mutations enrichment in the clade Ia sequences with an overall frequency of 10.7% (195/1827) and a ratio of 11.9% (195/1632) of APOBEC3 mutations versus 35.9% (23/64) and 56.1% (23/41) respectively for clade Ib (***Tableau 24***, ***Tableau 26*** and ***Figure 67***). The ratio of APOBEC3 mutations to non APOBEC3 varied across the different clade Ia groups and ranged between 3.0 to 13.2% (***Tableau 24***).

Tableau 24 *: APOBEC3 and other mutations in monkeypox virus (MPXV) subclades Ia and Ib and in the different groups of subclade Ia.*

Clade - group	APOBEC3	Other	Total	Ratio APOBEC3/other	APOBEC3/Total, %
Overall Clade Ia	**195**	**1632**	**1827**	**0.119**	**10.7%**
Clade Ia- Group 1	5	95	100	0.053	5.0%
Clade Ia- Group 2	147	1112	1259	0.132	11.7%
Clade Ia- Group 3	11	145	156	0.076	7.1%
Clade Ia- novel	28	221	249	0.127	11.2%
Clade Ia- Group 4	1	12	13	0.083	7.7%
Clade Ia- Group 5	1	33	34	0.030	2.9%
Overall Clade Ib	**29**	**111**	**140**	**0.261**	**20.7%**
Clade Ib internal branches	23	41	64	0.561	35.9%

More in detailed analysis of the sequences shows slightly higher rates in some clade Ia sequences, for example ratios are higher in health zones of Kisangani (Urban area) and Yakusu

at 25 km distance in the Tshopo province, Bangabola health zone in Sud-Ubangi or Kindu health zone in Maniema province (***Figure 67A***).

3. Discussion

In this report we have characterized the diversity of MPXV in DRC from 2018 to early 2024 and provide insight into the potential drivers underlying the increasing mpox cases. This study generated a total of 348 near-complete (> 90% genome coverage) MPXV genomes from 337 individuals in 14 out of 26 provinces. Almost all (95%) of the new strains characterized during that time period belong to Clade Ia, in which high genetic diversity is observed. Most new Clade Ia strains were in the previously described group II, followed by group III and IV [9,10]. We also identified new clusters representing potential new groups and sub-groups but their significance and nomenclature have to be further determined with precise rules that have to be determined by a specialized committee. In contrast, the new Clade Ib strains, all from South Kivu province in 2024, cluster in the single lineage recently described in the South Kivu and North Kivu provinces, with little diversity [8,31,33,]. Our study highlights two patterns of transmission contributing to the source of human cases: the traditional paradigm of zoonotic spill-over with interspecies transmission events and the more recently observed sustained human-to-human transmission driven by sexual contact with an enrichment of APOBEC3-type mutations. The low number of APOBEC3 mutations observed in Clade Ia suggests that most mpox cases have resulted from independent zoonotic introductions into the human population. We also showed that genetically diverse MPXV lineages can co-circulate in small geographic areas during the same outbreak, suggesting multiple zoonotic introductions over a short time span from one or multiple reservoir species. The observation of some small mpox clusters from endemic areas with slightly increased numbers of APOBEC3 mutations in viral genomes suggest that there might also be some sustained human transmission in these areas from

potential transmission chains that were missed. Nevertheless, more investigations and studies on role of APOBEC3 mutations in increased transmissibility of MPXV are needed.

The increasing numbers of mpox cases reported from provinces in DRC around the Congo river and its tributaries highlight the potential links between viral spread and human activities around these rivers and reflects possible widespread presence of the animal reservoir for these variants. Human activities could have potentiated MPXV introductions to new health zones and urban areas as illustrated by the introduction of multiple lineages in Kinshasa linked to MPXV strains originating from endemic areas in 2023. River transport remains essential for communications in this part of DRC were many regions are inaccessible by road. As such rivers are connecting rural and urban regions in DRC but are also important for travel between major cities of DRC with the Republic of Congo and the CAR. Suspicion of cross-border transmission of mpox between DRC and Republic of Congo has been recently reported, as well as presumed mpox transmission between DRC and CAR by a fisherman who has family members in both countries [39, 40]. These events should be closely monitored as they represent a major threat for additional regional and international dissemination in densely populated areas. This is of particular concern given the increased disease severity associated with Clade I MPXV as compared to Clade II [41,42].

A strength of this study is that we documented for the first time a large number of Clade I MPXV sequences from most of the provinces within DRC that are endemic for mpox with the highest number of mpox cases and from provinces, such as South-Kivu, with more recent reports of mpox cases. Our study provides thus important new information about the genetic diversity of MPXV circulating in DRC. mpox in DRC is caused predominantly by Clade Ia, traditionally associated with zoonotic transmission events. It is thus urgent to better document the nature and extent of animal reservoirs to understand whether the increasing number of cases results from increased direct contacts with putative natural reservoirs, an increase in prevalence

of the infection in the animal reservoir, an increase in animal reservoir populations, or a combination of those. The newly described Clade Ib was found only in samples from South-Kivu and the limited genetic diversity is compatible with its emergence in 2023 [8,32,33]. More information is needed about the clinical presentations of mpox caused by different clades and subclades. In the multi-country outbreak of Clade IIb, pauci- or asymptomatic cases were documented [43,44]. The clinical presentation of mpox can also differ according to transmission modes, as shown in South-Kivu and North Kivu versus endemic regions in DRC [8]. The long-term impact of mpox on clinical sequelae, viral dynamics in animal reservoirs and human-to-human transmission, host-immune responses, and persistence of humoral and/or cellular immunity over time need also to be documented.

The recent declaration of a second PHEIC[36] has substantial implications for mpox surveillance and for studies of the genomic diversity of MPXV in DRC, regionally in Central and East Africa, as well as internationally. The global 2022 mpox outbreak highlighted that MPXV is a pathogen of public health concern. The increasing numbers of mpox cases in endemic provinces in DRC and the ongoing outbreak in South-Kivu, which started in a mining city and further disseminated to larger urban areas in DRC, including the capital city Kinshasa [35], as well as to other countries in east Africa (Burundi, Kenya, Rwanda and Uganda) previously unaffected by mpox (WHO, 2024d) underscores the critical need to improve preparedness and coordinate response efforts at the regional and international level. Recent identification of mpox cases in Kinshasa and the presence of multiple lineages in a large urban center also suggest the potential for broader regional and international spread with multiple Clade I lineages[35]. At the national level, it is urgent to improve access to mpox diagnostic tools, decentralize testing with appropriate materials in health facilities to allow safe and adequate sampling of skin lesions for molecular diagnosis. MPXV genomic surveillance and characterization of MPXV clades and subclades needs to be scaled up, with timely sharing of genome sequences at regional and

international level. Nevertheless, the logistical, economic and political challenges for genomic surveillance are as big as the DRC itself, with requirements to access remote areas and deal with security issues in conflict zones. It is time to join efforts to strengthen genomic surveillance in the fight against recurrent mpox epidemics in DRC and worldwide.

Limitations of the study

There are also limitations. First, the global picture of MPXV diversity remains incomplete as the 348 MPXV genomes with >90% coverage represent a minority of the suspected mpox cases and only from symptomatic patients seeking health care. More large-scale studies, including genomic surveillance and serosurveys with accompanying epidemiological and clinical data are needed to characterize the extent of the mpox epidemic in humans and the genetic diversity of MPXV strains involved. Secondly, the samples collected and shipped for confirmatory tests were not always from the primary cases [45]. Thus, more studies are needed for investigating primary cases and a better understanding of viral introduction into the human population.

Resource Availability

Lead contact: Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by Eddy Kinganda – Lusamaki (eddylusamaki@gmail.com)

Materials availability: This study did not generate new reagents.

Data and code availability: Sequences generated during this study are deposited at GenBank under access numbers from PQ221485 - PQ221913. Previously published MPXV genomes used in the phylogenetic analysis are listed in ***Tableau 25*** with NCBI Genbank accession number (Accession) and related information. Alignments used for phylogenetic trees and corresponding metadata are available at *https://forge.ird.fr/transvihmi/nfernandez/Clade-I_mpox-virus_genomic-diversity_DRC*. The analysis output and maps are also available at *https://microreact.org/project/kHrhfmvv8GhRYUBUXxawoJ-cladei-mpxv-genomic-diversity-*

from-2018-2024-drc. Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

Acknowledgements :This work was enabled by the valuable contribution of all Provincial Health Division and Health zones, Francois Kasongo, Junior Bulabula, Paul Tshiminyi, Elisabeth Muyamuna, Frida Nkawa, Emmanuel Lokilo, Sifa Kavira, Ola Rilia, Chloé Muswamba, Francisca Muyembe, Emile Muhindo-Milonde, Adèle Kavira-Kamaliro, Zéphanie Paluku-Kalimuli, Jeriel Mubalama-Mufungizi, Tavia Bodisa-Matamu, Raphael Lumembe, Gabriel Kabamba, Michel Kenye, André Citenga, Fiston Cikaya, Meris Matondo, Emile Malembi, Cris Kacita, Thierry Kalonji, Mike R. Wiley, Elise De Vos, Eugene Bangwen, Isabel Brosius, Edyth Parker, CZID Biohub.

This study was supported by Africa CDC Pathogen Genomics Initiative (Africa PGI) (Grants: BMGF-INV-018278; INV-033857; Saving Lives and Livelihoods program; NU2HGH000077); Agence Française de Développement through the AFROSCREEN project (grant agreement CZZ3209, coordinated by ANRS-MIE Maladies infectieuses émergentes in partnership with Institut de Recherche pour le Développement (IRD) and Pasteur Institute); PANAFPOX project funded by ANRS-MIE ; Belgian Directorate-general Development Cooperation and Humanitarian Aid and the Research Foundation – Flanders (FWO, grant number G096222 N to L.L.); Department of Defense, Defense Threat Reduction Agency, Monkeypox Threat Reduction Network; USDA Non-Assistance Cooperative Agreement #20230048; International mpox Research Consortium (IMReC) through funding from the Canadian Institutes of Health Research and International Development Research Centre (grant no. MRR-184813); Wellcome Trust (Collaborators Award 206298/Z/17/Z, ARTIC network); E.L. received a PhD grant from the French Foreign Office.

Author contributions: Conceptualization, E.K-L., P.M-K., E.D., M.P. and S.A-M.; Methodology, P.M-K., C.P., A.A., M.P. and S.A-M.; Software , N.F-N., A.O.T. and A.R.;

Validation, A.A-A., E.K-L., G.L-N., N.F-N., M.P., P.M-K., A.O.T. and A.R.; Formal Analysis, E.K-L., G.L-N., N.F-N., P.P., A.O.T., A.R. and M.P., Investigation, A.A-A., E.K-L., E.H.V., G.L-N., N.F-N., P.A-B., N.M-M., M.N., B.M-M., P.P-T., E.P-S.,J-C.M-C., R.S.L., S.S-N., R.D., H.K-M., L.L., D.M-B., S.A-M. and P.M-K. ; Resources, C.P., N.A.H., L.L., J-J.M-T., D.M-B., J.K., E.D., S.K.T, E.DO., A.W.R., L.E.H., Data Curation, D.M-B., G.L-N., N.F-N., E.K-L., A.A-A., Writing – Original Draft, E.K-L., P.M-K., A.A., M.P. and S.A-M.; Writing – Review & Editing, E.K-L., N.A.H., S.S-N., S.M., A.O.T., N.L., A.N-N., H.K-M., L.L., T.W-B., K.V., D.M-B., L.S., J.K., A.A., E.D., S.K.T., E.DO., A.W.R., P.M-K. and M.P.; Visualisation, E.K-L., M.P., A.O.T. and A.R.; Supervision, P.M-K., S.A-M., M.P., N.A.H., D.M-B., T.W-B., A.A., A.N-N., A.A-A. and E.K-L. ; Funding Acquisition, E.D., M.P., E.DO., S.K.T., A.W.R., L.E.H., J.K., L.L., P.M-K., S.A-M. and J-J.M-T.

Declaration of interests: The authors declare no competing interests.

4. Star Methods

RESOURCE AVAILABILITY

Lead contact

Further information and requests for resources and reagents should be directed to and will be fulfilled by Eddy Kinganda – Lusamaki (eddylusamaki@gmail.com)

Materials availability :

This study did not generate new reagents.

Data and code availability

Sequences generated during this study are deposited at GenBank under access numbers from PQ221485 - PQ221913. Any additional information required to reanalyze the data reported in this paper is available from the lead contact upon request.

STUDY PARTICIPANT DETAILS

Samples

Samples were collected as part of the national Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR) program. Cases of mpox were identified by each health zone's surveillance team according to the IDSR (DRC) and WHO standard definition (WHO, 2022b). Skin lesions (vesicle or scab), blood or oropharyngeal swab, were collected from mpox-suspected individuals. We collected information on age, sex, collection time, time of onset of clinical signs, health zone and province, using the national investigation form. The biological samples were shipped via routine surveillance circuits from health facilities to the provincial level hub and finally from the Provincial Health division to the national reference laboratory (Institut National de Recherche Biomédicale, INRB) in Kinshasa, for PCR confirmation of mpox. Samples from the Eastern part of the country were shipped to the Rodolphe Mérieux-INRB laboratory for PCR confirmation in Goma.

Ethics statement

Samples were collected as part of national diagnostic and surveillance activities. Authorization for secondary use of the samples for research in this study was obtained from the Ethics Committee of Kinshasa School of Public Health (ESP-UNIKIN, Number ESP/CE/05/2023). The study samples and data were de-identified before genomic and epidemiological analyses.

METHOD DETAILS

DNA extraction and molecular testing for mpox diagnosis

Skin lesion swabs were suspended in 1 mL of molecular biology grade PBS 1X prior to inactivation and nucleic acid extraction. DNA was extracted using the QIAamp® DNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) or RADI kit (KH Medical, Seoul, South Korea) following the manufacturer's instructions. Samples were tested for mpox by real-time PCR using either a

panel of primers able to detect orthopoxviruses [46,47] or with specific MPXV PCR detection assays (RADIPREP kits *http://www.khmedical.co.kr/monkeypox04.php*) or Bioperfectus (*https://www.bioperfectus.com/ProductDetail/MonkeypoxVirusRealTimePCRKit*).

Whole genome sequencing of MPXV

Samples with sufficient volume with positive results for MPXV and by preference with Cycle threshold (Ct) values ≤30 were selected for whole genome sequencing. The Illumina DNA Prep protocol with probe enrichment was used to generate enriched libraries for dual-index paired-end sequencing, using either the comprehensive pan-viral or a custom panel designed for high-consequence viruses, including MPXV [48]. The enriched libraries prepared with DNA Prep or Nextera kits (Illumina, *www.illumina.com*) were loaded onto an Illumina iSeq100®, Miseq® or Nextseq2000® for 2 x 151 cycles as described previously [49]. The resulting FASTQ files were analyzed using CZid (*https://czid.org*) and GeVarLi (*https://forge.ird.fr/transvihmi/GeVarLi*) for quality control and data cleaning of sequencing reads. Variant calling and genome coverage statistics were then performed, and a consensus genome sequence was generated using the Clade I reference genome (Accession number: NC_003310.1). Clade assignment was done using Nextclade–mpox (all clades, https://clades.nextstrain.org/). All sequences are available in Genbank.

Phylogenetic analysis of near-complete MPXV genomes.

The new MPXV near-complete genomes from this study were aligned with high-quality and complete MPXV genomes (publicly available and retrieved from NCBI GenBank). These sequences were selected to cover the known Clade I diversity (n=98) from DRC and other Central African countries and isolated from humans and animals. Clade II sequences (n=43) were used as outgroup (***Tableau 25***). Multiple sequence alignment was performed using SQUIRREL (*https://github.com/aineniamh/squirrel*), which uses Minimap2 to map the genomes against the Clade I reference (Accession number NC_003310), aligns them and masks

problematic regions [50]. The best substitution model, based on aligned data, was obtained using Modelfinder [51] implemented in IQ-TREE. The phylogeny was inferred by Maximum Likelihood (ML) using IQ-TREE multicore version 2.2.6 [52]. Branch support was estimated by ultrafast bootstrap with 1000 replicates [53]. Trees were formatted and annotated with FigTree (*http://tree.bio.ed.ac.uk/software/Figtree/*) and *Microreact* [54]. Genetic distances were calculated using Maximum Composite Likelihood using MEGA version 11 [55].

APOBEC3 analysis of the new MPXV sequences

The new MPXV sequences (with >70% genome coverage) were aligned to the Clade I reference genome NC_003310 using Minimap2 v2.17, after exclusion of the 3' terminal repeat region of the MPXV genome by trimming sequences starting from position 190788 to the end. Additionally, several identified repetitive or low-complexity regions specific to Clade I were masked from the alignment. The complete alignment, extraction and masking pipeline can be accessed at *http://github.com/aineniamh/squirrel*. Subsequently, Clade II MPXV genomes dated 1978, 1970 and 1971, were used as outgroups (accession numbers KJ642615, KJ642616 and KJ642617, respectively) in IQ-TREE 2 with the HKY substitution model [51] to allow estimation of a maximum likelihood tree. Ancestral reconstruction was performed for each internal node of the phylogeny using IQ-TREE 2, allowing mapping of single nucleotide polymorphisms (SNPs) along branches. SNPs were categorized based on their consistency with APOBEC3-editing, assuming that this process induces specific mutations (TC->TT and GA->AA)[56].

Statistical data analysis

Categorical data were expressed in frequencies, while continuous ones were expressed in median and quantiles using MS Excel 2019, STATA15 and RStudio. To explore correlation between genome coverage and PCR cycle threshold, Pearson correlation test was performed at significance level of $p < 0.05$ using GraphPad Prism 10. We mapped the geographical distribution of suspected cases and sequenced samples by health zone and province using QGIS version 3.22.11. Shapefiles for province and health zone borders were obtained from the Humanitarian Data Exchange (*https://data.humdata.org/*).

Supplemental materials

Supplementary figures

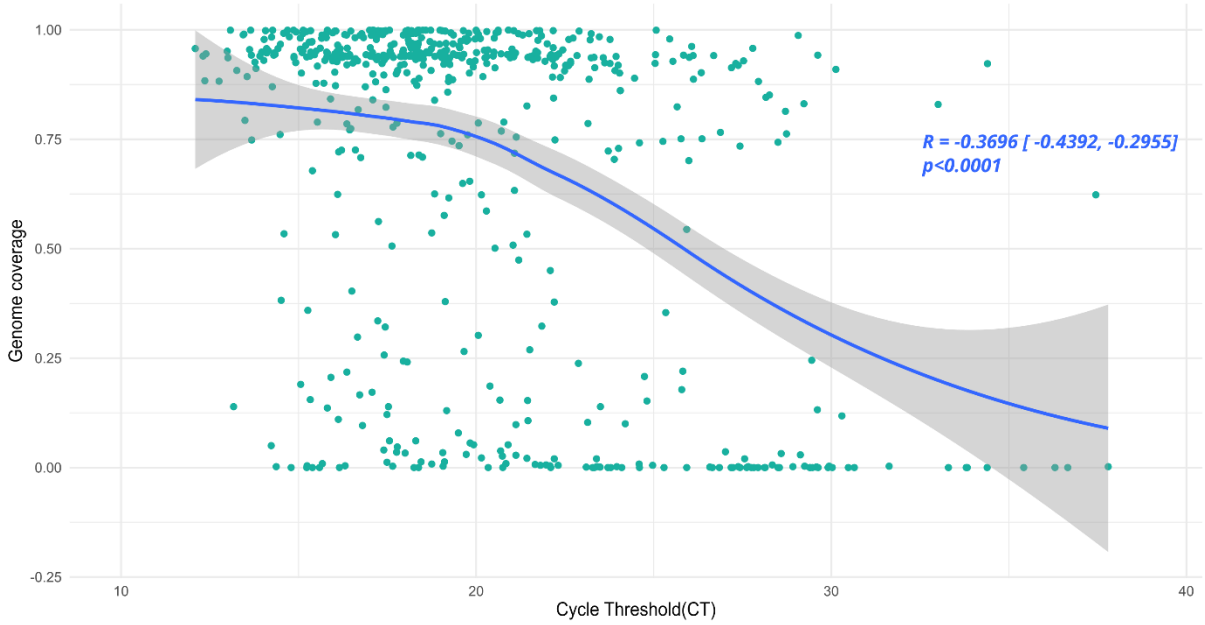


Figure 65 : *Scatterplot of genome called coverage versus PCR Cycle threshold, related to Results and STAR Methods*

The Scatterplot shows a significant correlation between PCR cycle threshold (in the X-Axis) and the genome coverage (in the Y-Axis). Correlation coefficient (R) is shown in blue with 95% confident interval in bracket and p-value estimation.

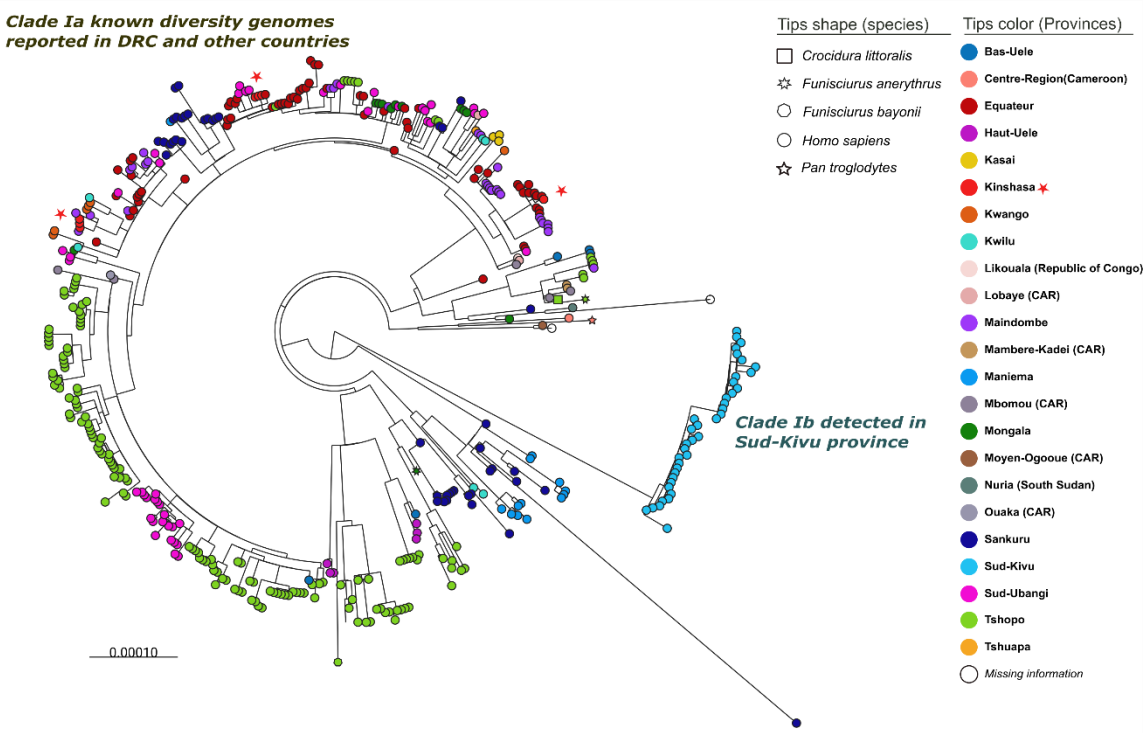


Figure 66 *: Maximum likelihood tree generated with genomes colored by provinces, related to* **Tableau 23** *and STAR Methods*

Maximum likelihood tree generated representing 447 clade I taxa (42 MPXV Clade II used as outgroup and are masked), with genomes colored by provinces. Red Stars are placed near Kinshasa genomes falling in 3 different clusters. MPXV genomes from human samples are represented as dots while other symbols are used for animals (see also Figure 2); square for Crocidura littoralis, heptagram for Funisciurus anerythrus, heptagon for Funisciurus bayonii and pentagram for Pan troglodytes.

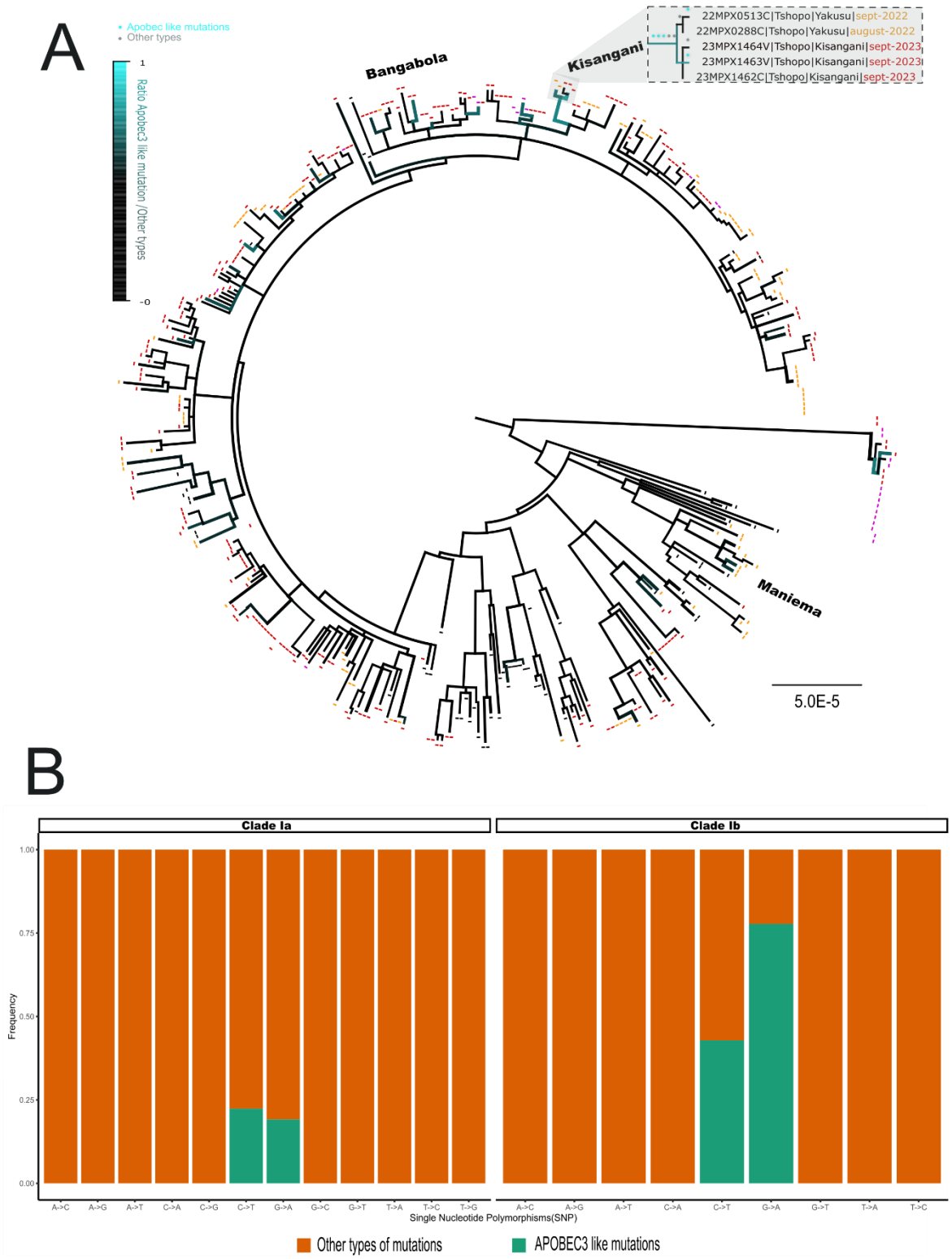


Figure 67 *: APOBEC3 analysis on overall genomes covered above 70%, related to* ***Tableau 24*** *and STAR Methods*

(S3A) APOBEC3 analysis box at tips are colored by the year (black = prior 2022, orange = 2022, red = 2023, purple = 2024) and branches width and color gradient to cyan are consistent with proportion APOBEC3 mutations/others ; Kisangani cluster showing APOBEC3 enrichment within clade Ia has been highlighted as an example- (S3B) Proportion of Single Nucleotide Polymorphism and APOBEC3 mutations per subclade within Clade I

Supplementary Tables

Tableau 25 : Previously published MPXV genomes used in the phylogenetic analysis as contextual genomes with NCBI Genbank accession number (Accession) and related information, related to ***Figure 63*** and STAR Methods

Tableau 26 : List of SNP and AA changes within main clades and clusters, related to ***Tableau 24*** and ***Figure 67***

Supplemental tables

Tableau 25 *: Previously published mpxv genomes used in the phylogenetic analysis as contextual genomes with ncbi genbank accession number (accession) and related information*

accession	isolate	Host	Country	year	Clade	Authors
DQ011154	Congo_2003_358	Homo sapiens	Republic of Congo	2003	Ia	Likos et al
DQ011155	Zaire_1979-005	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	1978	Ia	Likos et al
JX878407	DRC 06-0950	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878408	DRC 06-0970	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878409	DRC 06-0999	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878410	DRC 06-1070	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878411	DRC 06-1075	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878412	DRC 06-1076	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878413	DRC 07-0045	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878414	DRC 07-0046	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878415	DRC 07-0092	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878416	DRC 07-0093	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878417	DRC 07-0104	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2006	Ia	Kugelman et al
JX878418	DRC 07-0120	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878419	DRC 07-0275	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878420	DRC 07-0283	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878421	DRC 07-0286	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878422	DRC 07-0287	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878423	DRC 07-0337	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878424	DRC 07-0338	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878425	DRC 07-0354	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878426	DRC 07-0450	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878427	DRC 07-0480	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878428	DRC 07-0514	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
JX878429	DRC 07-0662	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2007	Ia	Kugelman et al
KC257459		Homo sapiens	Sudan	2005	Ia	Nakazawa,Y., et al.

accession	isolate	Host	Country	year	Clade	Authors
KC257460	KC257460	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	1985	Ia	Nakazawa et al
KJ642612	KJ642612	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	1986	Ia	Nakazawa et al
KJ642613	KJ642613	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	1970	Ia	Nakazawa et al
KJ642618	KJ642618	Homo sapiens	Cameroon	1989	Ia	Nakazawa et al
KJ642619	KJ642619	Homo sapiens	Gabon	1987	Ia	Nakazawa et al
KP849469	Boende_DRC_2008	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2008	Ia	Nakazawa et al
KP849471	Yambuku_DRC_1985	Funisciurus anerythrus	Democratic Republic of the Congo	1985	Ia	Nakazawa et al
MN702444	MN702444	Homo sapiens	Central African Republic	2017	Ia	Selekon et al
MN702445	MN702445	Homo sapiens	Central African Republic	2017	Ia	Selekon et al
MN702446	MN702446	Homo sapiens	Central African Republic	2018	Ia	Selekon et al
MN702447	MN702447	Homo sapiens	Central African Republic	2018	Ia	Selekon et al
MN702448	MN702448	Homo sapiens	Central African Republic	2018	Ia	Selekon et al
MN702449	MN702449	Homo sapiens	Central African Republic	2016	Ia	Selekon et al
MN702450	MN702450	Homo sapiens	Central African Republic	2016	Ia	Selekon et al
MN702451	MN702451	Homo sapiens	Central African Republic	2017	Ia	Selekon et al
MN702452	MN702452	Homo sapiens	Central African Republic	2010	Ia	Selekon et al
MN702453	MN702453	Homo sapiens	Central African Republic	2001	Ia	Selekon et al
MT724770	MT724770	Crocidura littoralis	Democratic Republic of the Congo	2014	Ia	Marien et al
MT724771	MT724771	Funisciurus bayonii	Democratic Republic of the Congo	2014	Ia	Marien et al
MT724772	MT724772	Funisciurus anerythrus	Democratic Republic of the Congo	2014	Ia	Marien et al
NC_003310		Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	1996	Ia	Senkevich,T.G., et al.
OP498046	BNITM-Gabon1988	Homo sapiens	Gabon	1988	Ia	Emmerich et al
OQ621553	MPXV/Sudan/2022/RKI630	Homo sapiens	Sudan	2022	Ia	Brinkmann,A., et al.
OQ729808	MPXV/COD/2023/172V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2022	Ia	Lee et al
OR943698	MPXV_CMR_2016_Chimp	Pan troglodytes	Cameroon	2016	Ia	Brien et al
PP601182	23MPX1740C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601183	23MPX1766C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601184	23MPX1769C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601185	23MPX1786C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601186	23MPX1793V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al

accession	isolate	Host	Country	year	Clade	Authors
PP601187	23MPX1806V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601188	24MPX0008V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601189	24MPX0009C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601190	24MPX0012C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601191	24MPX0014C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601192	24MPX0018V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601193	24MPX0024C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601194	24MPX0025V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601195	24MPX0026V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ia	Vakaniaki et al
PP601196	24MPX0037V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601197	24MPX0038V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601198	24MPX0041V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601199	24MPX0164V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601200	24MPX0166C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601201	24MPX0168V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601202	24MPX0169C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601203	24MPX0174C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601204	24MPX0175V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601205	24MPX0188V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601206	24MPX0194V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ia	Vakaniaki et al
PP601207	24MPX0198V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601208	24MPX0201V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601209	24MPX0203V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601210	24MPX0205V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601211	24MPX0206V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601212	24MPX0207Or	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601213	24MPX0209V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601214	24MPX0214V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601215	24MPX0217V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601216	24MPX0220V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al

accession	isolate	Host	Country	year	Clade	Authors
PP601217	24MPX0221V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601218	24MPX0223C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601219	24MPX0224C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601220	24MPX0226V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601221	24MPX0228V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601222	24MPX0230C	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601223	24MPX0231V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601224	24MPX0239V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601225	24MPX0240V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601226	24MPX0242V	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2024	Ib	Vakaniaki et al
PP601227	RDC-NKV-GOM-MPOX-004	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
PP601228	RDC-NKV-GOM-MPOX-010	Homo sapiens	Democratic Republic of the Congo	2023	Ib	Vakaniaki et al
AY603973		Cynomolgus monkey	Danemark	1961	IIa	Chen N et al
AY741551	Sierra Leone	Homo sapiens	Sierra Leone	1970	IIa	Chen N et al
AY753185		Cynomolgus monkey	Danemark	1958	IIa	Chen N et al
KJ642615		Homo sapiens	Nigeria	1978	IIa	Nakazawa et al
KJ642616		Pan troglodytes	France	1968	IIa	Nakazawa et al
KJ642617		Homo sapiens	Nigeria	1971	IIa	Nakazawa et al
KP849470	Cote d'Ivoire_1971	Homo sapiens	Côte d'Ivoire	1971	IIa	Nakazawa et al
MN346690	MPXV_TNP_2017_North_Bic	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346692	MPXV_TNP_2017_North_Mama	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346693	MPXV_TNP_2017_North_Ponan	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346694	MPXV_TNP_2017_North_Saro	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346695	MPXV_TNP_2017_North_Sidonie	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346696	MPXV_TNP_2017_North_Surprise_1	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346697	MPXV_TNP_2017_North_Surprise_2	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346698	MPXV_TNP_2017_South_Pushkin	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346699	MPXV_TNP_2017_South_Ravel_1	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346700	MPXV_TNP_2017_South_Ravel_2	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al

accession	isolate	Host	Country	year	Clade	Authors
MN346701	MPXV_TNP_2017_South_Woodstock	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2017	IIa	Patrono L.V et al
MN346702	MPXV_TNP_2018_East_Paddy	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2018	IIa	Patrono L.V et al
MN346703	MPXV_TNP_2018_East_Placali	Pan troglodytes	Côte d'Ivoire	2018	IIa	Patrono L.V et al
MT903346	MPXV-USA2003_099_Gambian_Rat	Cricetomys gambianus	USA	2003	IIa	Mauldin M et al
MT903347	MPXV-USA2003_099_Dormouse	Gliridae	USA	2003	IIa	Mauldin M et al
MT903348	MPXV-USA2003_099_Rope_Squirrel	Funisciurus	USA	2003	IIa	Mauldin M et al
MT903339	MPXV-M3021_Delta	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Mauldin M et al
MT903340	MPXV-M5312_HM12_Rivers	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Mauldin M et al
MT903342	MPXV-Singapore	Homo sapiens	Singapore	2018	IIb	Mauldin M et al
MT903343	MPXV-UK_P1	Homo sapiens	UK	2018	IIb	Mauldin M et al
NC_063383	MPXV-M5312_HM12_Rivers	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Mauldin M et al
ON622712	MPX/UZ_REGA_1/Belgium/2022	Homo sapiens	Belgium	2022	IIb	Vanmechelen et al
ON918611	NICD-SVPL223	Homo sapiens	South-Africa	2022	IIb	Chan et al
ON927248	NICD-SVPL232	Homo sapiens	South-Africa	2022	IIb	Chan et al
OP422631	MPXV-SEN0021	Homo sapiens	Benin	2022	IIb	Martin et al
OP422632	MPXV-SEN0022	Homo sapiens	Benin	2022	IIb	Martin et al
OP535312	MPXV_Nigeria_2018_5222	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Nmaemeka et al
OP535317	MPXV_Nigeria_2018_5194	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Nmaemeka et al
OP535320	MPXV_Nigeria_2017_3008	Homo sapiens	Nigeria	2017	IIb	Nmaemeka et al
OP535322	MPXV_Nigeria_2017_2958	Homo sapiens	Nigeria	2017	IIb	Nmaemeka et al
OP535324	MPXV_Nigeria_2018_5302	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Nmaemeka et al
OP535325	MPXV_Nigeria_2018_5316	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Nmaemeka et al
OP535327	MPXV_Nigeria_2018_5307	Homo sapiens	Nigeria	2018	IIb	Nmaemeka et al
OP535337	MPXV_Nigeria_2017_2945	Homo sapiens	Nigeria	2017	IIb	Nmaemeka et al
PP338787	MPXV/Human/USA/CA-LACPHL-MA00577/2024	Homo sapiens	USA	2024	IIb	McCann et al
PP496048	hMpxV/Philippines/RITM-002/2022	Homo sapiens	Philippines	2022	IIb	Balingit et al

Tableau 26 : *List of SNPs and AA changes within main clades and clusters*

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster	Remarks	gene-OPG
241	NA	A->C		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia		NA
172022	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia		NA
178933	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia		NA
187600	NA	G->A	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia		NA
37379	reverse	C->A		No	CGG	R	CTG	L	nonsynonymous	moderately radical	No	Clade Ia		OPG056
127648	forward	A->G		No	ACC	T	GCC	A	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia		OPG149
140473	reverse	T->C		No	AGT	S	GGT	G	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia		OPG160
152010	forward	G->A	GC	No	CGC	R	CAC	H	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia		OPG178
1899	reverse	G->A	GA	Yes	GTC	V	GTT	V	synonymous	NA	No	Clade Ia group I		OPG002
97172	forward	G->A	GG	No	GAG	E	GAA	E	synonymous	NA	No	Clade Ia group I		OPG117
107603	reverse	G->T		No	GTC	V	GTA	V	synonymous	NA	No	Clade Ia group I		OPG125
120895	reverse	C->T	GC	No	ATG	M	ATA	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia group I		OPG138
123589	reverse	C->T	GC	No	GCT	A	ACT	T	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia group I		OPG144
146465	reverse	A->G		No	TTA	L	CTA	L	synonymous	NA	No	Clade Ia group I		OPG170
188518	NA	G->A	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia excepted JX874717		NA
1030	reverse	G->A	GA	Yes	TCA	S	TTA	L	nonsynonymous	moderately radical	No	Clade Ia excepted JX874717		OPG001
16196	reverse	G->T		No	CTA	L	ATA	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia excepted JX874717		OPG027
74384	forward	C->T	TC	Yes	ATC	I	ATT	I	synonymous	NA	No	Clade Ia excepted JX874717		OPG094
186631	forward	G->T		No	GAG	E	GAT	D	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia excepted JX874717		OPG210

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
169500	NA	G->A	GT	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, groups II and III	NA
169501	NA	T->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, groups II and III	NA
132943	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II	NA
1355	reverse	G->T		No	CTA	L	ATA	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II	OPG001
73148	forward	G->A	GA	Yes	GAG	E	AAG	K	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II	OPG093
137411	reverse	G->A	GC	No	CGT	R	TGT	C	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group II	OPG153
159492	forward	T->C		No	TTT	F	CTT	L	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II	OPG185
7732	forward	C->A		No	CCA	P	ACA	T	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia group II, III and novel	OPG019
8973	NA	C->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II branch 1	NA
20627	reverse	G->A	GA	Yes	TCC	S	TTC	F	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group II branch 1	OPG036
58283	reverse	A->G		No	GTT	V	GTC	V	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II branch 1	OPG077
83797	forward	C->T	GC	No	AGC	S	AGT	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II branch 1	OPG105
97065	forward	C->T	GC	No	CAT	H	TAT	Y	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II branch 1	OPG117
143163	forward	C->T	CC	No	GCC	A	GCT	A	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II branch 1	OPG164
149978	forward	G->A	GT	No	ATG	M	ATA	I	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ia, group II branch 1	OPG176
620	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA
7445	NA	G->A	GT	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA
8224	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA
13359	NA	G->A	GT	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA
33659	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
135781	NA	G->A	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA
178921	NA	T->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	NA
60686	reverse	G->A	GA	Yes	CTC	L	CTT	L	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG080
65424	forward	G->A	GC	No	CGC	R	CAC	H	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG084
66885	reverse	C->T	AC	No	TGT	C	TAT	Y	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG085
68972	forward	G->T		No	ACG	T	ACT	T	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG087
81642	forward	C->T	AC	No	ACG	T	ATG	M	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG105
113802	reverse	C->T	TC	Yes	GAG	E	AAG	K	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG133
146163	reverse	G->T		No	TCC	S	TCA	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II branch2 to KJ642613	OPG170
12677	reverse	G->A	GC	No	CTC	L	TTC	F	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II branch 2	OPG023
37094	NA	G->A	GG	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	NA
156635	NA	C->T	AC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	NA
943	reverse	G->A	GT	No	ACG	T	ATG	M	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG001
3344	reverse	G->T		No	GCC	A	GCA	A	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG003
189286	forward	G->A	GC	No	TGC	C	TAC	Y	nonsynonymous	radical	Yes	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG005

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
11620	reverse	G->A	GT	No	ACA	T	ATA	I	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG023
33242	reverse	G->A	GT	No	CTT	L	TTT	F	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG050
39257	reverse	G->T		No	ACC	T	AAC	N	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG057
60179	reverse	T->C		No	TCA	S	TCG	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG080
63257	reverse	G->A	GT	No	GAC	D	GAT	D	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG082
64695	reverse	G->A	GA	Yes	ATC	I	ATT	I	synonymous	NA	Yes	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG083
89780	forward	C->T	GC	No	AGC	S	AGT	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG110
102930	forward	C->G		No	AAC	N	AAG	K	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG122
103393	reverse	T->C		No	TCA	S	TCG	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG123
137852	reverse	G->T		No	GCC	A	GCA	A	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG154
138900	reverse	C->T	AC	No	CGT	R	CAT	H	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG156
180253	forward	G->T		No	TGA	*	TTA	L	nonsynonymous	NA	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG208

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
180733	forward	G->A	GT	No	GTA	V	ATA	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II to branch 2 excepted KJ642613	OPG209
32540	reverse	T->C		No	GAC	D	GGC	G	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 1	OPG049
162920	forward	A->C		No	CTA	L	CTC	L	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 2	OPG188
148732	reverse	T->G		No	TAA	*	TAC	Y	nonsynonymous	NA	Yes	Clade Ia, group II, branch 2 , all except cluster 1	OPG174
3734	reverse	G->A	GA	Yes	ATC	I	ATT	I	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 3	OPG003
21248	reverse	G->A	GC	No	GGC	G	GGT	G	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 3	OPG037
79586	forward	T->C		No	CTA	L	CCA	P	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 3	OPG102
80959	reverse	T->C		No	TCA	S	TCG	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 3	OPG104
185841	forward	A->G		No	AAC	N	AGC	S	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 3	OPG210
171	NA	A->C		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 3 to 6	NA
26366	reverse	C->T	TC	Yes	CGA	R	CAA	Q	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG042
54747	forward	G->T		No	ATG	M	ATT	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG072
64695	reverse	A->G		No	ATT	I	ATC	I	synonymous	NA	Yes	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG083
91902	forward	G->A	GT	No	CGT	R	CAT	H	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG113
126093	forward	C->T	GC	No	CAT	H	TAT	Y	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG148
129253	forward	G->T		No	GCA	A	TCA	S	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG151
149559	forward	T->G		No	GTT	V	GGT	G	nonsynonymous	moderately radical	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG175

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
151601	forward	G->A	GT	No	GTG	V	ATG	M	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 4	OPG178
145464	NA	T->C		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 5	NA
35932	reverse	C->T	GC	No	GCA	A	ACA	T	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 5	OPG054
42693	reverse	G->C		No	ACA	T	AGA	R	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 5	OPG063
178923	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 6	NA
159653	forward	A->T		No	TTA	L	TTT	F	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ia, group II, branch 2 cluster 6	OPG185
826	NA	C->T	TC	Yes	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group III	NA
157592	NA	C->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group III	NA
168929	NA	G->T		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group III	NA
178923	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group III	NA
118195	reverse	C->T	AC	No	TAG	*	TAA	*	synonymous	NA	No	Clade Ia, group III	OPG136
150201	forward	A->T		No	AAA	K	TAA	*	nonsense	NA	Yes	Clade Ia, group III	OPG176
149978	forward	G->A	GT	No	ATG	M	ATA	I	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ia, group III	OPG176
154113	forward	G->A	GT	No	GTT	V	ATT	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group III	OPG180
176367	forward	C->T	AC	No	ACA	T	ATA	I	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group III	OPG205
177394	forward	C->T	TC	Yes	GTC	V	GTT	V	synonymous	NA	No	Clade Ia, group III	OPG205
186579	forward	G->T		No	AGA	R	ATA	I	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group III	OPG210
168929	NA	G->T		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, novel cluster closed to group III	NA
23448	reverse	A->G		No	TAC	Y	CAC	H	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG039
48566	forward	G->A	GC	No	GCA	A	ACA	T	nonsynonymous	moderately conservative	Yes	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG068
59282	reverse	G->A	GT	No	CAC	H	CAT	H	synonymous	NA	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG079
65664	forward	C->T	AC	No	ACG	T	ATG	M	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG084

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
86071	forward	G->A	GC	No	ACG	T	ACA	T	synonymous	NA	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG107
113943	reverse	C->T	GC	No	GCC	A	ACC	T	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG133
140728	reverse	G->A	GA	Yes	CAT	H	TAT	Y	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG160
147889	forward	A->C		No	AAT	N	ACT	T	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG172
177066	forward	C->T	GC	No	GCT	A	GTT	V	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG205
185470	forward	G->A	GA	Yes	GTG	V	GTA	V	synonymous	NA	No	Clade Ia, novel cluster closed to group III	OPG210
19049	NA	T->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group IV	NA
89540	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group IV	NA
148301	NA	G->A	GG	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group IV	NA
42209	forward	G->A	GC	No	ATG	M	ATA	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group IV	OPG062
56842	reverse	C->A		No	GTT	V	TTT	F	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group IV	OPG074
58670	reverse	G->T		No	ACC	T	ACA	T	synonymous	NA	No	Clade Ia, group IV	OPG078
59951	reverse	C->T	GC	No	GTG	V	GTA	V	synonymous	NA	No	Clade Ia, group IV	OPG080
84253	forward	C->A		No	CCC	P	CCA	P	synonymous	NA	No	Clade Ia, group IV	OPG105
111818	reverse	C->A		No	CCG	P	CCT	P	synonymous	NA	No	Clade Ia, group IV	OPG130
124688	forward	G->A	GC	No	CGC	R	CAC	H	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ia, group IV	OPG145
136139	reverse	A->G		No	TAG	*	CAG	Q	nonsynonymous	NA	No	Clade Ia, group IV	OPG153
147805	forward	G->A	GC	No	TGC	C	TAC	Y	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group IV	OPG172
164819	forward	A->G		No	ATA	I	ATG	M	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group IV	OPG189
186992	forward	G->A	GA	Yes	GAA	E	AAA	K	nonsynonymous	moderately conservative	Yes	Clade Ia, group IV	OPG210
25699	NA	G->T		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
33749	NA	G->A	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
49955	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
158859	NA	C->T	AC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
169483	NA	C->T	AC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
178923	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
178986	NA	C->T	TC	Yes	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
180434	NA	T->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	NA
189289	forward	G->A	GC	No	TGC	C	TAC	Y	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG005
16202	reverse	G->A	GT	No	CAC	H	TAC	Y	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG027
19836	reverse	A->C		No	TAA	*	GAA	E	nonsynonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG034
19432	reverse	G->A	GC	No	GGC	G	GGT	G	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG034
31836	reverse	T->C		No	ATA	I	GTA	V	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG048
41758	reverse	C->T	GC	No	CCG	P	CCA	P	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG061
49318	forward	G->T		No	ATG	M	ATT	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG068
51487	reverse	A->G		No	TTC	F	TCC	S	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG071
62009	reverse	G->A	GC	No	TGC	C	TGT	C	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG080
62183	reverse	A->G		No	AGT	S	AGC	S	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG081
72640	reverse	T->C		No	ATC	I	GTC	V	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG092
73232	forward	T->G		No	TCT	S	GCT	A	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG093
75313	forward	C->T	GC	No	GCG	A	GTG	V	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG095

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster Remarks	gene-OPG
89371	reverse	G->T		No	CGT	R	AGT	S	nonsynonymous	moderately radical	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG109
93791	forward	C->T	GC	No	CGT	R	TGT	C	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG113
94019	forward	G->A	GC	No	GCC	A	ACC	T	nonsynonymous	moderately conservative	Yes	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG113
112442	reverse	C->A		No	ACG	T	ACT	T	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG132
119429	reverse	G->A	GT	No	ACT	T	ATT	I	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG136
124688	forward	G->A	GC	No	CGC	R	CAC	H	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG145
144147	forward	A->G		No	GTA	V	GTG	V	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG165
148082	forward	C->T	CC	No	CCG	P	CTG	L	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG173
150182	forward	C->A		No	ACC	T	ACA	T	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG176
153019	forward	T->C		No	GTA	V	GCA	A	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG180
168022	forward	C->T	GC	No	TGC	C	TGT	C	synonymous	NA	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG193
175035	forward	C->T	AC	No	CGT	R	TGT	C	nonsynonymous	radical	No	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG204
180920	forward	G->A	GC	No	AGC	S	AAC	N	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ia, group V (branch to JX878417)	OPG209
7024	NA	C->T	AC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib	NA
8042	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib	NA
8743	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib	NA
16560	NA	C->T	CC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib	NA
18958	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib	NA

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster	Remarks	gene-OPG
19038	NA	A->C		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
19128	NA	T->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
20453	NA	T->C		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
20455	NA	C->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
20456	NA	A->T		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
25635	NA	C->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
47658	NA	G->A	GT	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ib		NA
81085	NA	C->T	TC	Yes	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
133915	NA	G->A	GT	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
133936	NA	A->G		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ib		NA
135422	NA	G->A	GT	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
156500	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ib		NA
156635	NA	C->T	AC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ib		NA
158612	NA	C->T	AC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
160116	NA	G->T		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
165027	NA	C->T	GC	No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	Yes	Clade Ib		NA
170928	NA	C->A		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA
178130	NA	G->T		No	NA	NA	NA	NA	intergenic	NA	No	Clade Ib		NA

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster	Remarks	gene-OPG
3181	reverse	G->A	GT	No	CCA	P	TCA	S	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG003
3003	reverse	G->A	GG	No	CCA	P	CTA	L	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG003
5366	reverse	C->T	GC	No	GCA	A	ACA	T	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG015
5968	reverse	A->G		No	ATA	I	ACA	T	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG015
7889	forward	G->T		No	AGG	R	ATG	M	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG019
12625	reverse	G->A	GC	No	GCT	A	GTT	V	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG023
14498	reverse	G->T		No	CCA	P	ACA	T	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG025
20269	reverse	G->A	GA	Yes	ATC	I	ATT	I	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG035
21460	reverse	G->T		No	CTA	L	ATA	I	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG037
23021	reverse	C->T	AC	No	TGG	W	TGA	*	nonsense	NA	No	Clade Ib		OPG038
27032	reverse	C->T	GC	No	TGC	C	TAC	Y	nonsynonymous	radical	No	Clade Ib		OPG042
28658	reverse	G->A	GT	No	CTC	L	TTC	F	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG045
29788	reverse	T->C		No	AAT	N	AGT	S	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG047
33551	reverse	C->T	TC	Yes	CGA	R	CAA	Q	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG051
43441	reverse	T->C		No	ATT	I	GTT	V	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG063
43996	reverse	A->G		No	TGT	C	TGC	C	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG064
44254	reverse	C->T	AC	No	ACG	T	ACA	T	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG064
48612	forward	A->T		No	AAT	N	ATT	I	nonsynonymous	moderately radical	No	Clade Ib		OPG068

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster	Remarks	gene-OPG
48786	forward	G->T		No	AGA	R	ATA	I	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG068
49030	forward	C->A		No	TCC	S	TCA	S	synonymous	NA	Yes	Clade Ib		OPG068
52895	reverse	T->C		No	ACA	T	GCA	A	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG071
54708	forward	A->G		No	CCA	P	CCG	P	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG072
64899	forward	T->A		No	CTA	L	CAA	Q	nonsynonymous	moderately radical	No	Clade Ib		OPG084
69405	forward	C->T	TC	Yes	CAA	Q	TAA	*	nonsense	NA	No	Clade Ib		OPG087
78083	forward	T->C		No	CTA	L	CCA	P	nonsynonymous	moderately conservative	Yes	Clade Ib		OPG100
78255	forward	G->A	GG	No	TCG	S	TCA	S	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG100
79916	forward	G->A	GA	Yes	CGA	R	CAA	Q	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG102
80681	reverse	G->A	GT	No	ACG	T	ATG	M	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG104
88616	reverse	G->A	GT	No	CAC	H	CAT	H	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG109
91583	forward	G->A	GT	No	CGT	R	CAT	H	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG112
108459	reverse	G->A	GT	No	TAC	Y	TAT	Y	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG127
110338	reverse	C->A		No	AAG	K	AAT	N	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG129
111091	reverse	A->G		No	TAG	*	CAG	Q	nonsynonymous	NA	No	Clade Ib		OPG130
111249	reverse	C->T	CC	No	CGG	R	CAG	Q	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG130
119651	forward	C->T	GC	No	AGC	S	AGT	S	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG137
120932	reverse	G->A	GT	No	ACA	T	ATA	I	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG138

site	direction	snp	dimer	apobec	parent codon	parent aa	child codon	child aa	mutation_category	prediction	homoplasy	Cluster	Remarks	gene-OPG
120962	reverse	C->T	CC	No	TGG	W	TAG	*	nonsense	NA	No	Clade Ib		OPG138
123914	reverse	G->T		No	TCC	S	TCA	S	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG144
123987	forward	G->A	GC	No	TAG	*	TAA	*	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG145
126456	forward	C->A		No	CAA	Q	AAA	K	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG148
132286	forward	A->G		No	AAC	N	GAC	D	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG151
132024	forward	G->A	GA	Yes	ACG	T	ACA	T	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG151
136425	reverse	G->A	GT	No	GAC	D	GAT	D	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG153
145002	reverse	A->T		No	TAT	Y	TAA	*	nonsense	NA	No	Clade Ib		OPG167
148361	reverse	C->T	AC	No	TGT	C	TAT	Y	nonsynonymous	radical	No	Clade Ib		OPG174
149955	forward	A->G		No	ACT	T	GCT	A	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG176
150310	forward	G->A	GC	No	CGC	R	CAC	H	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG176
150200	forward	T->A		No	TTT	F	TTA	L	nonsynonymous	conservative	Yes	Clade Ib		OPG176
154518	forward	T->C		No	TGT	C	TGC	C	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG181
159332	forward	C->T	AC	No	AAC	N	AAT	N	synonymous	NA	No	Clade Ib		OPG185
162942	forward	A->C		No	ATA	I	CTA	L	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG188
182469	forward	C->T	GC	No	GCG	A	GTG	V	nonsynonymous	moderately conservative	No	Clade Ib		OPG210
184213	forward	G->T		No	GAG	E	GAT	D	nonsynonymous	conservative	No	Clade Ib		OPG210

Partie II : Récentes émergences zoonotiques de la MVE en Equateur (RDC)

Dans cette seconde partie, les travaux de thèse avaient pour objectif de caractériser la 11ème épidémie de la MVE à l'Equateur et évaluer l'apport de la génomique dans la compréhension de la transmission. En effet, au décours de l'épidémie, plusieurs chaines de transmission dans plusieurs zones de santé ont été enregistrés et les enquêtes épidémiologiques ne suffisaient pas pour les élucider.

Il est à noter que la perception de la maladie dans ces régions souvent négligées et pauvres, reste une problématique, influant sur l'implication de la communauté dans les activités de riposte. Par ailleurs, la non-détection précoce des fièvres hémorragiques virales souvent prises pour le paludisme peut déboucher non seulement sur un manque de confiance de la population face aux structures sanitaires suite à l'inefficacité pourtant logique des antipaludéens dans les épisodes fébriles, mais aussi en la fuite des patients voyant d'autres praticiens et débouchant sur la propagation de l'épidémie dans la communauté.

Aussi, l'adjonction de l'outil génomique aux rapports d'investigations épidémiologiques a aidé à résoudre ce problème et avoir une vue globale de l'épidémie. En outre, il a été démontré pour les épidémies qui ont suivi et qui ne seront pas discuté dans le présent travail, que les 12ème , 13ème et 15ème à l'Est du pays étaient liés à la 10ème épidémie alors que la 14ème en Equateur, constituait une 3ème émergence dans la région depuis une source probablement zoonotique. Cette dernière a laissé soulever plusieurs questions sur la dynamique d'éclosion et extinction des épidémies dont les réponses ne sauraient s'envisager qu'autour de l'approche « Une Seule Santé » incluant plusieurs autres disciplines autour de la communauté.

Chapitre 1 : 2020 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterisations

1.1.Résumé

Contexte :

La République démocratique du Congo (RDC) a connu 15 flambées épidémiques de maladie à virus Ebola (MVE) entre 1976 et 2023. Le 1er juin 2020, la RDC a déclaré une épidémie de MVE dans la province de l'Équateur occidental (11e épidémie), géographiquement proche de la précédente épidémie de Tumba/Bikoro de 2018. La 11e flambée s'est produite en même temps qu'une épidémie de MVE dans la province orientale du Nord-Kivu.

Methodes :

Les facteurs épidémiologiques de la 11e flambée épidémique de MVE ont été analysés afin d'identifier les caractéristiques des patients atteints de la MVE, les liens épidémiologiques et les modes de transmission afin d'explorer la propagation du virus dans l'espace, le temps et les groupes d'âge. La parenté génétique de 87 génomes disponibles du virus Ebola (provenant de 130 cas) a été analysée pour calculer les taux de substitution virale et étudier l'évolution virale. Les données épidémiologiques et génétiques ont été liées, ce qui a permis d'obtenir une vue d'ensemble de l'épidémie de l'Équateur.

Résultats et conclusion :

Entre mai et septembre 2020, 130 cas de MVE (119 confirmés et 11 probables) ont été signalés dans 13 zones de santé de la province de l'Équateur. Le cas index a signalé une consommation fréquente de viande de chauve-souris, ce qui suggère que l'épidémie a commencé à la suite d'une propagation zoonotique. Le séquençage a révélé deux variants du virus Ebola en circulation associés à cette épidémie – un variant de Mbandaka associé à la

majorité des cas humains et un variant de type Tumba, présentant une similitude avec les séquences EBOV de 2018 de la 9e épidémie de MVE. La variante de type Tumba a présenté un taux de substitution réduit, ce qui suggère une transmission à partir d'un ancien survivant de la MVE.

L'intégration du séquençage génétique et des données épidémiologiques est essentielle pour générer une vue d'ensemble des épidémies de maladies infectieuses. Ici, la combinaison de ces sources de données a permis de vérifier les faits et a été utilisée pour vérifier les sources signalées par les patients d'un éventuel débordement zoonotique. La méthodologie utilisée dans cette enquête a démontré que deux éclosions indépendantes de MVE se sont produites simultanément dans la même région et a révélé d'autres cas non déclarés de transmission nosocomiale.

1.2. Article, Lancet Microbe, 2024

Field and Molecular Epidemiology of the 2020 Ebola virus disease outbreak in Equateur Province, Democratic Republic of the Congo

Eddy Kinganda-Lusamaki, MD[1,2,11], Shannon Whitmer, Ph.D.[3], Emmanuel Lokilo-Lofiko, B.Sc.[1], Adrienne Amuri-Aziza, M.Sc.[1], Francisca Muyembe-Mawete. M.Sc.[1,2], Jean Claude Makangara-Cigolo, MD[1,2], Gerry Makaya MD[4], Francis Mbuyi, MD[4], Amy Whitesell, MPH[2], Ruth Kallay, MPH[5], Mary Choi, MD[3], Catherine Pratt, Ph.D.[6**], Daniel Mukadi-Bamuleka, MD[1,2], Hugo Kavunga-Membo, Ph.D.[1], Meris Matondo – Kuamfumu, MD[1,2], Fabrice Mambu-Mbika, MD[1,2], Richard Ekila-Ifinji, MD[1,2], Trevor Shoemaker, Ph.D.[3], Miles Stewart, M.Sc.[12], Julia Eng, M.Sc.[12], Abraham Rajan, M.Sc.[12] , John Otokoye Otshudiema, MD[8], Gervais Léon Tengomo Folefack, M.Sc.[8], Elisabeth Pukuta-Simbu, M.Sc.[1], Emir Talundzic, B.Sc.[3], Elizabeth Shedroff, M.Sc.[3], Jacques Likofata Bokete, MPH [8***], Anais Legand, MPH.[13], Pierre Formenty, D.V.M.[13], Christopher N. Mores, Ph.D.[9], Abigail J. Porzucek, MPH.[9*], Sarah R. Tritsch, M.Sc.[9], John Kombe, MD[10], Gaston Tshapenda, MD[10], Felix Mulangu, MPH.[10], Ahidjo Ayouba, Ph.D.[11], Eric Delaporte, MD[11], Martine Peeters, Ph.D.[11], Michael R. Wiley, Ph.D.[6,7], Joel M. Montgomery, Ph.D.[3], John D. Klena, Ph.D.[3], Jean-Jacques Muyembe-Tamfum, MD, Ph.D.[1,2], Steve Ahuka-Mundeke, MD[1,2], Placide Mbala-Kingebeni, MD, Ph.D.[1,2]

1- Institut National de Recherche Biomédicale, Kinshasa, DRC
2- Service de Microbiologie, Cliniques Universitaires, Faculté de Médecine, Université de Kinshasa, Kinshasa, DRC
3- Viral Special Pathogens Branch, US Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.

4- Vysnova Partners, Inc. Landover, MD, USA
5- Emergency Response and Recovery Branch, US Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, USA.
6- Department of Environmental, Agricultural and Occupational Health, College of Public Health, University of Nebraska Medical Center, Omaha, NE, USA.
7- PraesensBio, LLC, Omaha, NE, USA
8- World Health Organization, WHO Health Emergencies Programme, DRC
9- Global Health Department, Milken Institute School of Public Health, The George Washington University, Washington, DC, USA.
10- Ministry of Health, Kinshasa, DRC.
11- TransVIHMI, University of Montpellier, Institut de Recherche pour le Développement, INSERM, Montpellier, France.
12- Johns Hopkins University Applied Physics Laboratory, Laurel, Maryland
13- World Health Organisation, Geneva, Switzerland

*Currently at: Yale School of Public Health, Yale University, New Haven, CT, USA

**Currently at: Biosurv International

***Currently at: Laboratoire Provincial de l' Equateur

Corresponding author: Placide Mbala-Kingebeni, mbalaplacide@gmail.com

Lead Contact: Shannon Whitmer, evk3@cdc.gov

Lancet Microbe. 2024 Feb;5(2):e109-e118.

doi: ***10.1016/S2666-5247(23)00259-8. Epub 2024 Jan 24***

Keywords: Ebola virus, outbreak, Democratic Republic of Congo, viral sequences, substitution rate, viral spread, epidemiological data, zoonotic spillover, molecular epidemiology

Summary:

Background

The Democratic Republic of the Congo (DRC) has experienced 15 Ebola virus disease (EVD) outbreaks from 1976-2023. On June 1, 2020 the DRC declared an outbreak of EVD in the western Equateur province (11th outbreak), geographically close to the previous 2018 Tumba/Bikoro outbreak. The 11th outbreak occurred concurrently with an ongoing EVD outbreak in the eastern Nord Kivu province.

Methods

Epidemiological factors from the 11th EVD outbreak were analyzed to identify EVD patient characteristics, epidemiological links, and transmission modes to explore virus spread through space, time and age groups. Genetic relatedness of 87 available Ebola virus genomes (from 130 cases) was analyzed to calculate viral substitution rates and study viral evolution. Epidemiological and genetic data were linked providing a broad view of the Equateur outbreak.

Findings

Between May and September 2020, 130 EVD (119 confirmed and 11 probable) cases were reported across 13 Equateur province health zones. The index case reported frequent consumption of bat meat, suggesting the outbreak started as a result of zoonotic spillover. Sequencing revealed two circulating *Zaire ebolavirus* variants associated with this outbreak – a Mbandaka variant associated with the majority of human cases and a Tumba-like variant, with similarity to the 2018 EBOV sequences from the 9th EVD outbreak was also observed. The Tumba-like variant exhibited a reduced substitution rate, suggesting transmission from a previous EVD survivor.

Interpretation

Integrating genetic sequencing and epidemiological data is critical to generate a broad view of infectious disease outbreaks. Here, combining these data sources allowed investigative

fact-checking and was used to verify patient-reported sources of possible zoonotic spillover. Methodology used in this investigation demonstrated that two independent EVD outbreaks occurred simultaneously in the same area and uncovered additional un-reported cases of nosocomial transmission.

Research in context

Evidence before this study

From 1976 through 2023, the DRC has experienced 15 EVD outbreaks. These EVD outbreaks have been distributed across northern DRC and have been mainly caused by *Zaire ebolavirus* (EBOV), although *Bundibugyo ebolavirus* caused a single outbreak. We conducted a literature review in PubMed for all studies examining previous Filovirus outbreaks published between 1999 and 2023. We used the search terms "Ebolavirus outbreak" and "Ebolavirus outbreak DRC." Multiple studies have examined either the epidemiological, clinical, or genetic components of previous outbreaks, but few studies combine both the epidemiological and genetic data into a broad picture of an EVD outbreak.

Added value of this study

Here, the epidemiologic and genetic details associated with the 2020 EBOV outbreak in Equateur province (11th outbreak) are reviewed. The 11th outbreak occurred concurrently with an ongoing EVD outbreak in the eastern Nord Kivu province. Between May and September 2020, 130 EVD cases (119 confirmed and 11 probable) were reported across 13 Equateur province health zones. The index case reported frequent consumption of bat meat, suggesting the outbreak started as a result of zoonotic spillover and was not related to the ongoing EVD outbreak in the eastern Nord Kivu province. Sequencing revealed two circulating *Zaire ebolavirus* variants associated with this outbreak – a Mbandaka variant associated with the majority of human cases and a Tumba-like variant, with similarity to the 2018 EBOV sequences from the 9th EVD outbreak. The Tumba-like variant exhibited a reduced substitution rate, suggesting transmission from a previous EVD survivor. Integrating genetic sequencing and epidemiological data allowed investigative fact-checking and uncovered additional un-reported cases of nosocomial transmission.

Implications of all the available evidence

The data presented here demonstrates co-circulation of two EBOV variants consistent with two separate concurrent outbreaks. Outbreak #1 started due to transmission from a persistently-infected EVD survivor of the Tumba 2018 outbreak, whereas outbreak #2 was initiated as a result of zoonotic transmission. These data illustrate the importance of next generation sequencing as an epidemiologic tool to identify and connect chains of transmission.

1. Introduction

On June 1, 2020 the Democratic Republic of the Congo (DRC) declared an outbreak of Ebola virus disease (EVD) in Mbandaka, the capital of Equateur province(1). This represented the 11th known EVD outbreak in the DRC and occurred close to the location of the 2018 Tumba/Bikoro outbreak (***Figure 68***A) (2). From 1976 through 2023, the DRC has experienced 15 EVD outbreaks; four additional EVD outbreaks have occurred in the DRC since the 11th Equateur outbreak (***Figure 68***A)(3). Historically, EVD outbreaks have been distributed across northern DRC and have been mainly caused by the *Zaire ebolavirus* (EBOV) species (***Figure 68***A), although the *Bundibugyo ebolavirus* species caused an outbreak in Isiro, Haut-Uélé province in 2012(4) (formerly, province Orientale).

Ebolavirus species have not been definitively identified in bat hosts, but work from Towner et al. demonstrates that Marburg virus, another filovirus, has been directly identified, isolated and sequenced from captured bats (5), supporting the hypothesis that new filovirus infections can arise due to spillovers from an animal reservoir. *Zaire ebolavirus* seropositive bats were also identified in the Nord Kivu and Equateur region of the DRC, during the EVD outbreak in 2018 but also in the neighboring Republic of the Congo (ROC) (6, 7). Previous EVD outbreaks in Gabon and ROC identified that multiple virus infections occurred after handling EBOV-positive gorillas and/or chimpanzees, and evidence of abrupt ape population declines have occurred concurrently with human infections(8). Furthermore, filovirus

persistence has initiated new cases through sexual transmission or contact with the bodily fluid of an EVD/MVD survivor (9, 10). Infectious EBOV has been isolated directly from semen(11) and vitreous humor(12), while viral RNA has been detected in CSF(13), vaginal secretions(14), breast milk and other bodily fluids(15) from EVD survivors. Prior to the development of rapid genetic sequencing, identifying whether a new EBOV outbreak is the result of a zoonotic spillover or due to EVD survivor-related transmission, has been challenging. However, recent data demonstrates that a reduced substitution rate is indicative of transmission from an EVD survivor(11, 13, 16, 17).

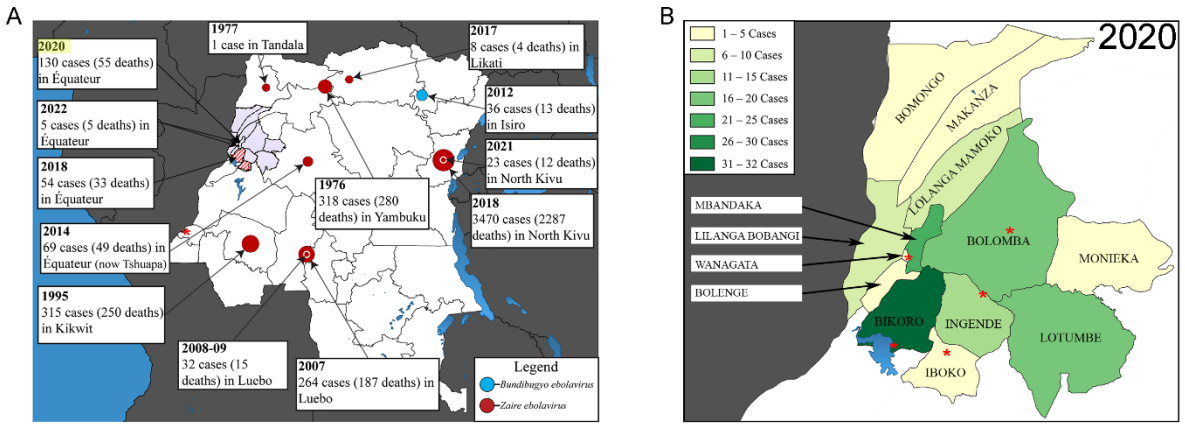


Figure 68 *: Ebola virus outbreaks in the Democratic Republic of the Congo, 1976–2022*

(A)The distribution of Ebolavirus disease outbreaks in the Democratic Republic of the Congo. Coloured circles identify locations of previous outbreaks and the size of circles represents the number of positive human cases. The map shows the affected 2020 health zones (orange and purple shading) and sites of the 2018 Équateur outbreak (orange shading). The red star indicates the location of the Kinshasa diagnostic laboratory during the Équateur Province 2020 outbreak. (B) The locations and prevalence of Ebola virus disease cases during the 2020 Ebola virus disease outbreak in the Équateur Province. The red stars indicate the location of the diagnostic and field laboratories during the Équateur Province 2020 outbreak (Mbandaka, Ingende, Itipo, Bikoro, and Bolomba).

Here, the epidemiologic and genetic details associated with the 2020 EBOV outbreak are reviewed in Equateur province. This outbreak occurred in northwestern DRC concurrently with an EVD outbreak taking place in northeastern DRC in Nord Kivu, Ituri and Sud Kivu provinces (10th outbreak), leading to initial suspicion that an EBOV-infected traveler transmitted EVD across the DRC(18). However, genetic sequencing refuted this hypothesis and demonstrated that the Equateur EVD outbreak was independent of the Nord Kivu EVD

outbreak, and that two different *Zaire Ebolavirus* variants were circulating in Equateur. Constructing a "wide view" of the Equateur 2020 EBOV outbreak by linking the available epidemiological and genetic data allowed investigative fact-checking, verified patient-reported sources of possible zoonotic spillover, uncovered additional un-reported cases of nosocomial transmission, and altogether provided a deeper investigation into the 11th outbreak.

2. Methods:

Case investigation and contact tracing

The DRC Ministry of Health's Ebola virus disease case definition was used to classify cases as suspected, probable, or confirmed (Supplemental File 1). The case definition used for a suspect case was different than that used in previous outbreaks in one significant way: fever was not a required sign, because fever is not uniformly present in all confirmed cases of EVD at the time of detection. All suspect, probable and confirmed cases were investigated to record demographic characteristics, determine possible exposures, document information about illness onset and signs and symptoms, and to identify potentially exposed contacts. Data were collected by trained field investigators and health professionals using a standardized case investigation form (Supplemental File 2), which was subsequently entered into an electronic database. Additional details are available in the Supplemental Experimental Procedures.

Human Subjects

Blood specimens from live suspect cases and oral swabs from deceased suspect cases were collected as part of the DRC Ministry of Health public health emergency response; therefore, consent for sample collection was waived. Ethical approval for this manuscript was provided by the Comité d'Ethique at the Ecole de Sante Pulique at the Université de Kinshasa.

Sample Processing, Shipment and Sequencing

Confirmation of cases required detection of EBOV RNA in blood or body fluids by reverse transcription PCR (RT-PCR). In Kinshasa, Mbandaka and four other field laboratories

(Ingende, Itipo, Bikoro and Bolomba), specimens were inactivated and tested by RT-PCR (Xpert® Ebola Assay, Cepheid) to detect EBOV RNA. For sequence analysis, samples were handled in a glovebox and RNA was extracted from the diagnostic specimen using Viral RNA Mini kits (Qiagen, Hilden, Germany). Viral sequencing was performed using multiple methods – amplicon-based MinIon sequencing, or hybridization enrichment using EBOV-specific oligos on Illumina MiSeq/iSeq100 platform. Amplicon-based MinIon sequencing was performed using EBOV-specific primers designed against the Equateur 2020 viral sequence (***Tableau 28***) and the artic protocol (*https://www.protocols.io/view/ebola-virus-sequencing-protocol-e6nvw9p7dgmk/v1*) (19)

Bioinformatics

Consensus genomes were constructed using the bioinformatics method appropriate to the library construction method – either the Artic EBOV bioinformatics protocol (for amplicon-based MinIon sequencing), or a read mapping to a reference genome using in-house scripts (*https://github.com/evk3/EBOV_Equateur_2020*) (for TruSeq-based Illumina sequencing). Additional details are available in the Supplemental Experimental Procedures.

Phylogenetic and Bayesian Analysis

Viral genomes were aligned using mafft (version 7.450) and maximum likelihood trees were constructed using raxml (version 7.3.0-PTHREAD) with 1000 bootstrap iterations. Evolutionary rates were estimated using both linear regression modeling and time-scaled phylogenies. Linear regression modeling was performed using TempEst with maximum likelihood trees rooted on the earliest available Mbandaka 2020 or Tumba 2018 sequences and genetic distance versus collection date was visualized in R (4.1.3). Evolutionary rates estimates, R^2 and p-values were calculated in R using lm(distance~date) with 95% prediction intervals estimated from the same dataset. Bayesian analysis was performed using Beast (1.10.4) with separate Mbandaka 2020 (including closely related sequences from 2014 and

2018 DRC outbreaks) or Tumba 2018 sequence sets. Statistically strong differences in Bayes Factor values for different models were not observed (***Tableau 29***), and the UCLN Skygrid model results were used to maintain uniformity with previous EBOV rate estimates. Additional details are available in the Supplemental Experimental Procedures.

Quantification and Statistical Analysis

Geographic analysis was performed using QGIS (3.16.13) and choropleth maps were made using R (4.1.2). Analysis of epidemiological metadata was done using Python (3.9.13) in a Jupyter notebook (6.4.12). The DRC population demographic data was accessed from the WHO Demographic Yearbook – 2020 (71st Issue). MCC time-scaled phylogenies were visualized using ggtree (version 3.2.0), root-to-tip versus specimen collection dates were visualized using R (4.1.3) in a Jupyter notebook (6.4.12). Epidemiological and genetic data were visualized in ChainChecker version 2.0 (*https://github.com/jhuapl-globalhealth/chainchecker/*).

Role of the funding source

The funder of the study had no role in study design, data collection, data analysis, data interpretation, or writing of the report.

3. Results:

Epidemiological Factors Associated with Equateur 2020 EVD Cases

Between May and September 2020, 130 EVD cases (119 laboratory-confirmed and 11 probable), were reported in 13 health zones of the Equateur province in the DRC (***Figure 68*B**) with an overall case fatality rate of 42% (55/130). The first EVD case was on May 9, 2020, and EVD cases peaked at the end of June and end of July (***Figure 69*A**).

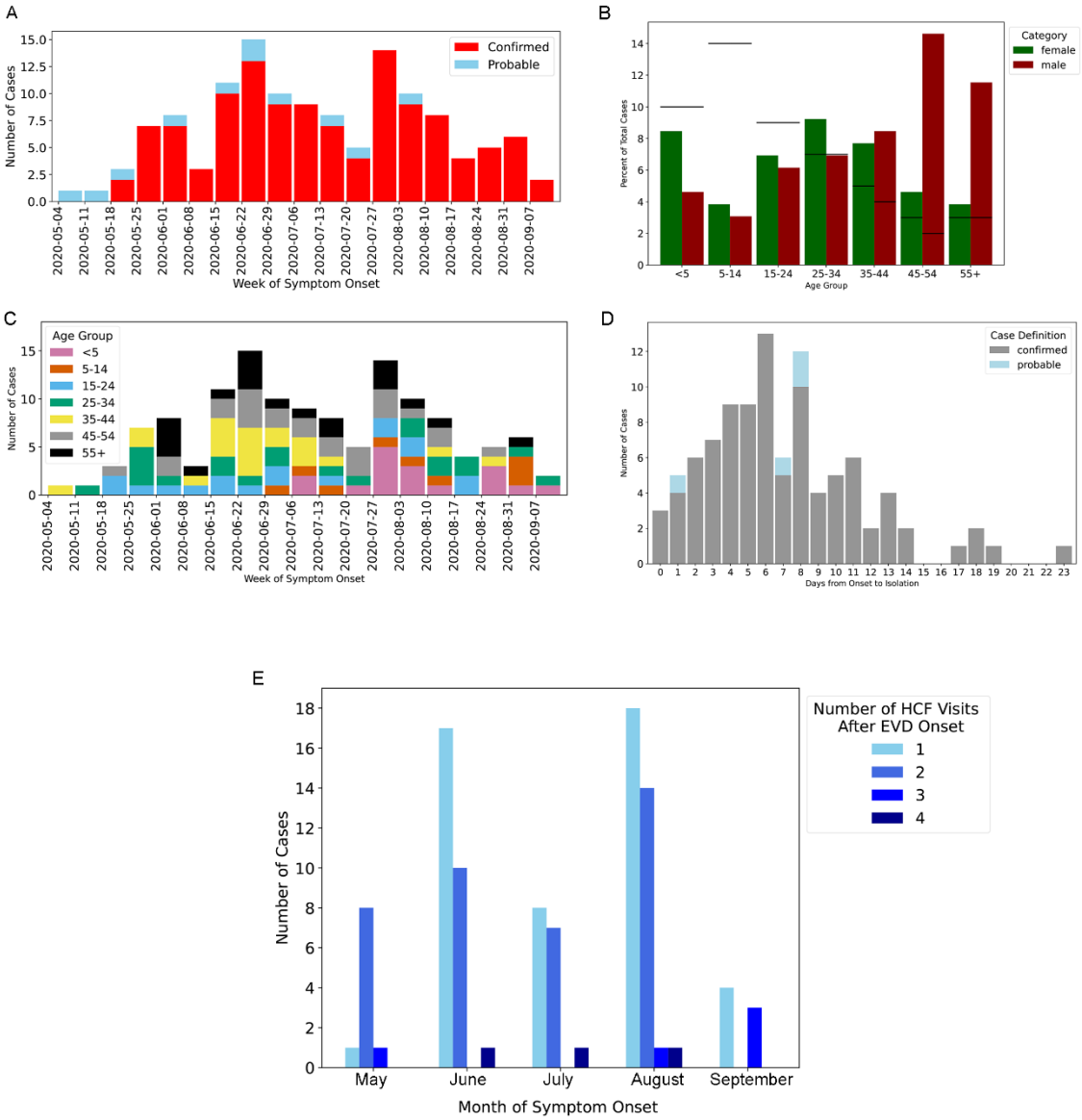


Figure 69 *: Demographics of EVD cases during the 2020 Équateur Province outbreak*

(A) Epidemiological curve of confirmed and probable EVD cases overtime. (B) Age distribution of confirmed and probable EVD cases by gender (the black horizontal bars represent the 2020 Democratic Republic of the Congo known age and gender population distribution from WHO).(C)Temporal age distribution of individuals with EVD. (D) Distribution of patients with EVD who visited multiple health-care facilities after symptoms onset. EVD=Ebolavirus disease.

After this, the outbreak declined and the reported symptom onset date for the last case was on September 12, 2020. Men >45 years were predominantly infected, whereas children 5-14 had the lowest infection rates; this age distribution was different than the known age distribution in DRC (***Figure 69*B**). The age distribution of EVD cases changed over time (***Figure 69*C**) and space (***Figure 73***); in the beginning of the outbreak (May-June 2020) EVD cases occurred in individuals > 15 years old, but from July-September spread also to children < 14 years (***Figure 69*C**). Symptom onset dates and community isolation dates were available for 100% and 75% (98/130) of cases, respectively, leading to the identification that the modal time from symptom onset to isolation was six days (***Figure 69*D**). As initially seen with the probable index case #1, 36% (47/130) of EVD cases visited more than one health care facility after symptoms onset and some visited up to four HCFs after symptoms onset (***Figure 69*E**). The percentage of confirmed/probable cases who sought care at multiple healthcare facilities decreased over time with an average of two HCF visited in May and decreasing to 1.5, 1.6, 1.6 and 1.9 HCFs visited in June, July, August, and September, respectively (***Figure 69*E**). A wide view of the outbreak, including the known contact tracing chains and spread through different districts can be observed in ***Figure 70***. The earliest identified probable case #1 in this outbreak was a 37-year-old housewife residing in the Mbandaka health zone who frequently consumed wild bat meat, but had no contact with sick individuals, funerals or visits to health centers in the period before her symptoms onset; suggesting that the outbreak most likely started as a result of zoonotic spillover. Probable case #1 is linked to nine subsequent EVD cases, resulting in the spread of EVD in the Mbandaka and Wangata health zones (***Figure 70***).

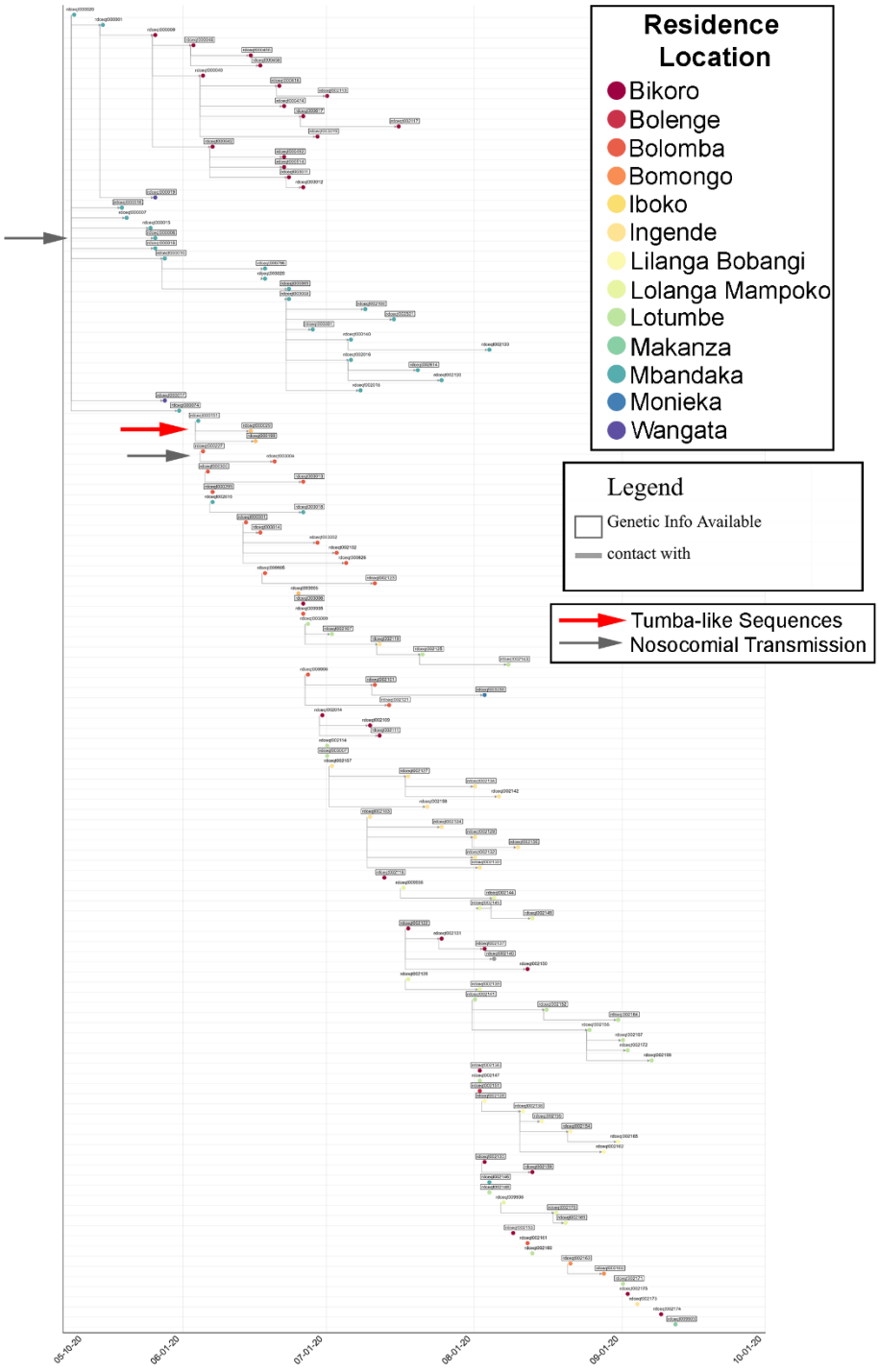


Figure 70 *: Social networks using interviews and contact tracing from the Équateur Province outbreak*

Each circle represents a single individual and is located at the date of symptom onset. Individuals from which genetic data are available are indicated with a box around the individuals' identification number. Grey lines connecting nodes indicate social connections gathered from contact tracing interviews. The red arrow highlights the contact tracing chain associated with 2018 Tumba-like sequences. Grey arrows highlight examples of nosocomial transmission.

There were three health-care workers and one traditional healer among the cases, two of whom died. Other commonly affected occupational groups included farmers/fishers/hunters (n=37, 28%), housewives (n=25, 19%), and business persons (n=7, 5%). The most common exposure risk [72% (94/130)] reported by confirmed and probable cases was having contact with another confirmed or probable EVD case (***Tableau 27***). Seventeen percent (23/130) of cases did not have a known epidemiological link, 6.9% (9/130) reported an epi link to an unidentified probable case and 2% (4/130) reported a potential link with animals (***Tableau 27***). The most likely setting of person-to-person (P2P) transmission was in the community (15.4%) (i.e. – a non-family member, outside of healthcare facility, friend/neighbor or other interactions), in the household (14.6%), or transmission occurring in the household or funeral (9.2%) (***Tableau 27***). Twenty percent of individuals reported multiple exposure locations and 33.8% did not report an exposure setting.

Tableau 27 *: Summary of Epidemiological Links and Transmission Types from Patient-reported data and Case Report Forms*

Epidemiological Link (n=130)	**n**	**%**
P2P with known confirmed/probable case	94	72.3%
P2P with unidentified probable case	9	6.9%
Animal	4	3.1%
Unknown link	23	17.7%
Type of Person-to-Person Transmission (n=130)*	**n**	**%**
Funeral	11	8.5%
Household	19	14.6%
Household or Funeral	12	9.2%
Community	20	15.4%
Community or Funeral	12	9.2%
Community or Household	3	2.3%
Nosocomial	9	6.9%
Unknown exposure type	44	33.8%

Presence of Two Circulating Zaire Ebolavirus variants

Next generation sequencing was attempted using 188 specimens from 122 individuals with an epidemiological identifier and 31 individuals without an epidemiological identifier (specimens were not available from all 130 confirmed and probable cases and in some instances multiple specimens were collected from the same patient). Overall, a total of 87 genomes were generated with coverage above 70% (***Tableau 30***). Sequencing uncovered the presence of two circulating *Zaire ebolavirus* variants associated with this outbreak (***Figure 71***A and ***Figure 71***F, ***Figure 74***). The Mbandaka variant was associated with the majority of human cases and the Mbandaka sequence data exhibits characteristics of 1-2 spillover events into the human population; the Mbandaka root age is estimated as 01-13-2020 [12-12-2018 to 06-02-2020] 95% credible interval (***Figure 71***A). The substitution rate for the Mbandaka variant was $0.474*10^{-3}$ subs/site/year ([$0.263\text{-}0.699 * 10^{-3}$] 95% credible interval) using Bayesian analysis and $0.818*10^{-3}$ subs/site/year using a regression analysis of root-to-tip distance over time (RTT) (***Figure 71***B-C). In general, the Mbandaka 1 and 2 clades appear to cluster geographically (***Figure 71***A). Three sequences from this outbreak exhibited similarity to the 2018 Tumba variant from Iboko and Bikoro health zones (2) (***Figure 71***F). These new sequences exhibited a delayed mutation rate of $0.44*10^{-3}$ subs/site/year ([$0.217\text{-}0.705 *10^{-3}$] 95% credible interval) using Bayesian analysis compared to the acute substitution rate from the 2018 Tumba outbreak $4.09*10^{-3}$ subs/site/year ([$1.24\text{-}7.07 *10^{-3}$] 95% credible interval) using Bayesian and RTT methods ($3.8*10^{-3}$ subs/site/year)(***Figure 71***D-E), consistent with transmission from a persistently-infected survivor of the 2018 outbreak. The first identified Tumba-like case was a 19-year-old male who had no reported contact with any wild animals or bush meat, no contact with a sick individual, funeral or visit to a health facility and investigators were unable to confirm him as a previous 2018 EVD case. After onset of EVD

symptoms, this individual visited two HCFs and an indistinguishable *Zaire ebolavirus* Tumba-like variant was detected in two subsequent cases with epidemiological links to the 19yo male.

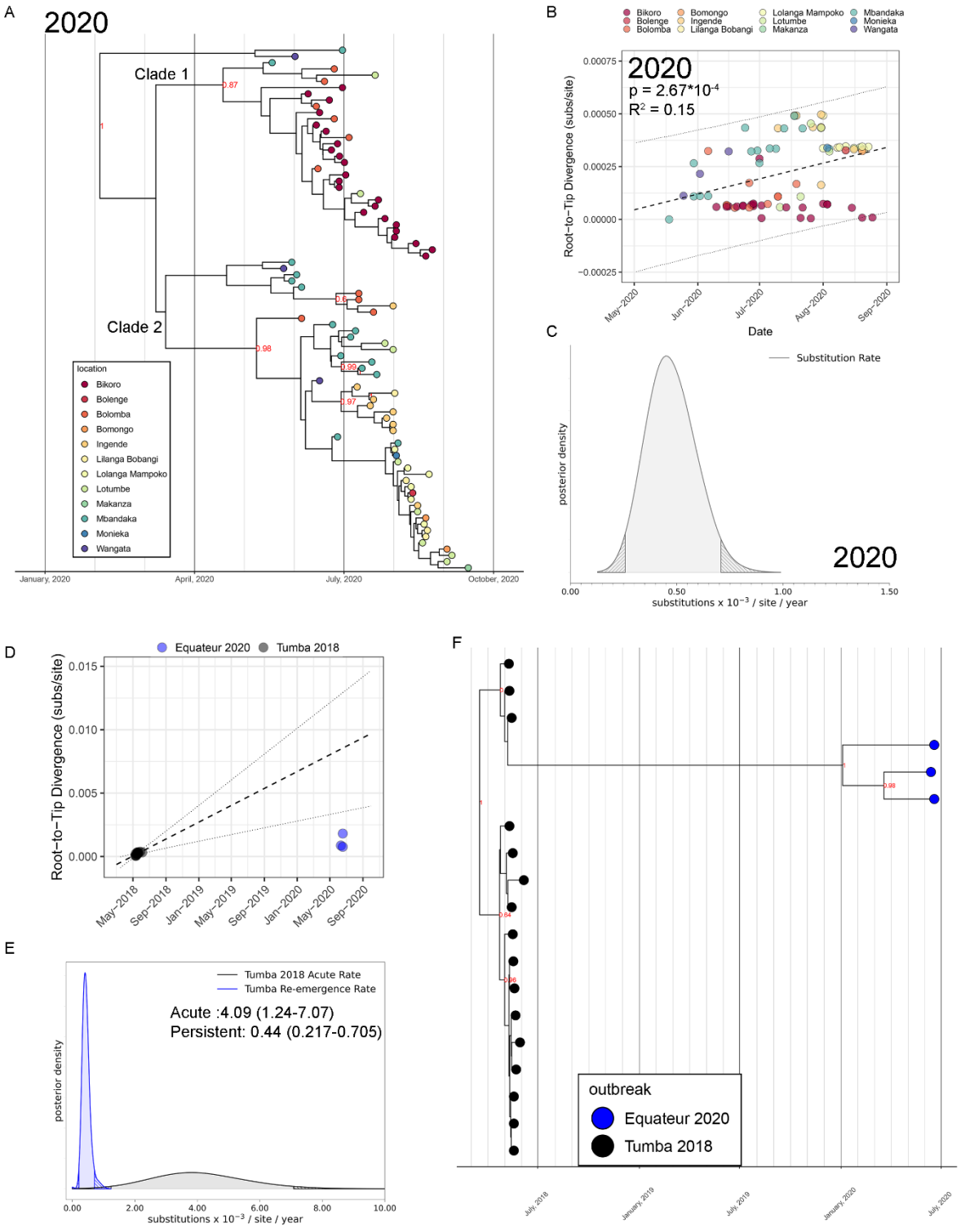


Figure 71 *: Ebola virus variants circulating during the 2020 Équateur Province outbreak*

Integration of Genetic and Epidemiological Data from the Equateur Outbreak

Using patient-reported exposure and contact data, an extensive view of the EBOV outbreak in Equateur was constructed, including genetic data (when available), hospital visits before and after EVD onset, symptoms onset, community isolation and recovery status (***Figure 75***). This plot documents the connected and unconnected epidemiological connections, viral geographic spread (***Figure 70***), and overlays genetic data onto these epidemiological chains (***Figure 75***). In general, there were 20 unconnected contact chains (containing two or more individuals) where genetic data supported their connections into the larger disease transmission chain (***Figure 75***). There were also 20 individuals not connected to any contact tracing chains; 11 of these could be added to the larger outbreak using genetic data (the remaining 9 individuals did not have associated genetic data). The visualization also allowed the identification of the three genetically distinct Tumba-like sequences (***Figure 72***A, red). Three individuals (not counting the index case) also reported epidemiological spread from animals, but the genetic data from each case or their close contacts supported the inclusion of these three individuals in the ongoing Mbandaka outbreak, rather than due to the spillover of new *Zaire ebolavirus* variants (***Figure 75***). Additional non-documented nosocomial cases were identified where individuals without EVD symptoms visited health care facilities concurrently with EVD cases and subsequently developed EVD (***Figure 72***B and ***Figure 72***C, grey arrow). These two cases (RDCEQT003004 and RDCEQT000008) were not among the nine suspected nosocomial transmission cases initially reported from the contact tracing data (***Tableau 27***).

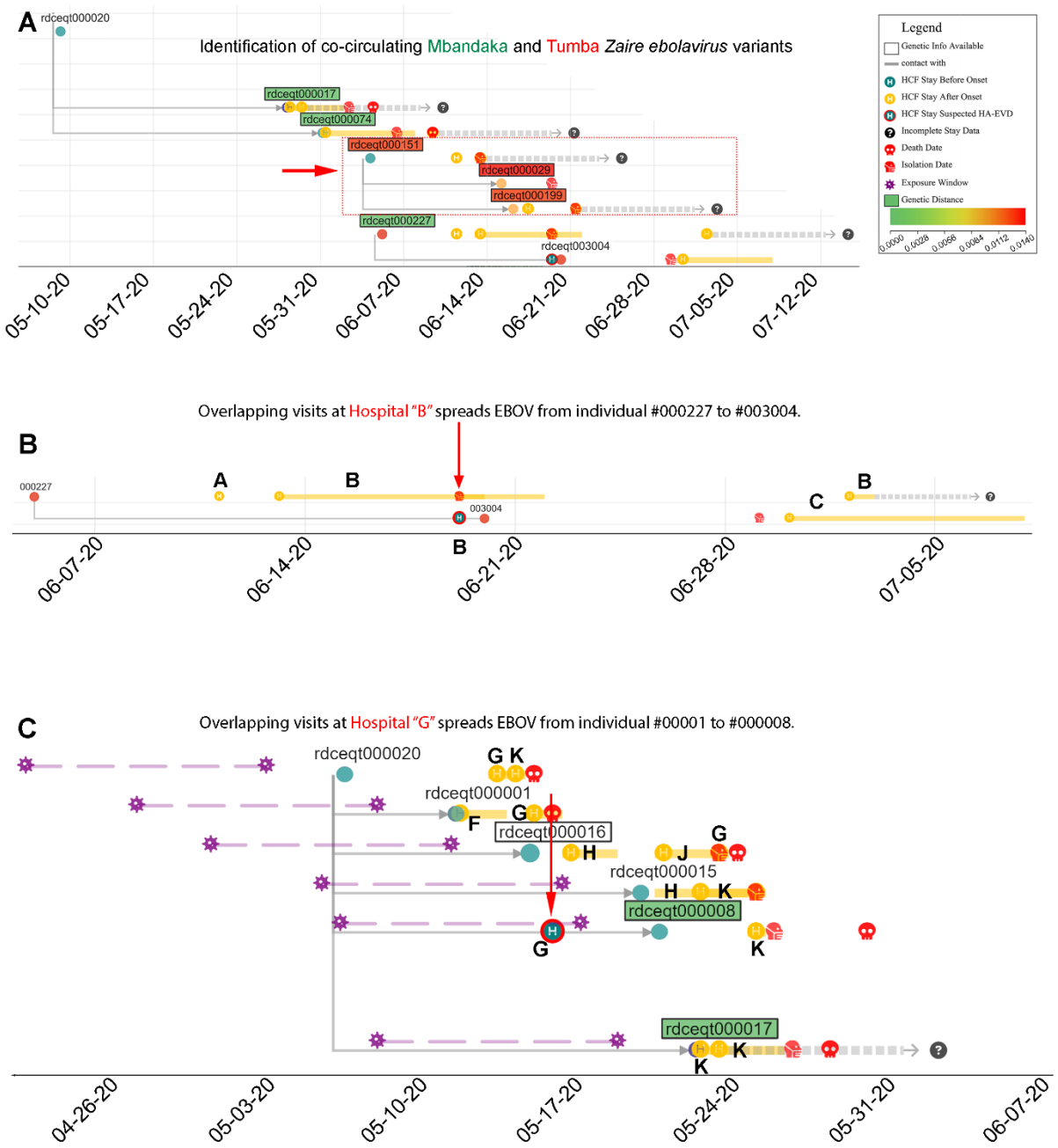


Figure 72 : *Combining epidemiological and phylogenetic networks highlights unique details from the Equateur outbreak.*

A) *Adding genetic data to contact tracing chains accentuates human cases containing different* Zaire ebolavirus *variants. Filled circles represent single individuals and are located at symptom onset dates (x-axis). Hospitals stays after onset of EVD symptoms are indicated with a yellow circle containing an "H", and symbols indicate isolation dates (masked face) or death dates (skull). Incomplete data is indicated with dotted grey lines and question marks. Red arrow indicates contact tracing chain containing Tumba-like* Zaire Ebolavirus *sequences. Shading in boxes indicated genetic distance from the earliest sequence in the outbreak.* ***B)*** *Overlapping health care facility stays highlights an example of nosocomial transmission (red arrow). Individual 3004 visited HCF "B" before onset of EVD symptoms (green/red "H") and visited facility "B" concurrently with EVD case 0227. Individual 3004 subsequently developed EVD.* ***C)*** *Contact tracing data can be re-evaluated by combining genetic and epidemiological data. Visualizing metadata allows for the identification of overlapping hospitals stays at facility "G" between the index EVD case 0001 and non-EVD patient 0008 (red arrow). Patient 0008 reported an epilink to the index case (EVD case 0020), but this contact is outside of the expected EVD exposure window (purple stars and bars). Instead, Individual 0008 visited HCF "G" before onset of EVD symptoms (green/red "H") and visited facility "G" concurrently with EVD case 0001 (red arrow). Individual 008 subsequently developed EVD. Boxes around patient numbers indicates availability of genetic data and box color (green) indicates genetic relatedness between viral*

4. Discussion:

Here, we provide an extensive view of the 2020 Equateur EBOV outbreak by combining both genetic and epidemiological data is provided. However, this integrated view is still likely incomplete, as some cases and contacts could only be identified as "probable", suggesting that additional EVD cases might not have been fully documented, similar to observations from the 10th EBOV outbreak in Nord Kivu, DRC (20). Epidemiological case investigations uncovered evidence that the 2020 Equateur EBOV outbreak started in the Mbandaka health zone by an individual that frequently consumed bat meat, and genetic data indicated that the EBOV sequence from the index case represented a new *Zaire ebolavirus* variant. Additional genetic evidence demonstrated that a second EBOV variant re-emerged from an EVD survivor of the previous 2018 Tumba/Bikoro outbreak during the same timeframe. This data refuted the initial hypothesis that the Equateur outbreak was related to the ongoing EVD outbreak in the western DRC in the Nord Kivu province. By combining the social and genetic datasets, a better understanding of the mechanisms of viral spread, exposure risk factors, and areas needing targeted improvement for future outbreak responses will be gained.

During the Equateur outbreak, there were several identified mechanisms of viral spread, including zoonotic, nosocomial, close-contact, and spread from a persistently-infected EVD survivor. One challenge during this outbreak (and during more recent EBOV outbreaks in Guinea (21), Nord Kivu (17, 22), and Equateur 2022 (23)) was identifying whether viral spread occurred due re-emergence from a persistently-infected EVD survivor, or due to a new zoonotic spillover. Distinguishing these nuances is especially challenging in an agrarian society, where individuals have frequent interactions with livestock and/or consuming bushmeat. An increasing amount of evidence demonstrates that transmission from persistently infected survivors is indicated by a virus having close genetic relatedness to a previous

outbreak, as well as exhibiting a delayed mutation rate (10, 11, 13, 16). In contrast, viral genomes from a new zoonotic spillover generally appear to segregate into a distinct viral clade, such as in Equateur 2022 (23), or for a Marburg case in Ghana in 2022 (24). NGS implemented in real time during an outbreak (initially through unbiased sequencing, followed by a targeted amplicon-based minion approach) and combined with epidemiological data using the ChainChecker tool is critical to rapidly link and correct chains of transmission. Altogether, these data indicate that rapid and retrospective genetic sequencing, combined with epidemiological data is necessary during outbreak investigations because it directs responders to the mechanisms of viral spread, and subsequent targeted interventions.

How can the data presented here be used to respond to future EBOV outbreaks? Studies from the 2014 West African EVD outbreak in Guinea, Liberia and Sierra Leone have emphasized the need for survivor studies to educate survivors as to their potential ongoing EBOV risks(25, 26), and those sentiments are also reinforced here. On average, six days were needed for EVD cases to be isolated after onset of symptoms and EVD cases visited multiple HCFs after onset of symptoms – in some cases, up to four facilities. Thus, rapid diagnostic testing (RDT)(27), mobile laboratory testing, and post-mortem surveillance is needed to create a framework to rapidly identify and isolate future EVD cases. In Uganda, Shoemaker *et al.* demonstrated that an enhanced viral hemorrhagic fever surveillance program – consisting of targeted VHF training at sentinel surveillance hospitals, decreased the duration and severity of VHF outbreaks(27). A similar VHF sentinel surveillance system located at sites of previous EVD outbreaks in the DRC could also rapidly identify and isolate future EVD cases. In addition, conducting multidisciplinary investigation in a “One Health approach” during next outbreaks may generate more consistent data for prevention and response.

A central question relevant to future outbreaks is what caused this outbreak to end? In the last three weeks of the Equateur outbreak new EVD cases were confined to six health areas,

decreasing to three and then two health areas in the final two weeks. Eight out of 13 cases from the final 3 weeks of the outbreak were in children less than 14 years old, possibly suggesting individuals > 15 years old had pre-existing antibodies due to previous EVD outbreaks, or due to vaccine-derived protection. During the Equateur outbreak, the rVSVΔG-ZEBOV-GP vaccine was administered in a ring vaccination strategy for individuals > six months old that were primary contacts and contacts of contacts; however, it is not known if the final EVD cases or their contacts were vaccinated. Retrospective studies from the Nord Kivu outbreak identified that vaccination with rVSVΔG-ZEBOV-GP vaccine was associated with fewer EVD symptoms, reduced ETU stay and decreased deaths (28) and anti-GP antibodies were detected in vaccinated individuals at 21 days and six months post vaccination(29). It is currently unknown whether protective immunity from natural infection or vaccination wanes over time and if this loss of protection correlates with EBOV re-emergence from persistently-infected EVD survivors. Future serological surveys that can distinguish between natural- and vaccine-derived antibody responses will help address these questions.

Previous work during EVD outbreaks have focused on building genomic surveillance capacity in country and developing a sustainable system (2). The paradigm of SARS-CoV2 genomic surveillance has also caused a significant shift in public health surveillance capacity in Africa(30). By building upon the previous capacity building efforts in the DRC and consolidating the epidemiological and genetic datasets, a “wide view” of the Equateur 2020 EBOV outbreak has been presented, allowing identification of unforeseen trends and fact-check pre-existing assumptions.

Contributors: Conceptualization, S.L.M.W., E.K-L., A.A-A., A.M., R.K., M.C., C.P. ; Methodology, S.L.M.W., E.K-L., E.L-L., A.A-A., F.M.M., J.C.M-C., G.M., F.M., A.M., R.K., M.C., C.P., A.P., S.T.; Software, S.L.W.M., C.P., E.L-L. ;Validation, S.L.M.W., E.K-L., E.L-

L., A.A-A. , J.C.M-C., G.M., F.M., A.M., R.K., M.C., C.P., J.O.O., A.P.D., G.L.T.F., A.E.K., A.K.M, V.M.M ; Formal Analysis, S.L.M.W, A.M., R.K., M.C., C.P. ; Investigation, S.L.M.W., E.K-L., E.L-L., A.A-A. , J.C.M-C., G.M., F.M., A.M., R.K., M.C., C.P., M.M., J.O.O., A.P.D., G.L.T.F., A.E.K., A.K.M, V.M.M ; Resources, G.M., F.M., A.M., M.C., C.P. ; Data Curation, Verification and Raw Data Access, S.L.M.W. E.K-L., E.L-L., A.A-A. , J.C.M-C., G.M., F.M., A.M., R.K., M.C., C.P., J.O.O., A.P.D., G.L.T.F., A.E.K., A.K.M, V.M.M ; Writing – Original Draft, S.L.M.W., J.K. ; Writing – Review & Editing, S.L.M.W., E.K-L., E.L-L., A.A-A. , J.C.M-C., G.M., F.M., A.M., R.K., M.C., C.P., M.M., J.O.O., A.P.D., G.L.T.F., A.E.K., A.K.M, V.M.M, C.M., E.T. ; Visualization, S.L.M.W., A.W., C.P., E.T. ; Supervision, T.S., C.M., J.K., G.T., F.M., D.M., M.W., J.M., J.K., J-J M-T., S. A-M., P.M-K ; Project Administration, T.S., C.M., J.K., G.T., F.M., D.M., M.W., J.M., J.K., J-J M-T., S. A-M., P.M-K ; Funding Administration, T.S., C.M., J.K., G.T., F.M., D.M., M.W., J.M., J.K., J-J M-T., S. A-M., P.M-K

All authors contributed important intellectual content during manuscript drafting or revision and accept accountability for the overall work by ensuring that questions pertaining to the accuracy or integrity of any portion of the work are appropriately investigated and resolved. All authors had final responsibility for the decision to submit for publication.

Data sharing : An anonymised, deidentified version of the dataset can be made available upon reasonable request to the corresponding author to allow all results to be reproduced.

Declaration of interests : The authors declare no competing interests.

Acknowledgments : The artic network: We acknowledge the support and assistance of Josh Quick, Nick Loman, Andrew Rambaut, Ian Goodfellow and the Wellcome Trust funded ARTIC Network (Collaborators Award 206298/Z/17/Z). Response and field team: Frida

Nkawa, Guy Midingi, Simon Pierre N., Guy-Aimé M. Biorepository team: Raphael Lumembe, Gabriel Kabamba, André Citenga

The views expressed in this Article are those of the authors and do not necessarily represent the official position of the US Centers for Disease Control and Prevention.

References:

1. WHO. Ebola: Équateur, Democratic Republic of the Congo, June-November 2020 2022 [Available from: https://www.who.int/emergencies/situations/ebola-health-update---%C3%A9quateur-province-democratic-republic-of-the-congo-2020.
2. Mbala-Kingebeni P, Pratt CB, Wiley MR, Diagne MM, Makiala-Mandanda S, Aziza A, et al. 2018 Ebola virus disease outbreak in Equateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterisation. Lancet Infect Dis. 2019;19(6):641-7.
3. CDC. Ebola (Ebola Virus Disease): Outbreaks 2022 [Available from: https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/index-2018.html.
4. Kratz T, Roddy P, Tshomba Oloma A, Jeffs B, Pou Ciruelo D, de la Rosa O, et al. Ebola Virus Disease Outbreak in Isiro, Democratic Republic of the Congo, 2012: Signs and Symptoms, Management and Outcomes. PLoS One. 2015;10(6):e0129333.
5. Amman BR, Carroll SA, Reed ZD, Sealy TK, Balinandi S, Swanepoel R, et al. Seasonal pulses of Marburg virus circulation in juvenile Rousettus aegyptiacus bats coincide with periods of increased risk of human infection. PLoS Pathog. 2012;8(10):e1002877.
6. Seifert SN, Fischer RJ, Kuisma E, Badzi Nkoua C, Bounga G, Akongo MJ, et al. Zaire ebolavirus surveillance near the Bikoro region of the Democratic Republic of the Congo during the 2018 outbreak reveals presence of seropositive bats. PLoS Negl Trop Dis. 2022;16(6):e0010504.
7. Lacroix A, Mbala Kingebeni P, Ndimbo Kumugo SP, Lempu G, Butel C, Serrano L, et al. Investigating the Circulation of Ebola Viruses in Bats during the Ebola Virus Disease Outbreaks in the Equateur and North Kivu Provinces of the Democratic Republic of Congo from 2018. Pathogens. 2021;10(5).
8. Leroy EM, Rouquet P, Formenty P, Souquiere S, Kilbourne A, Froment JM, et al. Multiple Ebola virus transmission events and rapid decline of central African wildlife. Science. 2004;303(5656):387-90.
9. Martini GA, Schmidt HA. [Spermatogenic transmission of the "Marburg virus". (Causes of "Marburg simian disease")]. Klin Wochenschr. 1968;46(7):398-400.
10. Mate SE, Kugelman JR, Nyenswah TG, Ladner JT, Wiley MR, Cordier-Lassalle T, et al. Molecular Evidence of Sexual Transmission of Ebola Virus. N Engl J Med. 2015;373(25):2448-54.
11. Whitmer SLM, Ladner JT, Wiley MR, Patel K, Dudas G, Rambaut A, et al. Active Ebola Virus Replication and Heterogeneous Evolutionary Rates in EVD Survivors. Cell Rep. 2018;22(5):1159-68.
12. Varkey JB, Shantha JG, Crozier I, Kraft CS, Lyon GM, Mehta AK, et al. Persistence of Ebola Virus in Ocular Fluid during Convalescence. N Engl J Med. 2015;372(25):2423-7.
13. Jacobs M, Rodger A, Bell DJ, Bhagani S, Cropley I, Filipe A, et al. Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis: a case report. Lancet. 2016;388(10043):498-503.
14. Liu WJ, Sesay FR, Coursier A, Knust B, Marrinan JE, Whitmer S, et al. Comprehensive Clinical and Laboratory Follow-up of a Female Patient With Ebola Virus Disease: Sierra Leone Ebola Virus Persistence Study. Open Forum Infect Dis. 2019;6(3):ofz068.
15. Keita AK, Vidal N, Toure A, Diallo MSK, Magassouba N, Baize S, et al. A 40-Month Follow-Up of Ebola Virus Disease Survivors in Guinea (PostEbogui) Reveals Long-Term Detection of Ebola Viral Ribonucleic Acid in Semen and Breast Milk. Open Forum Infect Dis. 2019;6(12):ofz482.

16. Blackley DJ, Wiley MR, Ladner JT, Fallah M, Lo T, Gilbert ML, et al. Reduced evolutionary rate in reemerged Ebola virus transmission chains. Sci Adv. 2016;2(4):e1600378.
17. Mbala-Kingebeni P, Pratt C, Mutafali-Ruffin M, Pauthner MG, Bile F, Nkuba-Ndaye A, et al. Ebola Virus Transmission Initiated by Relapse of Systemic Ebola Virus Disease. N Engl J Med. 2021;384(13):1240-7.
18. WHO. Ebola: North Kivu/Ituri, Democratic Republic of the Congo, August 2018 - June 2020 2022 [Available from: https://www.who.int/emergencies/situations/Ebola-2019-drc-.
19. Kinganda-Lusamaki E, Black A, Mukadi DB, Hadfield J, Mbala-Kingebeni P, Pratt CB, et al. Integration of genomic sequencing into the response to the Ebola virus outbreak in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. Nat Med. 2021;27(4):710-6.
20. Nkuba-Ndaye A, Mukadi-Bamuleka D, Bulabula-Penge J, Thaurignac G, Edidi-Atani F, Mambu-Mbika F, et al. Added Value of an Anti-Ebola Serology for the Management of Clinically Suspected Ebola Virus Disease Patients Discharged as Negative in an Epidemic Context. J Infect Dis. 2022;226(2):352-6.
21. Keita AK, Koundouno FR, Faye M, Dux A, Hinzmann J, Diallo H, et al. Resurgence of Ebola virus in 2021 in Guinea suggests a new paradigm for outbreaks. Nature. 2021;597(7877):539-43.
22. Mbala-Kingebeni P. August 2022 EVD case in DRC linked to 2018-2020 Nord Kivu EVD outbreak 2022 [Available from: https://virological.org/t/august-2022-evd-case-in-drc-linked-to-2018-2020-nord-kivu-evd-outbreak/889.
23. Pratt C. April 2022 Ebola virus disease case in Equateur Province, DRC, represents a new spillover event 2022 [updated 04-24-2022. Available from: https://virological.org/t/april-2022-ebola-virus-disease-case-in-equateur-province-drc-represents-a-new-spillover-event/795.
24. Adu B. First-ever outbreak of Marburg virus disease declared in Ghana, 2022 2022 [Available from: https://virological.org/t/first-ever-outbreak-of-marburg-virus-disease-declared-in-ghana-2022/897.
25. Diallo MSK, Toure A, Sow MS, Kpamou C, Keita AK, Taverne B, et al. Understanding Long-term Evolution and Predictors of Sequelae of Ebola Virus Disease Survivors in Guinea: A 48-Month Prospective, Longitudinal Cohort Study (PostEboGui). Clin Infect Dis. 2021;73(12):2166-74.
26. Soka MJ, Choi MJ, Baller A, White S, Rogers E, Purpura LJ, et al. Prevention of sexual transmission of Ebola in Liberia through a national semen testing and counselling programme for survivors: an analysis of Ebola virus RNA results and behavioural data. Lancet Glob Health. 2016;4(10):e736-43.
27. Mukadi-Bamuleka D, Sanogo YO, Bulabula-Penge J, Morales-Betoulle ME, Fillon P, Woodruff P, et al. Postmortem Surveillance for Ebola Virus Using OraQuick Ebola Rapid Diagnostic Tests, Eastern Democratic Republic of the Congo, 2019-2020. Emerg Infect Dis. 2022;28(2):420-4.
28. Rupani N, Ngole ME, Lee JA, Aluisio AR, Gainey M, Perera SM, et al. Effect of Recombinant Vesicular Stomatitis Virus-Zaire Ebola Virus Vaccination on Ebola Virus Disease Illness and Death, Democratic Republic of the Congo. Emerg Infect Dis. 2022;28(6):1180-8.
29. Hoff NA, Bratcher A, Kelly JD, Musene K, Kompany JP, Kabamba M, et al. Immunogenicity of rVSVDeltaG-ZEBOV-GP Ebola vaccination in exposed and potentially exposed persons in the Democratic Republic of the Congo. Proc Natl Acad Sci U S A. 2022;119(6).
30. Inzaule SC, Tessema SK, Kebede Y, Ogwell Ouma AE, Nkengasong JN. Genomic-informed pathogen surveillance in Africa: opportunities and challenges. Lancet Infect Dis. 2021;21(9):e281-e9.

Figure legends

***Figure 68*: Ebola virus disease outbreaks in the Democratic Republic of Congo, 1976-2022. A)** Distribution of EVD outbreaks in the DRC. Colored circles identify locations of previous outbreaks, size of circles represents number of positive human cases, and circle color represents EBOV species. Affected 2020 health zones (red stripes and purple shading) and site of 2018 Tumba/Bikoro outbreak (red stripes). Red star indicates the location of the Kinshasa diagnostic lab during the Equateur 2020 outbreak. **B)** Locations and prevalence of EVD cases during the 2020 EBOV outbreak in the Equatuer province. Red stars indicate the location of the diagnostic and field labs during the Equateur 2020 outbreak (Mbandaka, Ingende, Itipo, Bikoro and Bolomba).

***Figure 69*: Demographics of EVD cases during the 2020 Équateur outbreak**. **A)** Epidemiological curve of confirmed and probable EVD cases over time. **B)** Age distribution of confirmed and probable EVD cases by gender. Black horizontal bars represent the 2020 DRC known age and gender population distribution from WHO. **C)** Temporal age distribution of EVD cases. **D)** Distribution of days between EVD onset to community isolation for 75% (98/130) of confirmed and probably cases. **E)** Distribution of cases that visited multiple health case facilities after EVD onset.

Figure 70*: Interviews and contact tracing illustrate the social networks from the Équateur outbreak.** Each circle represents a single individual and is located at the date of symptom onset, x-axis is in units of time and y-axis has no value. Grey lines connecting nodes indicate social connections gathered from contact tracing interviews. Nodes are colored according to an individual's residence location. Blue arrow highlights the contact tracing chain associated with 2018 Tumba-like sequences. Grey arrows highlight examples of nosocomial transmission explored in greater details in ***Figure 72.

***Figure 71*: *Zaire Ebolavirus* variants circulating during the 2020 Équateur outbreak**. **A)** Inferred phylogenetic history using all available Mbandaka variant sequences. Nodes are colored according to residence health zone. Posterior probabilities greater than 0.7 are labeled at internal nodes. **B)** Genetic divergence from root versus collection date for the Mbandaka variant. Points are colored according to residence locations, as in A. Genetic divergence from root is black dashed line and dotted lines represent 95% prediction intervals. **C)** Posterior density substitution rate estimate for the Mbandaka variant. **D)** The substitution rate for the 2018-like Équateur sequences is delayed relative to acute viral sequences from the 2018 Tumba/Bikoro outbreak. Genetic divergence from root versus collection date for the 2018 Tumba/Bikoro outbreak, including 2018-like sequences from Équateur EVD outbreak. Points are colored according to outbreak, dashed line indicates substitution rate for 2018 Tumba/Bikoro outbreak, and dotted lines are prediction intervals using only the 2018 Tumba sequences. **E)** Posterior density substitution rate estimates for the 2018 Tumba sequences (black) and the branch leading to first re-

emerged Tumba-like sequence from the Equateur outbreak (blue). Genetic divergence from root is black dashed line and dotted lines represent 95% prediction intervals. **F)** Inferred phylogenetic history using Tumba variant sequences. Nodes are colored according to outbreak (2018 Tumba/Bikoro or 2020 Equateur). Posterior probabilities greater than 0.7 are labeled at internal nodes.

***Figure 72*: Combining epidemiological and phylogenetic networks highlights unique details from the Equateur outbreak.** **A)** Adding genetic data to contact tracing chains accentuates human cases containing different *Zaire ebolavirus* variants. Filled circles represent single individuals and are located at symptom onset dates (x-axis). Hospitals stays after onset of EVD symptoms are indicated with a yellow circle containing an "H", and symbols indicate isolation dates (masked face) or death dates (skull). Incomplete data is indicated with dotted grey lines and question marks. Red arrow indicates contact tracing chain containing Tumba-like *Zaire Ebolavirus* sequences. Shading in boxes indicated genetic distance from the earliest sequence in the outbreak. **B)** Overlapping health care facility stays highlights an example of nosocomial transmission (red arrow). Individual 3004 visited HCF "B" before onset of EVD symptoms (green/red "H") and visited facility "B" concurrently with EVD case 0227. Individual 3004 subsequently developed EVD. **C)** Contact tracing data can be re-evaluated by combining genetic and epidemiological data. Visualizing metadata allows for the identification of overlapping hospitals stays at facility "G" between the index EVD case 0001 and non-EVD patient 0008 (red arrow). Patient 0008 reported an epilink to the index case (EVD case 0020), but this contact is outside of the expected EVD exposure window (purple stars and bars). Instead, Individual 0008 visited HCF "G" before onset of EVD symptoms (green/red "H") and visited facility "G" concurrently with EVD case 0001 (red arrow). Individual 008 subsequently developed EVD. Boxes around patient numbers indicates availability of genetic data and box color (green) indicates genetic relatedness between viral sequences.

Supplemental material

Tableau 28 : List of Equateur-specific EBOV amplicon-based NGS primers.**:** List of Equateur-specific EBOV amplicon-based NGS primers.

Tableau 29 : Summary of Bayesian Model Fitting Estimates**:** Summary of Bayesian Model Fitting Estimates

Tableau 30 : Summary of Sequencing Results and Metadata**:** Summary of Sequencing Results and Metadata

Figure 73**:** Distribution of EVD cases by week of symptom onset (x-axis), health area (y-axis) and age distribution (z-axis, and stacked bars).

Figure 74**:** Inferred evolutionary relationships for the *Zaire ebolavirus* species. Genomes from historic EBOV outbreaks (n=837) and the Equateur outbreak (n=87) are included in the midpoint-rooted maximum likelihood tree.

Figure 75**:** Comprehensive overview of Equateur outbreak incorporating all available epidemiological data and genetic data. Nodes represent single individuals, are located a symptom onset dates (x-axis) and node color indicates the individual's residence health zone. Hospitals stays after onset of EVD symptoms are highlighted yellow, hospital stays prior to onset of EVD symptoms are highlighted light green, and symbols indicate isolation dates (masked face) or death dates (skull). Incomplete data is indicated with dotted grey lines and question marks. Red arrow indicates contact tracing chain containing Tumba-like *Zaire Ebolavirus* sequences. Shading in boxes indicates genetic distance from the earliest sequence in the outbreak (blue arrow). Grey arrows indicated nosocomial cases describes in ***Figure 72***. Animal icons (bat or monkey) are located near individuals reporting consumption of wild bushmeat or contact with wildlife. In limited cases, metadata is incomplete or was entered incorrectly on contact tracing forms. These examples are left on the plot to highlight the ability to quickly view inconsistent data.

Tableau 28 *: List of Equateur-specific EBOV amplicon-based NGS primers.*

primer name	primer sequence	pool
EBOV-400_01_LEFT	AGAATTTTTAGGATCTTTTGTGTGCGA	1
EBOV-400_01_RIGHT	CCCCAAGCTTTAGGGTTGTTGA	1
EBOV-400_03_LEFT	ATACAGGCCTTTGAAGCAGGTG	1
EBOV-400_03_RIGHT	AGCTGTTGGATATTGTATCAGTCCT	1
EBOV-400_05_LEFT	GTCTCCATCCTCTTGCAAGGAC	1
EBOV-400_05_RIGHT	AGTTACCATAGCGTTTGTTTGCTG	1
EBOV-400_07_LEFT	CGGCGAATACCAGAGTTACTCG	1
EBOV-400_07_RIGHT	TTCCGTCCCTGTCCTGTTCTTC	1
EBOV-400_09_LEFT	AGTTTTCAGTACCAGTGATGGCA	1
EBOV-400_09_RIGHT	AACGCCTATTTGCATTAAGACTCAA	1
EBOV-400_11_LEFT	TGAATTCTCTAGCACTCGAAGCT	1
EBOV-400_11_RIGHT	TCAAGACTCGTAATGCGTTGTTCT	1
EBOV-400_13_LEFT	GACCGTCCCTCAAAGTGTTAGG	1
EBOV-400_13_RIGHT	CCCAACCTCGATCAATCTTGGG	1
EBOV-400_15_LEFT	AGGAGCTATATCTCTGACAGTATTATAATCA	1
EBOV-400_15_RIGHT	CTTTGGGGCCCGATATGACATT	1
EBOV-400_17_LEFT	GCCAGTCCAACTACCCCAGTAT	1
EBOV-400_17_RIGHT	GGGTCCAAACCGATGTACTTTG	1
EBOV-400_19_LEFT	ATCCGTCCATTAGAGGAGATACTTTT	1
EBOV-400_19_RIGHT	GATTACGCTCACTGTCGGCTTA	1
EBOV-400_21_LEFT	TCATCCACAATAGCACATTACAGGT	1
EBOV-400_21_RIGHT	AACTGTGGAAGCAAGTCGATCA	1
EBOV-400_23_LEFT	AAGATTCACACCACAGTTTCTGC	1
EBOV-400_23_RIGHT	GGTTGAGGACTCGTGGAGATTG	1
EBOV-400_25_LEFT	TCCCCAAAACCACAGCGAGA	1
EBOV-400_25_RIGHT	CGGTTGAGGATTGAAAAGGTGC	1
EBOV-400_27_LEFT	GGCGTTATAATTGCAGTTATCGCT	1
EBOV-400_27_RIGHT	TCTACCGGTTCGCAGATCTGAT	1
EBOV-400_29_LEFT	CCTCACAAGTACGCGTTCCTAC	1
EBOV-400_29_RIGHT	AACTTCCTCGTCATCACAGCAC	1
EBOV-400_31_LEFT	TGCTGTCGTTGTTTCAGGGTTA	1
EBOV-400_31_RIGHT	GATGGGATGGATCGTTGCTACC	1
EBOV-400_33_LEFT	TGCGGAGGTCTGATAAGAATAAACC	1
EBOV-400_33_RIGHT	TGTCTAGACACTCTCAGTTCAACC	1
EBOV-400_35_LEFT	AACTAATGACTTTGCCCCTGCA	1
EBOV-400_35_RIGHT	ACCAGAAAACCCATGTTAGTTCGA	1
EBOV-400_37_LEFT	CTTGACATCTCTGCTTTCATAATCAGA	1
EBOV-400_37_RIGHT	TCAACTGCTTCATCTAAAACACGG	1
EBOV-400_39_LEFT	ACGATGTAACTGTTACCAAGTTCTTG	1
EBOV-400_39_RIGHT	ACATAGTCCCCATAACCTAAGATGTC	1
EBOV-400_41_LEFT	AGGATCCAGTTTGTTCTGATTATCCC	1
EBOV-400_41_RIGHT	TGCTTTTAGCACCGTAGCATGT	1

primer name	primer sequence	pool
EBOV-400_43_LEFT	ACCATCCTCCACTTTTCTCAACC	1
EBOV-400_43_RIGHT	TTGCTCACGTTCCGTAACTACC	1
EBOV-400_45_LEFT	TCCACCACATAACCTCACACTG	1
EBOV-400_45_RIGHT	AGGCAATTGGACCCCATTCAAA	1
EBOV-400_47_LEFT	CGGTAAACCTCTGGATTTCGGA	1
EBOV-400_47_RIGHT	AACAGGAGTTGATGATAATAGCCATTT	1
EBOV-400_49_LEFT	ACTTGCACAGTTGATTTAGCACA	1
EBOV-400_49_RIGHT	TCACTGTTCGAACTGCCTTGAG	1
EBOV-400_51_LEFT	TCTGCACGCGACAGCAATATTA	1
EBOV-400_51_RIGHT	TCCACTGCTAATTGGGTCTGTAG	1
EBOV-400_53_LEFT	GCGTTATGTCACGGTTAATGAGT	1
EBOV-400_53_RIGHT	GCCAAGTATTTTCGGTTGCTGTT	1
EBOV-400_55_LEFT	TGTGGTACAGCAAATCCAAAACTAA	1
EBOV-400_55_RIGHT	GGACTCAGTAGCTAGCGTGTTG	1
EBOV-400_57_LEFT	ACAGATCGAAATTGTACGAAGCTG	1
EBOV-400_57_RIGHT	ACCTGTGGTATAGTACTTTCTCTAATGA	1
EBOV-400_59_LEFT	GGGACATGGCAAGCTGAGTTTA	1
EBOV-400_59_RIGHT	TCACACATGCTGCATTGTGAAT	1
EBOV-400_61_LEFT	CGAAAGGTCTGGGCTCATATTGT	1
EBOV-400_61_RIGHT	CCAGGAATCCTTTTTGCAACGT	1
EBOV-400_02_LEFT	TCACAGTCAAACAAGCAAGATTGA	2
EBOV-400_02_RIGHT	CTCCCTGGTACGCATGATGAAG	2
EBOV-400_04_LEFT	GTAGGAGAAAAGGCTTGCCTTGA	2
EBOV-400_04_RIGHT	CATACTCTCCATGCTTGGCCAG	2
EBOV-400_06_LEFT	ACCATCTTGGACTTGATGATCAGG	2
EBOV-400_06_RIGHT	ACTGGCTTAGTGTCCTCATCGT	2
EBOV-400_08_LEFT	ATCAACGAAGAGGCAGACCCA	2
EBOV-400_08_RIGHT	TTTTTCAGTGAGCCATGGTGGA	2
EBOV-400_10_LEFT	ACGAAACCAGGAAGAATTTTTGATGT	2
EBOV-400_10_RIGHT	TGCCCTTTGTTCTGGTTGTCAT	2
EBOV-400_12_LEFT	AGGAGGTAGTGCAAACATTAGCT	2
EBOV-400_12_RIGHT	TTGCCGAAATGTCAGGTTTCCC	2
EBOV-400_14_LEFT	ATCCGCTCTCGAGGTGACATTC	2
EBOV-400_14_RIGHT	CTCTCAGTCGAGGTAGGTTTTTCT	2
EBOV-400_16_LEFT	ATGACACCATCGACCATGCCA	2
EBOV-400_16_RIGHT	TCATCGGTCCATGTTGCAGC	2
EBOV-400_18_LEFT	AGATCGTTCCAATTGATCCAACCA	2
EBOV-400_18_RIGHT	TGAGTCTTTTGTTAAGTTCTACATTTAGGA	2
EBOV-400_20_LEFT	GGTTGTTCACCATCCAAGTACAGA	2
EBOV-400_20_RIGHT	AGTCCAACTGATCTCAATTGATTTGT	2
EBOV-400_22_LEFT	TGCACAAAGTATCAGGAACGGG	2
EBOV-400_22_RIGHT	AGTTTTCCCGTGGTATTGCTCC	2
EBOV-400_24_LEFT	GCAATGGTTCAAGTGCACAGTC	2

primer name	primer sequence	pool
EBOV-400_24_RIGHT	GGTAATTAAGCCTAGCTTCCCGC	2
EBOV-400_26_LEFT	TGGCCAACGAGACGACTCAA	2
EBOV-400_26_RIGHT	TGATTTGAGGCTGAACTTTGCC	2
EBOV-400_28_LEFT	CCTTGATTCTACAATCATGACAGTTGT	2
EBOV-400_28_RIGHT	TTTTTCAAGGTCGGACATATGTCTTT	2
EBOV-400_30_LEFT	GGCGAGACAAGACATCAGAACC	2
EBOV-400_30_RIGHT	CCCTCATCAGACCATGAGCATG	2
EBOV-400_32_LEFT	TCGCTCGTAATATAACCTGCCA	2
EBOV-400_32_RIGHT	GGACTACCCTGGAATAGTACTTTGC	2
EBOV-400_34_LEFT	GAACATCACTTTGAGCGCCCTC	2
EBOV-400_34_RIGHT	ACAGCGGTGATTCAATTGTGGA	2
EBOV-400_36_LEFT	ACATGTCGTGAACTACAACGGA	2
EBOV-400_36_RIGHT	GCTGGCTTACGGTGAGGATTTA	2
EBOV-400_38_LEFT	CATGTGTTAGGTTTCACAGATTCTATATATTAC	2
EBOV-400_38_RIGHT	CAGTGCCTTGAGAAGAATTGGGA	2
EBOV-400_40_LEFT	CGAAGGGGTAGATTAAACCGAGG	2
EBOV-400_40_RIGHT	ACCCATCAGACCCTAATATGGAGA	2
EBOV-400_42_LEFT	TTCAAAAACACTGGGGGCATCC	2
EBOV-400_42_RIGHT	TAGGCTCGAATACTGCATCCCA	2
EBOV-400_44_LEFT	ACTCGCAATGTTCAAACACTTTGT	2
EBOV-400_44_RIGHT	TCCCTCCCATATGACCCCTGTA	2
EBOV-400_46_LEFT	TGCCTGCGGAATCTTTTTAAAACC	2
EBOV-400_46_RIGHT	AAACATTTCTCAGGATTCAAGAAGGAT	2
EBOV-400_48_LEFT	ACCCTAAGTGCGAAAAACAAACT	2
EBOV-400_48_RIGHT	GGCTCCAATAAGAGGTCTTCCC	2
EBOV-400_50_LEFT	AATGTCCTTCCGCAGCCTTAAG	2
EBOV-400_50_RIGHT	TTGGATATCTGTAGCCTCAGTGTT	2
EBOV-400_52_LEFT	TATCTGGATGGGAGCTAGCCAA	2
EBOV-400_52_RIGHT	TAATCTGGCCGCATCTGAGAGT	2
EBOV-400_54_LEFT	TGTTTACACATGTAAGAGTACAGCCA	2
EBOV-400_54_RIGHT	ACGGTGTGAGATTATTTGATGACCT	2
EBOV-400_56_LEFT	TGACACTAGCAGAGGGAGAAGG	2
EBOV-400_56_RIGHT	CTTAGAAAGACTTTAAGGACCACTGC	2
EBOV-400_58_LEFT	TGGCTAAGTCATTTAACTCAGTATGC	2
EBOV-400_58_RIGHT	ACGTTCTTCACAATTGCAATCTCT	2
EBOV-400_60_LEFT	TCCGGATGGTCTCTACAGGTTT	2
EBOV-400_60_RIGHT	TTTGTTTTAAGAAGTCGTGTTATCAACC	2

Tableau 29 *: Summary of Bayesian Model Fitting Estimates*

Clock Model, 2020 Mbandaka Sequences	Loglikelihood Path Sampling		Loglikelihood Stepping Stone	
	Average	Standard Deviation	Average	Standard Deviation
Fixed Local Clock, Skygrid	-29192.6	1.0	-29192.5	1.2
Relaxed Clock (UCLN), constant population	-29186.4	0.6	-29186.6	0.8
Relaxed Clock (UCLN) - Skygrid	-29179.5	1.1	-29179.7	1.2
Strict Clock (UCLN) - Skygrid	-29192.1	0.7	-29192.3	0.9
Relaxed Clock (UCLN), exponential population	-29182.9	0.9	-29182.9	0.9

Bayes Factor - Path Sampling					
	FLC, Skygrid	Strict Clock, Skygrid	UCLN, constant	UCLN, Skygrid	UCLN, exponential
Fixed Local Clock, Skygrid		0.26	5.96	**12.87**	9.67
Relaxed Clock (UCLN), constant population	-0.26		5.70	**12.61**	9.41
Relaxed Clock (UCLN) - Skygrid	-5.96	-5.70		**6.91**	3.71
Strict Clock (UCLN) - Skygrid	-12.87	-12.61	-6.91		-3.20
Relaxed Clock (UCLN), exponential population	-9.67	-9.41	-3.71	**3.20**	

Bayes Factor - Stepping Stone					
	FLC, Skygrid	Strict Clock, Skygrid	UCLN, constant	UCLN, Skygrid	UCLN, exponential
Fixed Local Clock, Skygrid		0.39	6.07	**13.02**	9.60
Relaxed Clock (UCLN), constant population	-0.39		5.68	**12.63**	9.21
Relaxed Clock (UCLN) - Skygrid	-6.07	-5.68		**6.95**	3.52
Strict Clock (UCLN) - Skygrid	-13.02	-12.63	-6.95		-3.42
Relaxed Clock (UCLN), exponential population	-9.60	9.21	-3.52	**3.42**	

Tableau 30 *: Summary of Sequencing Results and Metadata*

Genbank Accession Number	EPI ID	*Zaire Ebolavirus* variant	ID Labo	Sampling Type	Province	Health zone	Onset Date	Sampling Date	CT Xpert GP	CT Xpert NP	Coverage	NTC Coverage	Sequencing Date	Platform	Pipeline
OR084849	RDCEQT000008	Mbandaka	MBK-0003-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-05-26	2020-05-31	26.4	21.6	99.9%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084850	RDCEQT000010	Mbandaka	MBK-0019-20	2nd sampling	Equator	Mbandaka	2020-05-28	2020-05-31	24.5	20.3	99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084851	RDCEQT000016	Mbandaka	MBK-0001-20		Equateur	Mbandaka	2020-05-19				99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084852	RDCEQT000017	Mbandaka	MBK-0018-20	1st sampling	Equator	Wangata	2020-05-27	2020-06-02	24.3	18.6	99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084853	RDCEQT000018	Mbandaka	MBK-0021-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-05-26	2020-06-03	28.1	24.7	99.9%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084854	RDCEQT000019	Mbandaka	MBK-0024-20	1st sampling	Equator	Wangata	2020-05-26		23.7	19.1	96.6%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084848	RDCEQT000029	Tumba	BIK-0014-20	1st sampling	Equator	Iboko	2020-06-15	2020-06-18	39.8	37.7	75.7%		2020-07-20	Illumina	iVAR
OR084855	RDCEQT000042	Mbandaka	BIK-0007-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-07	2020-06-17	28.7	23.1	96.5%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084856	RDCEQT000046	Mbandaka	BIK-0001-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-07	2020-06-10	24.8	20.6	98.0%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084857	RDCEQT000074	Mbandaka	MBK-0043-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-05-31	2020-06-06	24.3	20	99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084846	RDCEQT000151	Tumba	MBK-0067-20	1st sampling	Equator	Iboko	2020-06-04	2020-06-12	35.1	32.4	96.3%	26.8%	2020-07-07	Illumina	iVAR
OR084847	RDCEQT000199	Tumba		1st sampling	Equator	Iboko	2020-06-16	2020-06-18	35.6	34.6	83.8%		2020-07-20	Illumina	iVAR
OR084858	RDCEQT000227	Mbandaka	MBK-0092-20	1st sampling	Equator	Bolomba	2020-06-05	2020-06-15	34.3	30.2	92.3%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084859	RDCEQT000299	Mbandaka	MBK-0134-20	2nd sampling	Equator	Bolomba	2020-05-28	2020-06-20	30.2	25.8	99.8%	0.0%	2021-11-19	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084928	RDCEQT000300	Mbandaka	MBK-0110-20		Equateur	Bolomba	2020-06-06				99.8%	0.0%	2021-11-19	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084860	RDCEQT000301	Mbandaka	MBK-0096-20	1st sampling	Equator	Bolomba	2020-06-08	2020-06-16	36.6	33.3	91.0%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084861	RDCEQT000456	Mbandaka	BIK-0008-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-15		28.2	22.5	97.6%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084862	RDCEQT000458	Mbandaka	BIK-0019-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-17	2020-06-21	26.1	21.1	96.5%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084863	RDCEQT000474	Mbandaka	BIK-0076-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-22	2020-06-29	24.6	19.1	92.3%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084864	RDCEQT000492	Mbandaka	BIK-0118-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-22	2020-07-03	28.4	22.4	93.4%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084865	RDCEQT000514	Mbandaka	BIK-0039-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-22	2020-06-24	30.6	25.7	94.9%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic

Genbank Accession Number	EPI ID	*Zaire Ebolavirus* variant	ID Labo	Sampling Type	Province	Health zone	Onset Date	Sampling Date	CT Xpert GP	CT Xpert NP	Coverage	NTC Coverage	Sequencing Date	Platform	Pipeline
OR084866	RDCEQT000571	Mbandaka	MBK-0138-20		Equateur	Wangata	2020-06-17				99.9%	0.0%	2021-11-19	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084867	RDCEQT000616	Mbandaka	BIK-0072-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-21	2020-06-28	31.8	26.6	92.3%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084868	RDCEQT000617	Mbandaka	BIK-0074-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-26	2020-06-29	28.8	23.2	94.9%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084869	RDCEQT000796	Mbandaka	MBK-0168-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-06-18	2020-06-25	30.2	25.6	98.9%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084870	RDCEQT000869	Mbandaka	MBK-0255-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-06-23	2020-06-30	28.5	24.7	87.8%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084871	RDCEQT002101	Mbandaka	MBK-0859-20	1st sampling	Equator	Bolomba	2020-07-11		37.3	33.6	90.7%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084872	RDCEQT002103	Mbandaka	MBK-0953-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-07-10		29.3	26.5	98.0%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084873	RDCEQT002106	Mbandaka	MBK-0727-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-07-06	2020-07-13	24.6	19.6	98.0%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084874	RDCEQT002107	Mbandaka	MBK-0908-20	1st sampling	Equator	Lotumbe	2020-07-02	2020-07-12	30.1	24.8	96.6%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084875	RDCEQT002111	Mbandaka	BIK-0294-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-07-12	2020-07-14	32.1	27	98.0%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084876	RDCEQT002112	Mbandaka	MBK-0829-20	1st sampling	Equator	Bolomba	2020-07-05		38.2	32.3	90.7%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084877	RDCEQT002113	Mbandaka	BIK-0183-20		Equateur	Bikoro	2020-07-01				74.1%	0.0%	2021-11-19	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084878	RDCEQT002117	Mbandaka	BIK-0446-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-07-13	2020-07-23	32.1	26.8	98.0%	0.0%	2020-10-15	Minion	Artic
OR084879	RDCEQT002118	Mbandaka	BIK-0425-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-07-16	2020-07-21	26.6	21	80.0%	0.0%	2020-10-15	Minion	Artic
OR084880	RDCEQT002119	Mbandaka	MBK-1147-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-07-12	2020-07-20	27.9	25	92.0%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084881	RDCEQT002121	Mbandaka	MBK-1204-20	1st sampling	Equator	Bolomba	2020-07-14	2020-07-20	41.7	35.2	89.3%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084882	RDCEQT002122	Mbandaka	BIK-0575-20		Equator	Bikoro	2020-07-18	2020-07-27	29.7	24.5	98.0%	0.0%	2020-10-15	Minion	Artic
OR084883	RDCEQT002123	Mbandaka	BLB-0070-20		Equator	Bolomba	2020-07-11			32.1	93.7%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084884	RDCEQT002124	Mbandaka	MBK-1498-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-07-25	2020-07-28	30.3	27.3	91.2%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084885	RDCEQT002125	Mbandaka	MBK-1488-20	1st sampling	Equator	Lotumbe	2020-07-21		35.2	30.2	98.5%	0.0%	2021-11-12	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084886	RDCEQT002127	Mbandaka	MBK-1599-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-07-18		36.2	33.2	89.8%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084887	RDCEQT002128	Mbandaka	MBK-1807-20	1st sampling	Equator	Lilanga Bobangi	2020-08-02		35.4	32.7	92.0%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084888	RDCEQT002129	Mbandaka	MBK-1658-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-08-01		32.4	30.1	99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh

Genbank Accession Number	EPI ID	*Zaire Ebolavirus* variant	ID Labo	Sampling Type	Province	Health zone	Onset Date	Sampling Date	CT Xpert GP	CT Xpert NP	Coverage	NTC Coverage	Sequencing Date	Platform	Pipeline
OR084889	RDCEQT002130	Mbandaka	MBK-1662-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-08-01		33.8	30.7	96.5%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084890	RDCEQT002132	Mbandaka	MBK-1715-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-08-01		34.9	31.7	84.8%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084891	RDCEQT002134	Mbandaka	MBK-1818-20	1st sampling	Equator	Ingende	2020-08-01		36.6	34.1	88.5%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084892	RDCEQT002135	Mbandaka	BIK-1168-20		Equator	Bikoro	2020-08-03		28.2	23.1	93.5%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084893	RDCEQT002136	Mbandaka	BIK-1128-20		Equator	Bikoro	2020-08-02		33.4	28.1	90.7%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084894	RDCEQT002137	Mbandaka	BIK-1138-20		Equator	Bikoro	2020-08-03				93.5%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084895	RDCEQT002138	Mbandaka	MBK-1969-20		Equator	Lilanga Bobangi	2020-08-09		31.3	25	94.9%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084896	RDCEQT002139	Mbandaka	MBK-1958-20		Equator	Lolanga Mampoko	2020-08-02		31.4	24.8	98.0%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084897	RDCEQT002140	Mbandaka	BIK-1434-20		Equator	Bikoro	2020-08-05	2020-08-15	28.4	23.2	99.4%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084898	RDCEQT002141	Mbandaka	MBK-2055-20		Equateur	Lotumbe	2020-08-01				99.9%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084931	RDCEQT002143	Mbandaka	MBK-2247-20	2nd sampling	Equator	Lotumbe	2020-08-09	2020-08-19	35.6	31.8	97.8%	20.6%	2020-09-11	Minion	Artic
OR084899	RDCEQT002144	Mbandaka	MBK-2080-20		Equator	Lolanga Mampoko	2020-08-05	2020-08-12	29.3	24.5	99.4%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084900	RDCEQT002145	Mbandaka	MBK-2081-20		Equator	Lolanga Mampoko	2020-08-05	2020-08-12	30.9	26.6	96.0%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084901	RDCEQT002146	Mbandaka	MBK-2021-20		Equator	Mbandaka	2020-08-04		24.2	21.4	96.6%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084929	RDCEQT002148	Mbandaka	MBK-2099-20		Equateur	Lotumbe	2020-08-04				99.9%	0.0%	2021-11-12	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084902	RDCEQT002149	Mbandaka	MBK-2154-20		Equator	Lolanga Mampoko	2020-08-10		28.3	24.2	99.4%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084903	RDCEQT002151	Mbandaka	MBK-2190-20		Equator	Bolenge	2020-08-02	2020-08-13	38.9	30.5	96.4%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084904	RDCEQT002152	Mbandaka	MBK-2171-20		Equator	Lotumbe	2020-08-16	2020-08-16	34.4	29.1	98.0%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084905	RDCEQT002153	Mbandaka	BIK-1631-20		Equator	Bikoro	2020-08-09	2020-08-21	34.4	29.4	87.9%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084906	RDCEQT002154	Mbandaka	MBK-2308-20		Equator	Lilanga Bobangi	2020-08-21	2020-08-22	33.5	29.5	93.6%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084907	RDCEQT002155	Mbandaka	MBK-2307-20		Equator	Lilanga Bobangi	2020-08-15	2020-08-21	33.6	29.7	93.6%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084908	RDCEQT002156	Mbandaka	MBK-2135-20		Equator	Ingende	2020-08-10	2020-08-16	38.4	34.9	86.5%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084909	RDCEQT002159	Mbandaka	BIK-1765-20		Equator	Bikoro	2020-08-13	2020-08-25	26.2	20.5	96.1%	0.0%	2020-09-05	Minion	Artic
OR084910	RDCEQT002163	Mbandaka	MBK-2551-20	1st sampling	Equator	Bomongo	2020-08-21		31	26.8	99.9%	0.0%	2021-11-12	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh

Genbank Accession Number	EPI ID	*Zaire Ebolavirus* variant	ID Labo	Sampling Type	Province	Health zone	Onset Date	Sampling Date	CT Xpert GP	CT Xpert NP	Coverage	NTC Coverage	Sequencing Date	Platform	Pipeline
OR084911	RDCEQT002164	Mbandaka	MBK-2594-20	1st sampling	Equator	Lotumbe	2020-08-31	2020-09-03	38.2	34.2	99.4%	0.0%	2020-10-15	Minion	Artic
OR084926	RDCEQT002168	Mbandaka	MBK-2627-20	1st sampling	Equator	Bomongo	2020-08-28	2020-09-03	34	30.3	96.7%	0.0%	2020-09-18	Minion	Artic
OR084925	RDCEQT002169	Mbandaka	MBK-2620-20	1st sampling	Equator	Lolanga mampoko	2020-08-20	2020-08-23	34.1	30.4	92.4%	0.0%	2020-09-18	Minion	Artic
OR084924	RDCEQT002170	Mbandaka	MBK-2609-20	1st sampling	Equator	Lolanga mampoko	2020-08-20		34.9	31.3	92.7%	0.0%	2020-09-18	Minion	Artic
OR084927	RDCEQT002171	Mbandaka	MBK-2585-20	1st sampling	Equator	Lotumbe	2020-09-01	2020-09-06	35.8	32.5	99.4%	0.0%	2020-10-15	Minion	Artic
OR084912	RDCEQT002501	Mbandaka	MBK-0977-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-06-07	2020-07-19	28.7	24.8	93.7%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084913	RDCEQT002502	Mbandaka	MBK-0984-20	1st sampling	Equator	mbandaka	2020-07-09		30.5	27.1	93.7%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084914	RDCEQT002614	Mbandaka	MBK-1243-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-07-20	2020-07-22	28.4	24.8	99.4%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084915	RDCEQT003001	Mbandaka	MBK-0396-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-06-28		26.7	23.3	99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084916	RDCEQT003006	Mbandaka	BIK-0102-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-26	2020-07-02	24.9	19.4	94.9%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084930	RDCEQT003007	Mbandaka	MBK-2175-20		Equateur	Lotumbe	2020-07-27				98.8%	0.0%	2021-09-27	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084917	RDCEQT003008	Mbandaka	MBK-0454-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-06-23	2020-07-06	17.5	13.5	76.5%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084918	RDCEQT003011	Mbandaka	BIK-0042-20	1st sampling	Equator	bikoro	2020-06-23		28.9	23.5	94.9%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084919	RDCEQT003013	Mbandaka	MBK-0221-20	2nd sampling	Equator	bolomba	2020-06-19	2020-06-26	33.5	28.1	97.7%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084920	RDCEQT003014	Mbandaka	MBK-0228-20	1st sampling	Equator	Bolomba	2020-06-17	2020-06-26	35.3	30.4	99.7%	0.0%	2021-09-22	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084921	RDCEQT003018	Mbandaka	MBK-0299-20	1st sampling	Equator	Mbandaka	2020-06-26	2020-07-01	23.9	21.3	99.9%	0.0%	2021-09-23	Illumina	EBOV_assemble_genomes.sh
OR084922	RDCEQT003019	Mbandaka	BIK-0094-20	1st sampling	Equator	Bikoro	2020-06-29		26.3	20.7	82.0%	0.0%	2020-09-04	Minion	Artic
OR084923	RDCEQT003256	Mbandaka	MBK-2001-20		Equator	Monieka	2020-08-03		31.1	27.1	96.5%	0.0%	2020-09-02	Minion	Artic
OR084932	RDCEQT009903	Mbandaka	MBK-3154-20		Equator	Makanza	2020-09-16		29.5	25.7	79.8%	0.0%	2020-10-15	Minion	Artic

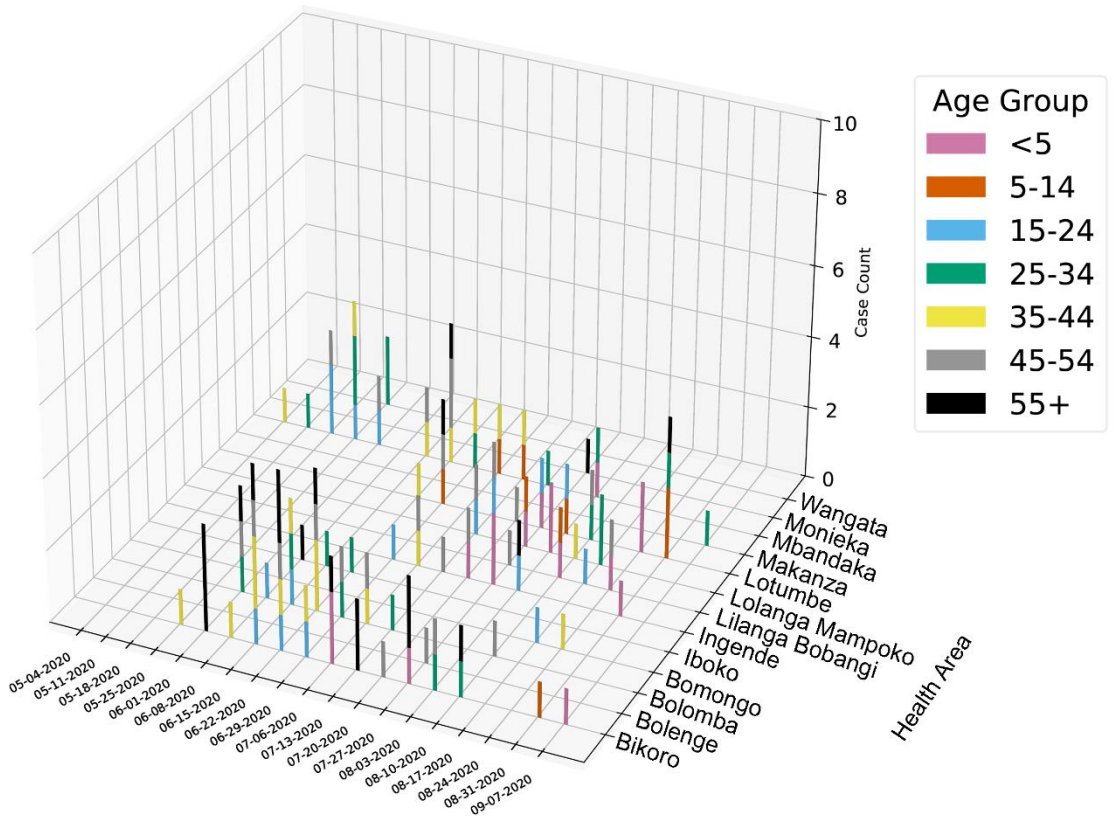


Figure 73 *: Distribution of EVD cases by week of symptom onset (x-axis), health area (y-axis) and age distribution (z-axis, and stacked bars).*

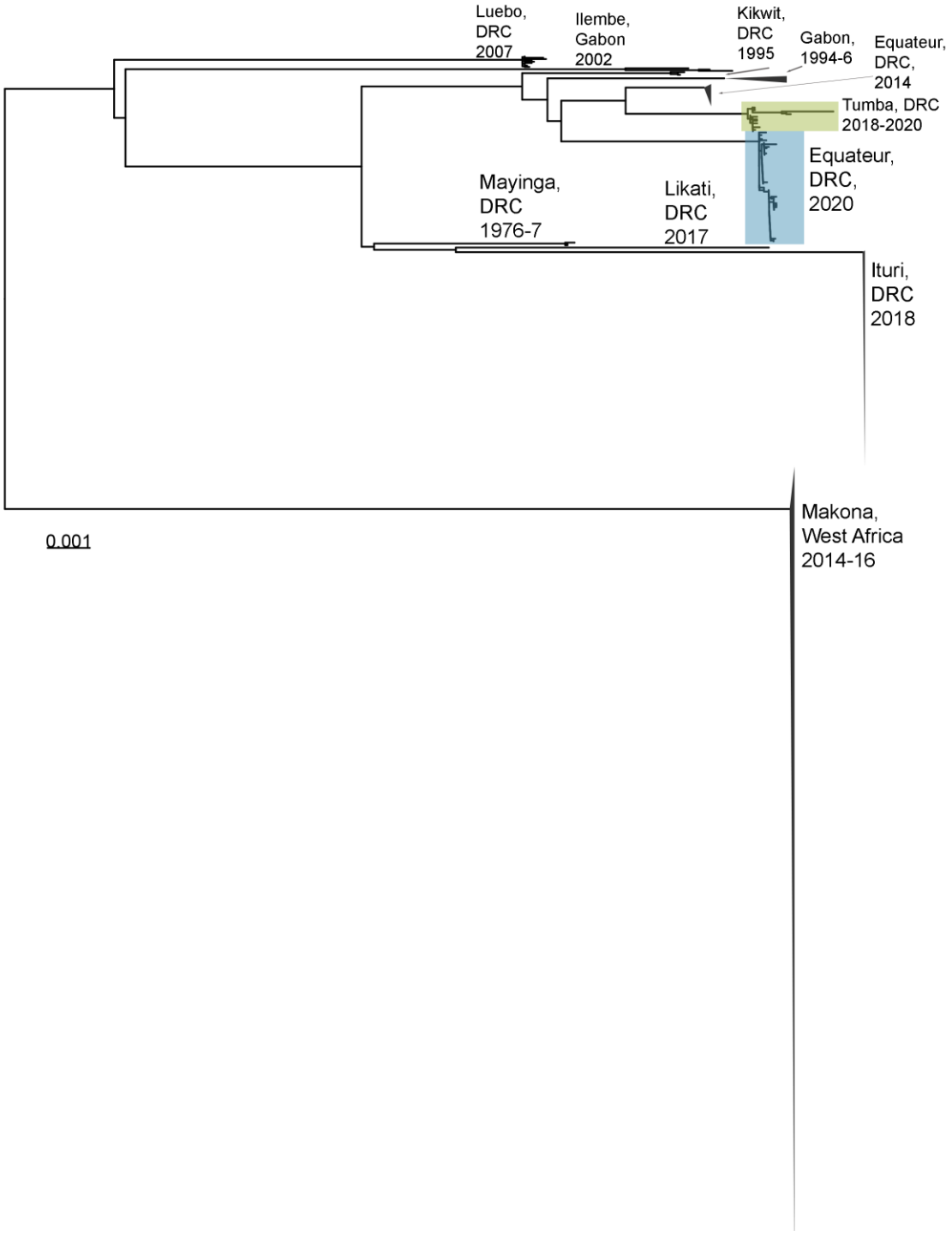


Figure 74 *: Inferred evolutionary relationships for the Zaire ebolavirus species. Genomes from historic EBOV outbreaks (n=837) and the Equateur outbreak (n=87) are included in the midpoint-rooted maximum likelihood tree.*

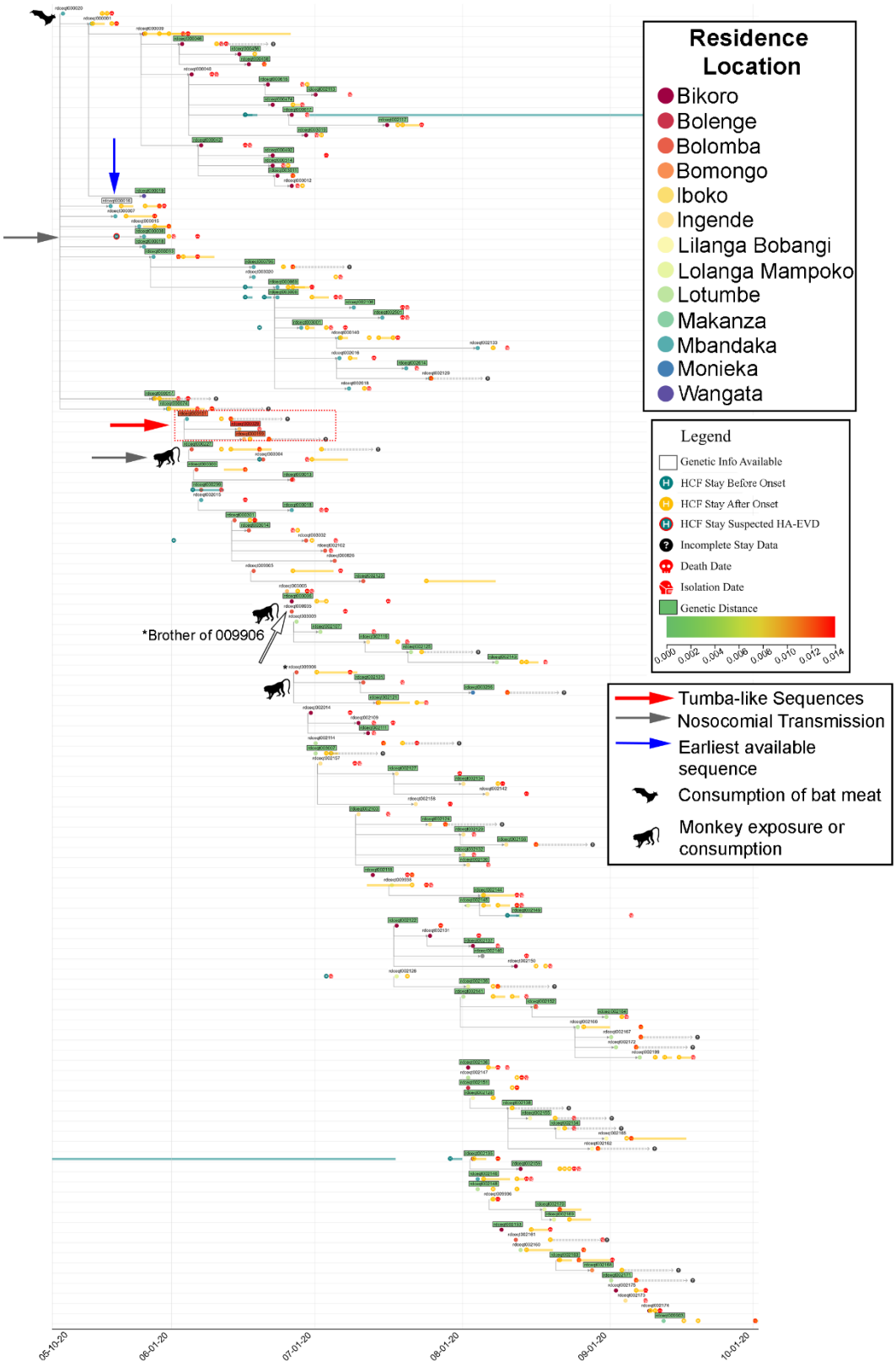


Figure 75 : *Comprehensive overview of Equateur outbreak incorporating all available epidemiological data and genetic data.*

Discussion générale et conclusion

Au début de notre thèse, l'objectif global de notre travail était de fournir de nouvelles informations sur les virus avec une forte probabilité d'émergence zoonotique afin d'évaluer le risque d'épidémies supplémentaires et la propagation mondiale et de fournir des informations pour les futures stratégies de diagnostic, de traitement antiviral et de vaccin. L'accent devrait être mis sur les virus Ebola, les coronavirus, le MPXV et les arbovirus.

Quelques mois avant le début de notre thèse, deux épidémies de MVE ont été enregistré dans le monde dont la réermegence en Guinée en février 2021(Keita et al., 2021), soit 5 ans après la déclaration de fin de la grande épidémie de l'Afrique de l'Ouest ; et la réemergence au Nord – Kivu, 12ème épidémie de MVE en RDC ayant sévi de février à mai 2021(CDC, 2024a; Dembek et al., 2024). Durant les 3 années de thèse, la RDC a connu 3 épidémies de MVE, dont 2 à la partie Est du pays, dans la zone de santé de Beni, province du Nord-Kivu respectivement en d'octobre en décembre 2021 et d'août à septembre 2022 ; et une à la partie Ouest du pays dans la province de l'Equateur d'avril en juillet 2022 (CDC, 2024a). En outre, à ces émergences de MVE, s'est juxtaposé l'escalade du nombre de cas de mpox en RDC donnant lieu aux multiples alertes dans un contexte melant désastre sanitaire et humanitaire, et déclaré à 2 reprises USPPI, qui ont considérablement influencé le déroulement de notre travail, étant donné notre contribution dans la détection, véritable pierre angulaire dans la mise en place des stratégies de riposte face à ces menaces sanitaires, via le diagnostic et la caractérisation moléculaire.

Ainsi, nos 3 années de thèse ont débouché entre autres sur les résultats suivants :

1. L'intégration de la sérologie permet de fournir une meilleur appréciation de la circulation de la maladie mpox, et peut être utilisée en contexte d'épidémie, couvrant ainsi les limites de la biologie moléculaire actuellement utilisée en référence ; en effet,

les analyses sérologiques ont permis d'augmenter le taux de positivité de 33,7 % par PCR à 48,2 % lorsque la PCR et/ou la séropositivité sont prises en compte identifiant ainsi plusieurs zones de santé supplémentaires du pays et dans 24 alertes supplémentaires au mpox, ce qui a conduit à un total de 63,8 % d'alertes confirmées comme étant mpox comme cela a été le cas lors de l'épidémie de mpox à Masimanimba au Kwilu.

2. L'utilisation de la génomique en plus des investigations épidémiologiques au cours d'une épidémie est une source importante d'information sur l'évolution virale et fournit des réponses sur les dynamiques de transmission observés, à l'instar de

   i. l'épidémie Ebola de l'Équateur en 2020, où 2 variants ont été découvert qui co-circulent, révélant plusieurs mécanismes de propagation virale qui ont été identifiés, notamment zoonotique, nosocomiale, par contact étroit et par un survivant de la 9ème épidémie MVE (*souche Tumba*) infecté de manière persistante ; résolvant ainsi une bonne part de chaînes transmission isolées et permettant de donner une vue globale de la 11ème épidémie

   ii. ou de celle de mpox où a été démontré que la hausse du nombre de cas de mpox en RDC était subséquente des stigmates d'un double paradigme en évolution fait d'une part d'évènements de transmissions zoonotiques (interespèces) de façon prédominante à travers la RDC ces 5 dernières années, et d'autre part d'une lignée émergente caractérisée par une transmission interhumaine soutenue et qui se repand vite.

   iii. c'est dans ce cadre que nous avons contribué à décrire des variants ou groupes au-delà de la diversité décrite par Kugelman et al., Nakazawa et al. et Berthet et al., à savoir la nouvelle souche du clade I qui avait accumulé des mutations de type APOBEC3, suggérant une transmission interhumaine soutenue, signe d'une adaptation du virus à l'hôte, pour lequel nous avons proposé le

nomenclature « clade Ib », en accord avec les bonnes pratiques de nomenclature visant à éviter tous les éléments de stigmatisation relatif aux lieux d'émergence, et secondairement en analogie au clade II étant donné les clusters de transmission parmi les professionnels de sexe et le potentiel élevé de transmission observé à travers la détection des cas dans la province du Nord-Kivu et dans la province de Kinshasa ; les autres souches tombant dans la diversité connue étant nommé clade Ia

3. L'approche One Health intégrant plusieurs disciplines demeure une stratégie de choix pour aborder les problèmes de santé et défis posés par les zoonoses, telle que nous l'avons observé lors de l'une de nos investigations en réponse à des alertes dans la province de la Tshuapa qui a permis la mise en évidence de la cocirculation du MPXV et du SWPV

1. La sérologie en contexte épidémique liée aux maladies émergentes

1.1 Discussion des résultats

La sérologie activement utilisée dans les décennies passées pour la confirmation des épidémies, s'est vu être relegué en second plan face au développement croissant et innovant des techniques de biologie moléculaire plus sensibles et plus spécifiques. Les difficultés d'interprétation et les réactions croisées ont limitées son utilisation principale aux études de séroprévalence. Cependant, les limites de performance de biologie moléculaire, couplé à la difficulté d'accès aux soins fait que les patients en milieux ruraux réculés n'ont pas toujours accès en temps voulu aux soins, ou voient en premier les tradipraticiens ou chefs spirituels. L'une des approches innovantes en développent ces derniers qui pourrait rendre la sérologie plus utile est l'utilisation de la stratégie multiplex à l'aide de la technologie Luminex dont plusieurs tests ont été développé à l'unité TRANS-VIHMI (Ahidjo et al., 2020). Durant notre thèse, nous avons évalué un test sérologique multiplex qui a permis d'apprécier l'apport de la

sérologie dans un contexte d'émergence. Au lieu d'utiliser chaque antigène séparément comme dans les Elisa classiques, ou des critères plus stricts comme la réactivité à un minimum de deux antigènes, nous avons choisi d'utiliser la positivité à au moins un antigène pour déterminer la positivité et gagner en sensibilité, car ces peptides se sont déjà révélés spécifiques et comme recommandé par Dubois et ses collègues (Dubois et al., 2012). Notre étude a mis en évidence 66 échantillons de patients supplémentaires positifs pour le mpox, provenant de 14 zones de santé supplémentaires du pays et dans 24 alertes supplémentaires au mpox augmentant ainsi le taux de positivité de 33,7 % par PCR à 48,2 % lorsque la PCR et/ou la séropositivité sont prises en compte.

Plusieurs facteurs peuvent conduire à la négativité de la PCR tel que l'utilisation pour le diagnostic, du sang prélevé souvent après le pic virémique ou les conditions d'expédition et de stockage sous-optimales sur site. En outre, les conditions de température climatique équatoriale sous-optimales peuvent affecter à la fois la détection des anticorps et la détection moléculaire, par exemple des retards de 2 mois ont été observés pour certains échantillons dans notre étude. Ces facteurs logistiques, combinés à l'utilisation d'un long stockage des échantillons, pourraient avoir un impact sur l'intégrité des échantillons et la sensibilité des tests, rendant plus difficiles les estimations d'incidence et de prévalence. C'est particulièrement le cas pour les anticorps IgM qui sont plus sensibles à la température et nous avons donc utilisé la détection IgG dans notre test.

Le faible taux de positivité de la détection des anticorps suggère que, à ce stade précoce de la maladie, les taux d'anticorps IgG sont encore faibles et que la période de développement des anticorps IgG peut être variable et plus longue que quelques jours seulement après le début de l'éruption cutanée, comme indiqué précédemment (HCSP, 2022 ; Sklenovská, 2020 ; Traité de virologie médicale, 2019). La détection des immunoglobulines totales à l'aide de chaînes légères anti-kappa, au lieu d'anti-IgG, n'a pas amélioré le taux de détection (données non présentées). Même si l'ensemble des peptides utilisés pour la sérologie était la meilleure option

selon la littérature pour la spécificité, on ne peut exclure que la sensibilité soit trop faible. Aujourd'hui, seules des données limitées sont disponibles sur la dynamique des anticorps dans les infections à mpox au début de l'infection ainsi que sur leur durée à long terme, et d'autres études sont nécessaires de toute urgence.

1.2 Application en accompagnements aux investigations épidémiques

L'intégration de la sérologie a été appliquée pour une investigation à Masimanimba en mai 2022, une des nouvelles zones de santé en RDC, ayant notifié et confirmé des cas de mpox. L'enquête complétée par des tests sérologiques a révélé et confirmé les suspicions des investigations que le cas index n'était pas le premier patient atteint de mpox dans cette zone, c'est-à-dire le premier cas après l'événement de transmission zoonotique. Le cas index aurait probablement contracté la maladie par transmission interhumaine plutôt que par zoonose. Le cas index qui a alerté le système de santé a été confirmé pour l'infection à mpox par PCR sur le sang et les croûtes et le génome complet du virus a été séquencé, confirmant l'infection par un variant du clade I (groupe IV). Par conséquent, il est également très probable que le test sérologique de la personne contact trouvée guérie corresponde à des anticorps spécifiques de mpox. Ce patient ne s'est pas rendu au centre de santé, mais a utilisé la médecine traditionnelle et a donc été ignoré par le système national de surveillance. De plus, des cas cliniques suspects semblaient être présents dans la zone depuis la fin du mois de décembre 2021.

1.3 Perspectives : beaucoup reste à faire pour la sérologie

Nos travaux de thèse ont essayé de répondre au triple écueil posé par l'étude de la dynamique du mpox : (i) D'une part, la communication des cas sur la base des définitions de cas cliniques peut surestimer le nombre d'infections et, (ii) d'autre part, la confirmation en laboratoire par PCR uniquement et enfin (iii) les défis logistiques peuvent sous-estimer les taux d'infection. De plus, l'investigation documentée de Masimanimba a révélé que les cas de mpox qui alertent le système de santé peuvent déjà être des cas secondaires et ne sont donc pas toujours les cas index qui ont acquis la mpox après des transmissions zoonotiques. Il n'est donc

pas exclu que certaines épidémies ne soient pas reconnues. Au-delà des besoins de disposer de tests rapides et d'étendre le diagnostic proche des lieux d'émergence, des études de séroprévalence pour évaluer l'étendue des infections au mpox dans les zones et les pays endémiques sont également nécessaires. Par ailleurs, l'introduction et l'extension probable de la vaccination nécessite le développement des tests discriminatoires fiables pour le suivi des cohortes de guéris et l'évolution de l'immunité.

Enfin, le besoin de caractérisation génétique des souches du MPXV chez l'homme et dans la faune domestique et sauvage pour évaluer la proportion de transmissions humaines et zoonotiques est un autre effort crucial à maintenir dans le temps, initié dans la suite de nos travaux qui seront discutés dans les paragraphes suivants.

2. Apport de la génomique dans la gestion des épidémies

a. Evolution épidémiologique et génomique du mpox en RDC

L'épidémiologie changeante du mpox et sa dynamique sans cesse croissante à l'échelle globale avec l'émergence du clade IIb, a vu en quelque sorte son corrolaire en RDC avec de centaines d'alertes lancées au fil des ans tel que mentionné plus haut, et dont certaines ont été traitées dans le cadre de nos travaux. En plus, dans le contexte, de l'épidémie globale de 2022, la crainte d'introduction des cas de clade II pouvant mener à des phénomènes de recombinaison devrait être impérativement surveillée.

En premier, un groupe d'infections associées au MPXV clade I liées au contact sexuel en RDC, auparavant décrit seulement pour le MPXV clade II, bien que non exclusive au clade IIb et pouvant se produire lors de contacts hétérosexuels et homosexuels. Notre rapport a mis en évidence de multiples considérations essentielles en matière de santé mondiale qui doivent être prises en compte tel le soutien de l'engagement communautaire et la mobilisation des connaissances axés sur la reconnaissance de mpox et le signalement des faits entre les réseaux sexuels incluant spécifiquement les groupes spécifiques susceptibles de souffrir d'un manque

de soins ou d'une stigmatisation lorsqu'ils cherchent à obtenir des soins. Les mouvements de population et les voies de transmission non signalées auparavant pourraient exacerber la répartition mondiale du MPXV, ce qui pourrait être aggravé par le manque de tests de diagnostic réguliers ou de la disponibilité de tests rapides aux lieux d'émergence. Cette transmission sexuelle documentée au Kwango, a pris plus d'ampleurs à l'issu de l'épidémie ayant émergé dans la cité minière de Kamituga, densément peuplée et pauvre, avec des clusters de transmission parmi les professionnels de sexe.

Malgré la faible disponibilité d'informations cliniques et démographiques complètes sur les premiers patients, la revue retrospective a suggéré que la transmission de cette épidémie était principalement liée aux contacts sexuels à cause de 3 faits : (i) d'abord, la tranche d'âge la plus touchée constituée des adolescents et de jeunes adultes, contrairement aux tendances habituelles en RDC, où les enfants de < 15 ans étaient les plus touchés ; (ii) ensuite, une forte proportion des professionnels du sexe touchés ; et enfin,(iii) les dossiers hospitaliers indiquent que la plupart des cas présentaient des lésions génitales compatibles avec une infection virale.

Nos données confirment la transmission interhumaine dans les génomes du MPXV de Kamituga, ce qui confirme les résultats épidémiologiques de la transmission par contact sexuel. La situation à Kamituga a fait écho à l'épidémie de MPXV du clade IIb de 2017-2018 au Nigeria, et le retard dans la mise en place de mesures de contrôle et leur insuffisance ne peuvent à ce jour être rattrapés. Avec des déplacements fréquents entre Kamituga et la ville voisine de Bukavu, et des déplacements ultérieurs vers les pays voisins tels que le Rwanda et le Burundi, la propagation internationale du clade Ib, particulièrement préoccupante en raison de sa virulence plus élevée que celle du clade II, n'était qu'une question de temps. Le taux de létalité plus élevé que celui de l'épidémie mondiale du Clade IIb, mais inférieur à celui des épidémies actuelles du Clade Ia (4,6 % parmi les cas suspects signalés en RDC en 2024) pourrait être dû au fait que le clade Ib affecte plus souvent les adultes que le clade Ia. Cependant, des données récentes indiquent une évolution dans l'épidémiologie du clade Ib avec une augmentation de

la proportion de personnes atteintes parmi les enfants. Et l'investigation menée à Goma à la suite des premiers cas d'introductions du mpox a permis de mettre cela en évidence : elle a suggéré un lien possible entre l'un des cas de mpox et un récent voyage à Bukavu, chef -lieu de la province du Sud-Kivu. Les enquêtes sur les neuf cas confirmés de mpox dans cette étude ont permis d'identifier des contacts potentiels avec des infections symptomatiques non déclarées au sein des ménages, ce qui souligne la nécessité d'un plus grand engagement communautaire axé sur la reconnaissance des cas et la déclaration des cas suspects de mpox. De plus, les enquêtes sur les cas ont également révélé la possibilité de contacts entre les enfants par le biais d'aires de jeux communes. Compte tenu des cas identifiés dans le présent document chez les enfants et de la gravité disproportionnée de la maladie associée au mpox chez les enfants, une vigilance accrue devrait être prise pour informer les communautés des risques potentiels de mpox chez les enfants. Le conflit en cours dans la région pourrait également avoir un impact sur les efforts de confinement et d'atténuation de la circulation du MPXV à Mudja, compte tenu du potentiel de transmission ultérieure parmi les résidents actuels, ainsi que de nouvelles introductions du virus par le biais d'infections non diagnostiquées. Notre enquête a également démontré que les risques d'infection pour le groupe Ib du MPXV récemment identifié s'étendent au-delà des contacts sexuels (intimes) pour inclure les soignants et les enfants ainsi que les adultes. Pris ensemble, ces facteurs créent un goulet d'étranglement critique pour la réponse aux urgences de santé publique, rappelant ceux rencontrés dans la région lors de l'épidémie de maladie à virus Ebola en 2018-2020. Alors que la RDC est déjà confrontée à de nombreux obstacles en matière de santé publique, notamment des difficultés économiques et de développement extrême, ces impacts sont encore plus élevés dans les sites de déplacement interne (camps). La convergence des ressources limitées au sein de ces sites, notamment l'accès aux soins de santé, à l'assainissement, à l'eau potable et à la nourriture, ainsi que la surpopulation, pourrait faciliter la circulation rapide du mpox et étendre cette épidémie à une crise humanitaire plus large. Par conséquent, le risque élevé d'une nouvelle expansion de

l'épidémie de mpox à l'échelle nationale et internationale doit être considéré comme un problème urgent et une priorité pour toutes les parties prenantes. Il s'agissait d'hommes et de femmes adultes, ainsi que d'enfants, qui ont été infectés par le MPXV par diverses voies de transmission, y compris des contacts étroits non sexuels. Notre analyse démontre la poursuite de l'expansion du clade Ib MPXV et l'identification de premiers cas au sein d'un site de personnes déplacées, mettant en évidence les inquiétudes quant à l'expansion rapide de l'épidémie parmi les populations très vulnérables.

Ce risque de propagation international, par ailleurs exacerbé en raison de la proximité par les phénomènes de déplacements massifs de population dus aux conflits armés, rappelle les émergences en Soudan et en République du Congo.

La proximité des villes telles que Bukavu ou Goma avec les frontières internationales avec les pays d'Afrique de l'Est et les fréquents mouvements transfrontaliers non surveillés ont contribué à expliquer l’extension rapide du clade Ib au Rwanda, en Ouganda, au Kenya et au Burundi où la tendance est actuellement à la hausse. L'introduction de clade Ib dans les grands centres urbains de la RDC, notamment Bukavu (population urbaine >1 million) et Goma (population urbaine ~2 millions) et plus tard Kisangani, Kalémie et Kinshasa (population urbaine ~15 millions), augmente encore le risque d'impacts plus importants sur la santé publique de l'épidémie en cours, qui a déjà largement dépassé l'ampleur des épidémies précédentes dans les régions endémiques. Ce risque est encore aggravé par le rôle des villes comme Goma ou Kinshasa en tant que plaque tournante commerciale majeure et points de connexion régional et international, y compris le transport aérien.

La situation de Kinshasa reste particulière : nous avons effectué une description de la co-circulation des deux sous-clades Ia et Ib, parmi cinq cas détectés dans la zone de santé de Limete. Alors que le premier cas de clade Ib décrit a été détecté en juillet 2024, les premiers cas à Kinshasa ont été documenté par la sérologie en 2022, et caractérisés moléculairement en août 2023. Les résultats de cette caractérisation ont été compilé dans la documentation de la

diversité génomique du MPXV en RDC de 2018 à 2024 qui a fourni un aperçu des facteurs potentiels sous-jacents à l'augmentation des cas de mpox en RDC. Cette étude ayant généré un total de 348 génomes quasi complets (> une couverture génomique de 90 %) du MPXV issus de 337 personnes et de 14/26 provinces, a montré que la quasi-totalité (95 %) des nouvelles souches appartiennent au clade Ia, dans lequel une grande diversité génétique est observée. La plupart des nouvelles souches du clade Ia appartenaient au groupe II décrit précédemment, qui comprend également les souches de Kinshasa. De nouveaux groupes ont également été identifié comparativement à ceux décrits par Kugelman et al., Nakazawa et al. et Berthet et al.(Berthet et al., 2021 ; Nakazawa et al., 2015 ; Kugelman, 2014). En plus, ces données renferment des génomes isolés d'évènements notables dans croissance du nombre de cas et l'expansion de l'aire géographique du mpox en RDC, à savoir :

(i) un échantillon de l'épidémie de Kiri en janvier 2020 qui avait occasionné des décès et ayant poussé les investigateurs à suspecter Ebola, dans une période où le pays continuait de faire face à la 10ème épidémie MVE ; c'est après analyses métagénomiques qu'il a été mis en évidence le mpox dans ces échantillons et cette caractérisation a permis la mise en marche des mesures de riposte et de sensibilisation communautaire adéquate dans une zone où la maladie réémergeait après une période de silence

(ii) des échantillons du Maniema de la zone de santé de Tunda, qui ne notifiait pas de cas et qui a vu l'émergence d'une épidémie qui s'est propagé jusqu'à Kindu, le chef -lieu de la province et continue de sévir à ce jour ; après caractérisation , les souches ont été considéré comme appartenant au Groupe IV du clade Ia.

(iii) Et bien d'autres échantillons incluant celui de Masimanimba, ceux du Sud-Ubangi (Mbaya), du Kwango, de la Tshope et des autres provinces ; desquels plusieurs épidémies peuvent être décrites et histoires émergentielles racontées ;

En revanche, les nouvelles souches du clade Ib, toutes originaires de la province du Sud-Kivu en 2024, se regroupent dans la lignée unique, avec peu de diversité avec un enrichissement de mutations de type APOBEC3 (INRB, 2024 ; Masirika et al., 2024 ; Vakaniaki et al., 2024). Le faible nombre de mutations APOBEC3 observées dans le clade Ia suggère que la plupart des cas de mpox résultent d'introductions zoonotiques indépendantes dans la population humaine entre 2018 et debut 2024. Nous avons également montré que des lignées génétiquement diverses de MPXV peuvent co-circuler dans de petites zones géographiques au cours d'une même épidémie, suggérant de multiples introductions zoonotiques sur une courte période à partir d'une ou plusieurs espèces réservoirs. L'observation de certains groupes de mpox dans des zones endémiques avec un nombre légèrement accru de mutations APOBEC3 dans les génomes viraux suggère qu'il pourrait également y avoir une transmission humaine soutenue dans ces zones à partir de chaînes de transmission potentielles qui n'ont pas été détectées.

Le nombre croissant de cas de mpox signalés dans les provinces de la RDC autour du fleuve Congo et de ses affluents met en évidence les liens potentiels entre la propagation virale et les activités humaines autour de ces fleuves et reflète la possible présence généralisée du réservoir animal de ces variants. Les activités humaines auraient pu potentialiser l'introduction du MPXV dans de nouvelles zones de santé et zones urbaines, comme l'illustre l'introduction de plusieurs lignées à Kinshasa liées à des souches de MPXV originaires de zones endémiques en 2023. Ces événements doivent être surveillés de près, car ils représentent une menace majeure pour une dissémination régionale et internationale supplémentaire dans les zones densément peuplées. Ceci est particulièrement préoccupant compte tenu de la gravité accrue de la maladie associée au clade I MPXV par rapport au clade II (Americo et coll., 2010 ; Hutson et coll., 2010).

En RDC, le mpox est principalement causé par le clade Ia, traditionnellement associé à des événements de transmission zoonotiques. Cependant, à ce jour, s’observe une épidémie de

clade Ia à Kinshasa avec accumulation des mutations APOBEC, certainement une première pour ce clade. Mais la propagation inquiétante du clade Ib détecté à ce jour dans les provinces de Kinshasa, Kasaï, Tanganyika et Tshopo, en plus de Nord-Kivu et Sud-Kivu (cfr ***Figure 76*** ci-dessous) ; peut modifier la balance dans les jours à venir.

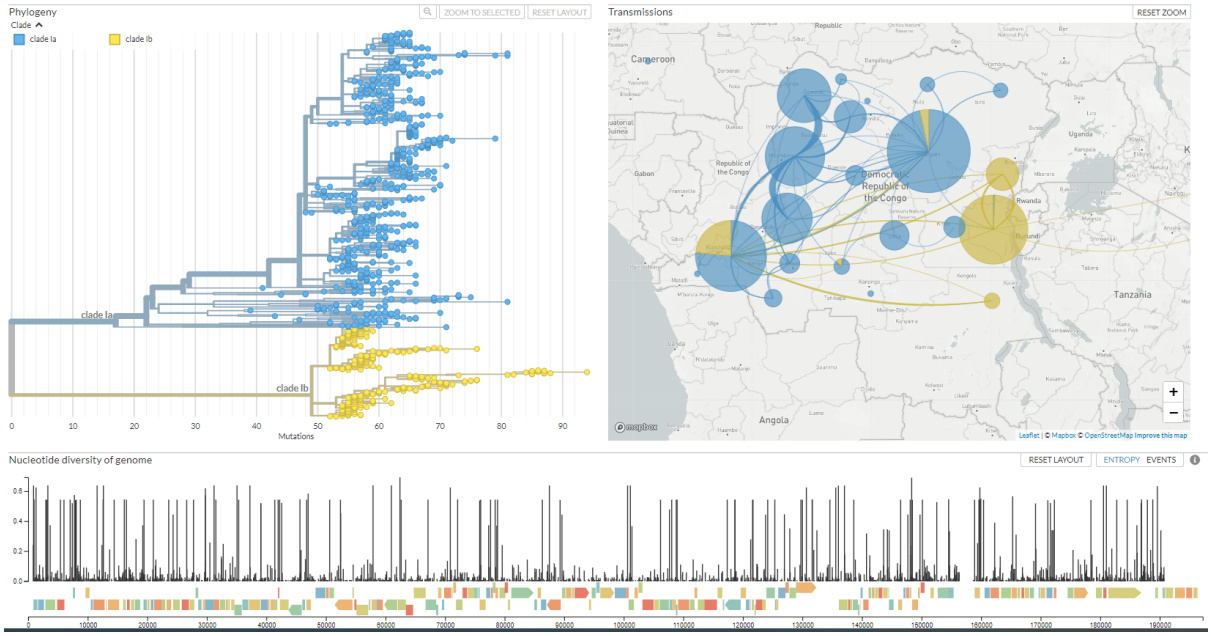


Figure 76 *: Mis à jour de l'analyse phylogéographique au 10 octobre 2024 montrant 1078 MPXV clade I (nextstrain.org)*

b. Perspecives sur la surveillance du mpox pendant et après USPPI

De ce qui précède, il est donc urgent de mieux documenter la nature et l'étendue des réservoirs animaux afin de comprendre si l'augmentation du nombre de cas résulte d'une augmentation des contacts directs avec des réservoirs naturels présumés, d'une augmentation de la prévalence de l'infection dans le réservoir animal, d'une augmentation des populations animales réservoirs, ou d'une combinaison de ceux-ci. De plus amples renseignements sont nécessaires sur les présentations cliniques du mpox causée par différents clades et sous-clades. Dans l'épidémie multinationale du clade IIb, des cas pauci- ou asymptomatiques ont été documentés (De Baetselier et al., 2022 ; Rosenthal, 2024). L'impact à long terme du mpox sur les séquelles cliniques, la dynamique virale dans les réservoirs animaux et la transmission interhumaine, les réponses immunitaires de l'hôte et la persistance de l'immunité humorale et/ou cellulaire au fil du temps doit également être documenté.

Au niveau national, il est urgent d'améliorer l'accès aux outils de diagnostic du mpox, de décentraliser les tests avec du matériel approprié dans les établissements de santé afin de permettre un échantillonnage sûr et adéquat des lésions cutanées pour le diagnostic moléculaire. La surveillance génomique et la caractérisation des clades et sous-clades du MPXV doivent être intensifiées, améliorées avec séquençage des régions extrêmes dictant les relations avec l'hôte, avec un partage rapide des séquences génomiques aux niveaux régional et international. Néanmoins, les défis logistiques, économiques et politiques de la surveillance génomique sont aussi importants que la RDC elle-même, avec des exigences pour accéder à des zones reculées et faire face aux problèmes de sécurité dans les zones de conflit.

c. Surveillance génomique dans les épidémies de MVE

Le séquençage a été mis en œuvre en RDC en 2018, année ayant connu successivement les 9ème et 10ème épidémies de MVE en RDC. La mise en œuvre du NGS en temps réel pendant une épidémie et combinée aux données épidémiologiques est essentielle pour relier rapidement les chaînes de transmission ou élucider celles qui paraissent incompréhensibles et ainsi orienter la prise des décisions et la rupture des chaînes de transmission.

Aussi, à l'instar de la 11ème épidémie ayant mis évidence la circulation du variant Tumba relatif à la 9ème épidémie et ayant émergé depuis un survivant, les 12ème, 13ème et 15ème épidémie ont également été caractérisé et la génomique a permis de mettre en évidence le lien avec la 10ème épidémie MVE. Par ailleurs, la 14ème épidémie a résulté d'une nouvelle introduction depuis un réservoir (***Figure 77***).



Figure 77 *: phylogénie par maximum de vraissemblance intégrant les souches de 15 épidémies de MVE*

3. Perspective recurrente : Importance de l’approche One Health

Enfin, il convient d’insister sur l’approche « Une Seule Santé » efficace dans la compréhension des zoonoses et pépinière d’émergences de lumières sur les mystères des zoonoses. Dans les environnements endémiques pour les agents pathogènes zoonotiques comme le MPXV ou EBOV, le rôle des réservoirs et des hôtes animaux doit être pris en compte dans la surveillance et le contrôle des épidémies. Au – delà de la documentation de la co-circulation avec du mpox et de la variole porcine spécifique dans une ferme, ils ont fournis beaucoup d’informations dans la gestion des épidémies Ebola. Les rapports faisant état de plusieurs poxvirus (virus de la vaccine, virus de la pseudocowpox et MPXV) circulant simultanément au sein d'une communauté sont rares et principalement confinés au Brésil(Oliveira et al., 2017). L'apparition de plusieurs poxvirus dans la même région souligne la nécessité de diagnostics sensibles et spécifiques, et d'une capacité de séquençage robuste pour caractériser ces agents. En plus du mpox, et maintenant de la variole porcine, la RDC a signalé des cas d'autres poxvirus : molluscum contagiosum et tanapox.

4. Conclusion

Plusieurs chroniques peuvent être racontées en RDC, la terre d'émergence, sur les épidémies successives qui, à ce jour attirent l'attention à l'échelle globale, mais demeurent négligées aux lieux d'émergence. Avec la mondialisation, les défis survenant dans une région de la planète sont susceptibles de se répandre très rapidement dans les autres parties, causant des méfaits sociétaux à l'échelle individuelle et impactant les communautés, surtout celles non résilientes. La pandémie Covid-19 en a été un exemple plus qu'éloquent. L'épidémie de l'Afrique de l'Ouest et celles du mpox ne devraient être ignorées. Ces 2 maladies détectées chez l'homme en RDC qui continue d'en payer le plus lourd tribut, demeurent mal gérées avec risque de les voir s'endémiser dans différentes régions du globe après qu'elles se soient répandues et adaptées dans les nouveaux écosystèmes. Les moyens thérapuetiques sont cours de développement et requièrent encore plusieurs évaluations. Les anticorps monoclonaux contre Ebola approuvés par la FDA ont besoin de satisfaire en continu les exigences post-marketing. Les essais cliniques du técovirimat n'ont pas démontré une efficacité nette contre le mpox. Néanmoins, les traitements de soutien demeurent une pierre angulaire dans la prise en charge des patients qui décèdent souvent suite à des comorbidités telles la malnutrition, d'autres maladies virales (rougeole), les sepsis à diverses portes d'entrée, … Et le fait que plusieurs épidémies naissent et meurent en passant inaperçus ne devrait pas nous rassurer, mais au contraire nous pousser à renforcer la surveillance tant dans la faune que chez l'homme. Et le premier jalon demeure le diagnostique qui est la torche de la lutte contre les épidémies et pandémies. A l'ère de l'innovation et des intelligences artificielles, les approches conventionnelles devraient être combinées ou adaptées aux technologies modernes et déployées dans les zones d'émergence afin de permettre une détection précoce pour une réponse rapide.

Valorisation des travaux de thèse

1. Use of mpox Multiplex Serology in the Identification of Cases and Outbreak Investigations in the Democratic Republic of the Congo (DRC). **Kinganda-Lusamaki E**, Baketana LK, Ndomba-Mukanya E, Bouillin J, Thaurignac G, Aziza AA, Luakanda-Ndelemo G, Nuñez NF, Kalonji-Mukendi T, Pukuta ES, Nkuba-Ndaye A, Lofiko EL, Kibungu EM, Lushima RS, Ayouba A, Mbala-Kingebeni P, Muyembe-Tamfum JJ, Delaporte E, Peeters M, Ahuka-Mundeke S. **Pathogens**. 2023 Jul 7;12(7):916. doi: 10.3390/pathogens12070916.PMID: 37513764 **Free PMC article.**
2. Clade I-Associated mpox Cases Associated with Sexual Contact, the Democratic Republic of the Congo. Kibungu EM, Vakaniaki EH, **Kinganda-Lusamaki E**, Kalonji-Mukendi T, Pukuta E, Hoff NA, Bogoch II, Cevik M, Gonsalves GS, Hensley LE, Low N, Shaw SY, Schillberg E, Hunter M, Lunyanga L, Linsuke S, Madinga J, Peeters M, Cigolo JM, Ahuka-Mundeke S, Muyembe JJ, Rimoin AW, Kindrachuk J, Mbala-Kingebeni P, Lushima RS; International mpox Research Consortium. **Emerg Infect Dis**. 2024 Jan;30(1):172-176. doi: 10.3201/eid3001.231164. Epub 2023 Nov 29. PMID: 38019211 **Free PMC article.**
3. Co-Circulating Monkeypox and Swinepox Viruses, Democratic Republic of the Congo, 2022. Kalonji T, Malembi E, Matela JP, Likafi T, **Kinganda-Lusamaki E**, Vakaniaki EH, Hoff NA, Aziza A, Muyembe F, Kabamba J, Cooreman T, Nguete B, Witte D, Ayouba A, Fernandez-Nuñez N, Roge S, Peeters M, Merritt S, Ahuka-Mundeke S, Delaporte E, Pukuta E, Mariën J, Bangwen E, Lakin S, Lewis C, Doty JB, Liesenborghs L, Hensley LE, McCollum A, Rimoin AW, Muyembe-Tamfum JJ, Shongo R, Kaba D, Mbala-Kingebeni P. **Emerg Infect Dis**. 2024 Apr;30(4):761-765. doi: 10.3201/eid3004.231413. PMID: 38526165 **Free PMC article.**
4. Presumed Transmission of 2 Distinct Monkeypox Virus Variants from Central African Republic to Democratic Republic of the Congo.Vakaniaki EH, **Kinganda-Lusamaki E**, Merritt S, Kasongo F, Malembi E, Lunyanga L, Linsuke S, Halbrook M, Kalthan E, Pukuta E, Aziza AA, Cigolo JCM, Lumembe R, Kabamba G, Anta Y, Bolunza P, Kanda I, Ngazobo R, Kalonji T, Nsio J, Matoka P, Mwamba D, Ngandu C, Shaw SY, Shongo R, Madinga J, Boum Y, Liesenborghs L, Delaporte E, Ayouba A, Low N, Mundeke SA, Hensley LE, Tamfum JM, Nakoune E, Peeters M, Hoff NA, Kindrachuk J, Rimoin AW, Mbala-Kingebeni P.**Emerg Infect Dis**. 2024 Oct;30(10):2128-2134. doi: 10.3201/eid3010.241118. Epub 2024 Aug 30. PMID: 39213261 **Free PMC article**
5. Sustained human outbreak of a new MPXV clade I lineage in eastern Democratic Republic of the Congo. Vakaniaki EH, Kacita C, **Kinganda-Lusamaki E**, O'Toole Á, Wawina-Bokalanga T, Mukadi-Bamuleka D, Amuri-Aziza A, Malyamungu-Bubala N, Mweshi-Kumbana F, Mutimbwa-Mambo L, Belesi-Siangoli F, Mujula Y, Parker E, Muswamba-Kayembe PC, Nundu SS, Lushima RS, Makangara-Cigolo JC, Mulopo-Mukanya N, Pukuta-Simbu E, Akil-Bandali P, Kavunga H,

Abdramane O, Brosius I, Bangwen E, Vercauteren K, Sam-Agudu NA, Mills EJ, Tshiani-Mbaya O, Hoff NA, Rimoin AW, Hensley LE, Kindrachuk J, Baxter C, de Oliveira T, Ayouba A, Peeters M, Delaporte E, Ahuka-Mundeke S, Mohr EL, Sullivan NJ, Muyembe-Tamfum JJ, Nachega JB, Rambaut A, Liesenborghs L, Mbala-Kingebeni P. **Nat Med**. 2024 Jun 13. doi: 10.1038/s41591-024-03130-3. Online ahead of print. PMID: 38871006

6. First imported Cases of MPXV Clade Ib in Goma, Democratic Republic of the Congo: Implications for Global Surveillance and Transmission Dynamics.Mukadi-Bamuleka D, **Kinganda-Lusamaki E**, Mulopo-Mukanya N, Amuri-Aziza A, O'Toole Á, Modadra-Madakpa B, Ndongala GM, Vakaniaki EH, Merritt S, Kacita C, Maboko GL, Makangara-Cigolo JC, Ngimba M, Lokilo E, Pukuta-Simbu E, Luakanda G, Bodisa-Matamu T, Kalimuli ZP, Akil-Bandali P, Kavira S, Jansen D, Kamaliro AK, Muhindo-Milonde E, Mufungizi J, Hamisi YB, Kavunga H, Tshiani O, Nundu SS, Liesenborghs L, Hoff NA, Nachega J, Shongo R, Ayouba A, Pilarowski G, Mangolopa AK, Ebondo AK, Low N, Shaw SY, Wilkinson S, Tessema SK, Subissi L, Delaporte E, Vercauteren K, Wawina-Bokalanga T, Rimoin AW, Peeters M, Loman N, Rambaut A, Muyembe-Tamfum JJ, Hensley LE, Kindrachuk J, Mbala-Kingebeni P, Ahuka-Mundeke S.**medRxiv [Preprint**]. 2024 Sep 16:2024.09.12.24313188. doi: 10.1101/2024.09.12.24313188.PMID: 39371169 **Free PMC article.** Preprint.
7. Co-circulation of monkeypox virus subclades Ia and Ib in Kinshasa Province, Democratic Republic of the Congo, July to August 2024. Wawina-Bokalanga T, Akil-Bandali P, **Kinganda-Lusamaki E**, Lokilo E, Jansen D, Amuri-Aziza A, Makangara-Cigolo JC, Pukuta-Simbu E, Ola-Mpumbe R, Muyembe M, Kacita C, Paku-Tshambu P, Dantas PH, Tshiani-Mbaya O, Luakanda G, Nkuba-Ndaye A, Matondo M, Vakaniaki EH, Tessema S, Ndembi N, O'Toole Á, De Block T, Ngandu C, Hoff NA, Low N, Subissi L, Merritt S, Muyembe-Tamfum JJ, Liesenborghs L, Peeters M, Delaporte E, Kindrachuk J, Rimoin AW, Ahuka-Mundeke S, Rambaut A, Mwamba D, Vercauteren K, Mbala-Kingebeni P**. Euro Surveill**. 2024 Sep;29(38). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2024.29.38.2400592.PMID: 39301745 **Free article.**
8. Clade I mpox virus genomic diversity in the Democratic Republic of the Congo, 2018 - 2024: Predominance of Zoonotic Transmission. **Eddy Kinganda-Lusamaki**, Adrienne Amuri-Aziza, Nicolas Fernandez, Jean-Claude Makangara-Cigolo, Catherine Pratt, Emmanuel Hasivirwe Vakaniaki, Nicole A. Hoff, Gradi Luakanda, Prince Akil-Bandali, Sabin Sabiti Nundu, Noella Mulopo-Mukanya, Michel Ngimba, Brigitte Modadra-Madakpa, Ruth Diavita, Princesse Paku, Elisabeth Pukuta-Simbu, Sydney Merritt, Áine O'Toole, Nicola Low, Antoine Nkuba-Ndaye, Hugo Kavunga-Membo, Robert Shongo, Laurens Liesenborghs, Tony Wawina-Bokalanga, Koen Vercauteren, Daniel Mukadi-Bamuleka, Lorenzo Subissi, Jean-Jacques Muyembe, Jason Kindrachuk, Ahidjo Ayouba, Andrew Rambaut, Eric Delaporte, Sofonias Tessema, Eric D'Ortenzio, Anne W. Rimoin, Lisa E. Hensley, Placide Mbala-Kingebeni, Martine Peeters, Steve Ahuka-Mundeke.

medRxiv 2024.08.13.24311951; doi: https://doi.org/10.1101/2024.08.13.24311951; **Cell (sous-presse)**

9. 2020 Ebola virus disease outbreak in Équateur Province, Democratic Republic of the Congo: a retrospective genomic characterisation. **Kinganda-Lusamaki E**, Whitmer S, Lokilo-Lofiko E, Amuri-Aziza A, Muyembe-Mawete F, Makangara-Cigolo JC, Makaya G, Mbuyi F, Whitesell A, Kallay R, Choi M, Pratt C, Mukadi-Bamuleka D, Kavunga-Membo H, Matondo-Kuamfumu M, Mambu-Mbika F, Ekila-Ifinji R, Shoemaker T, Stewart M, Eng J, Rajan A, Soke GN, Fonjungo PN, Otshudiema JO, Folefack GLT, Pukuta-Simbu E, Talundzic E, Shedroff E, Bokete JL, Legand A, Formenty P, Mores CN, Porzucek AJ, Tritsch SR, Kombe J, Tshapenda G, Mulangu F, Ayouba A, Delaporte E, Peeters M, Wiley MR, Montgomery JM, Klena JD, Muyembe-Tamfum JJ, Ahuka-Mundeke S, Mbala-Kingebeni P. **Lancet Microbe**. 2024 Feb;5(2):e109-e118. doi: 10.1016/S2666-5247(23)00259-8. Epub 2024 Jan 24. PMID: 38278165 **Free PMC article.**

Autres publications

1. Fatal meningoencephalitis associated with Ebola virus persistence in two survivors of Ebola virus disease in the Democratic Republic of the Congo: a case report study. Mukadi-Bamuleka D, Edidi-Atani F, Morales-Betoulle ME, Legand A, Nkuba-Ndaye A, Bulabula-Penge J, Mbala-Kingebeni P, Crozier I, Mambu-Mbika F, Whitmer S, Tshiani Mbaya O, Hensley LE, Kitenge-Omasumbu R, Davey R, Mulangu S, Fonjungo PN, Wiley MR, Klena JD, Peeters M, Delaporte E, van Griensven J, Ariën KK, Pratt C, Montgomery JM, Formenty P, Muyembe-Tamfum JJ, Ahuka-Mundeke S; Anja De Weggheleire, Gnakub N Soke, Raymond Pallawo, Gouressy Ibrahima, Victor Epaso Gelege, John Kombe-Ngwama, Grace Kahambwe-Ekoko, Mathias Mossoko Gbe, Pierre-Céleste Adikey Limne, Etienne Yuma-Kibondo, **Eddy Kinganda-Lusamaki**, Adrienne Amuri Aziza, Yannick Tutu Tshia N'kasar, Elias Mumbere Kalemekwa, Divine Kitsa-Mutsumbirwa, Noella Mulopo-Mukanya, Fyfy Mbelu-Matulu, Marie-Anne Kavira-Muhindo, Jacques Kwizera Sendegeya, Hugo Kavunga-Membo. **Lancet Microbe.** 2024 Sep 2:100905. doi: 10.1016/S2666-5247(24)00137-X. Online ahead of print. PMID: 39236738 Free article.
2. Implementation of the WHO core components of an infection prevention and control programme in two sub-saharan African acute health-care facilities: a mixed methods study. R Wood, W Tembele, A Hema, A Somé, **E Kinganda-Lusamaki**, C Basilubo 8, R Lumembe, N Alama, G Mbunsu , A Zongo , S Ahuka , J J Muyembe , F Leendertz , T Eckmanns , G Schubert , T Kagoné , S Makiala , S Tomczyk. Antimicrob Resist Infect Control. 2024 Jan 15;13(1):4. doi: 10.1186/s13756-023-01358-1. PMID: 38221629
3. Effect of anti-Ebola virus monoclonal antibodies on endogenous antibody production in survivors of Ebola virus disease in the Democratic Republic of the Congo: an observational cohort study. Nkuba-Ndaye A, Dilu-Keti A, Tovar-Sanchez T, Diallo MSK, Mukadi-Bamuleka D, Kitenge R,

Formenty P, Legand A, Edidi-Atani F, Thaurignac G, Pelloquin R, Mbala-Kingebeni P, Toure A, Ayouba A, Muyembe-Tamfum JJ, Delaporte E, Peeters M, Ahuka-Mundeke S; **Les Vainqueurs d'Ebola Study Group**. **Lancet Infect Dis**. 2024 Mar;24(3):266-274. doi: 10.1016/S1473-3099(23)00552-2. Epub 2023 Nov 30. PMID: 38043556

4. Lower Limb Paralysis Associated with Chikungunya in Kinshasa, the Democratic Republic of the Congo: Survey Report. Matungala-Pafubel M, Bulabula-Penge J, Matondo-Kuamfumu M, Esala S, Edidi-Atani F, Pukuta-Simbu E, Tshiminyi-Munkamba P, Tutu Tshia N'kasar Y, Katanga T, Ndomba-Mukanya E, Mbonga-Mande D, Baketana-Kinzonzi L, **Kinganda-Lusamaki E**, Mukadi-Bamuleka D, Mambu-Mbika F, Mbala-Kingebeni P, Nkwembe-Ngabana E, Nkuba-Ndaye A, Okitundu-Luwa D, Ahuka-Mundeke S. **Pathogens.** 2024 Feb 23;13(3):198. doi: 10.3390/pathogens13030198.PMID: 38535541 **Free PMC article.**
5. Sensitive poliovirus detection using nested PCR and nanopore sequencing: a prospective validation study. Shaw AG, Mampuela TK, Lofiko EL, Pratt C, Troman C, Bujaki E, O'Toole Á, Akello JO, Aziza AA, **Lusamaki EK**, Makangara JC, Akonga M, Lay Y, Nsunda B, White B, Jorgensen D, Pukuta E, Riziki Y, Rankin KE, Rambaut A, Ahuka-Mundeke S, Muyembe JJ, Martin J, Grassly NC, Mbala-Kingebeni P. **Nat Microbiol**. 2023 Sep;8(9):1634-1640. doi: 10.1038/s41564-023-01453-4. Epub 2023 Aug 17. PMID: 37591995 **Free PMC article**
6. Coronaviruses Are Abundant and Genetically Diverse in West and Central African Bats, including Viruses Closely Related to Human Coronaviruses. Meta Djomsi D, Lacroix A, Soumah AK, **Kinganda Lusamaki E**, Mesdour A, Raulino R, Esteban A, Ndong Bass I, Mba Djonzo FA, Goumou S, Ndimbo-Kimugu SP, Lempu G, Mbala Kingebeni P, Bamuleka DM, Likofata J, Muyembe Tamfum JJ, Toure A, Mpoudi Ngole E, Kouanfack C, Delaporte E, Keita AK, Ahuka-Mundeke S, Ayouba A, Peeters M. **Viruses.** 2023 Jan 25;15(2):337. doi: 10.3390/v15020337. PMID: 36851551 **Free PMC article.**
7. Added Value of an Anti-Ebola Serology for the Management of Clinically Suspected Ebola Virus Disease Patients Discharged as Negative in an Epidemic Context. Nkuba-Ndaye A, Mukadi-Bamuleka D, Bulabula-Penge J, Thaurignac G, Edidi-Atani F, Mambu-Mbika F, Danga-Yema B, Matondo-Kuamfumu M, **Kinganda-Lusamaki E**, Bisento N, Lumembe-Numbi R, Kabamba-Lungenyi G, Kitsa-Mutsumbirwa D, Kambale-Sivihwa N, Boillot F, Delaporte E, Mbala-Kingebeni P, Ayouba A, Peeters M, Ahuka-Mundeke S. **J Infect Dis**. 2022 Aug 24;226(2):352-356. doi: 10.1093/infdis/jiac057. PMID: 35176762 **Free PMC article.**
8. A Multidisciplinary Investigation of the First Chikungunya Virus Outbreak in Matadi in the Democratic Republic of the Congo. De Weggheleire A, Nkuba-Ndaye A, Mbala-Kingebeni P, Mariën J, Kindombe-Luzolo E, Ilombe G, Mangala-Sonzi D, Binene-Mbuka G, De Smet B, Vogt F, Selhorst P, Matungala-Pafubel M, Nkawa F, Vulu F, Mossoko M, Pukuta-Simbu E, **Kinganda-Lusamaki E**, Van Bortel W, Wat'senga-Tezzo F, Makiala-Mandanda S, Ahuka-Mundeke S. **Viruses.** 2021 Oct 3;13(10):1988. doi: 10.3390/v13101988. PMID: 34696418 **Free PMC article.**

9. Emergence and spread of SARS-CoV-2 lineage B.1.620 with variant of concern-like mutations and deletions. Dudas G, Hong SL, Potter BI, Calvignac-Spencer S, Niatou-Singa FS, Tombolomako TB, Fuh-Neba T, Vickos U, Ulrich M, Leendertz FH, Khan K, Huber C, Watts A, Olendraitė I, Snijder J, Wijnant KN, Bonvin AMJJ, Martres P, Behillil S, Ayouba A, Maidadi MF, Djomsi DM, Godwe C, Butel C, Šimaitis A, Gabrielaitė M, Katėnaitė M, Norvilas R, Raugaitė L, Koyaweda GW, Kandou JK, Jonikas R, Nasvytienė I, Žemeckienė Ž, Gečys D, Tamušauskaitė K, Norkienė M, Vasiliūnaitė E, Žiogienė D, Timinskas A, Šukys M, Šarauskas M, Alzbutas G, Aziza AA, **Lusamaki EK**, Cigolo JM, Mawete FM, Lofiko EL, Kingebeni PM, Tamfum JM, Belizaire MRD, Essomba RG, Assoumou MCO, Mboringong AB, Dieng AB, Juozapaitė D, Hosch S, Obama J, Ayekaba MO, Naumovas D, Pautienius A, Rafaï CD, Vitkauskienė A, Ugenskienė R, Gedvilaitė A, Čereškevičius D, Lesauskaitė V, Žemaitis L, Griškevičius L, Baele G. **Nat Commun**. 2021 Oct 1;12(1):5769. doi: 10.1038/s41467-021-26055-8. PMID: 34599175 **Free PMC article.**
10. The evolving SARS-CoV-2 epidemic in Africa: Insights from rapidly expanding genomic surveillance. Houriiyah Tegally et al. Science. 2022 Oct 7;378(6615):eabq5358. doi: 10.1126/science.abq5358. Epub 2022 Oct 7. PMID: 36108049 Free PMC article.
11. A year of genomic surveillance reveals how the SARS-CoV-2 pandemic unfolded in Africa. Eduan Wilkinson et al. Science. 2021 Oct 22;374(6566):423-431. doi: 10.1126/science.abj4336. Epub 2021 Sep 9.PMID: 34672751

Références bibliographiques

Adnan, N., Haq, Z. U., Malik, A., Mehmood, A., Ishaq, U., Faraz, M., Malik, J., & Mehmoodi, A. (2022). Human monkeypox virus: An updated review. *Medicine*, *101*(35), e30406. https://doi.org/10.1097/MD.0000000000030406

Afonso, C. L., Tulman, E. R., Lu, Z., Zsak, L., Osorio, F. A., Balinsky, C., Kutish, G. F., & Rock, D. L. (2002). The Genome of Swinepox Virus. *Journal of Virology*, *76*(2), 783–790. https://doi.org/10.1128/JVI.76.2.783-790.2002

Africa CDC. (2024, August 13). *Déclaration d'urgence sanitaire publique de sécurité continentale*. https://africacdc.org/wp-content/uploads/2024/08/Explainer-Declaration-of-Public-Health-Emergency-of-Continental-Security-FR.pdf

Alakunle, E., Moens, U., Nchinda, G., & Okeke, M. I. (2020). Monkeypox Virus in Nigeria: Infection Biology, Epidemiology, and Evolution. *Viruses*, *12*(11), 1257. https://doi.org/10.3390/v12111257

Amman, B. R., Carroll, S. A., Reed, Z. D., Sealy, T. K., Balinandi, S., Swanepoel, R., Kemp, A., Erickson, B. R., Comer, J. A., Campbell, S., Cannon, D. L., Khristova, M. L., Atimnedi, P., Paddock, C. D., Kent Crockett, R. J., Flietstra, T. D., Warfield, K. L., Unfer, R., Katongole-Mbidde, E., … Towner, J. S. (2012). Seasonal Pulses of Marburg Virus Circulation in Juvenile Rousettus aegyptiacus Bats Coincide with Periods of Increased Risk of Human Infection. *PLoS Pathogens*, *8*(10), e1002877. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002877

Arias, A., Watson, S. J., Asogun, D., Tobin, E. A., Lu, J., Phan, M. V. T., Jah, U., Wadoum, R. E. G., Meredith, L., Thorne, L., Caddy, S., Tarawalie, A., Langat, P., Dudas, G., Faria, N. R., Dellicour, S., Kamara, A., Kargbo, B., Kamara, B. O., … Cotten, M. (2016). Rapid outbreak sequencing of Ebola virus in Sierra Leone identifies transmission chains linked to sporadic cases. *Virus Evolution*, *2*(1), vew016. https://doi.org/10.1093/ve/vew016

Arita, I., & Henderson, D. A. (1968). Smallpox and monkeypox in non-human primates. *Bulletin of the World Health Organization*, *39*(2), 277–283.

Arthur, L., & Lemaire, M. (2009). *Les Chauves-souris de France Belgique Luxembourg et Suisse*. BIOTOPE. https://books.google.fr/books?id=gowQCwAAQBAJ

Arunagiri, T., Ganesan, A., Ravi Kumaran, V., Mani, S., Chanduluru, H. K., Vellapandian, C., & Kannaiah, K. P. (2024). Diagnostic Strategies in the Era of Monkeypox Resurgence: A Comprehensive Analysis. *Cureus*. https://doi.org/10.7759/cureus.67154

B. Le Guenno, D., P. Formenty, D., M. Wyers, D., P. Gounon, D., F. Walker, M., & C. Boesch, P. (1995). Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *The Lancet*, *345*(8960), 1271–1274. https://doi.org/10.5555/uri:pii:S0140673695909257

Baize, S., Leroy, E. M., Georges-Courbot, M.-C., Capron, M., Lansoud-Soukate, J., Debré, P., Fisher-Hoch, S. P., McCormick, J. B., & Georges, A. J. (1999). Defective humoral responses and extensive intravascular apoptosis are associated with fatal outcome in Ebola virus-infected patients. *Nature Medicine*, *5*(4), 423–426. https://doi.org/10.1038/7422

Baize, S., Leroy, E. M., Mavoungou, E., & Fisher-Hoch, S. P. (n.d.). *Apoptosis in fatal Ebola infection. Does the virus toll the bell for immune system?* 3.

Barrette, R. W., Metwally, S. A., Rowland, J. M., Xu, L., Zaki, S. R., Nichol, S. T., Rollin, P. E., Towner, J. S., Shieh, W.-J., Batten, B., Sealy, T. K., Carrillo, C., Moran, K. E., Bracht, A. J., Mayr, G. A., Sirios-Cruz, M., Catbagan, D. P., Lautner, E. A., Ksiazek, T. G., … McIntosh, M. T. (2009). Discovery of Swine as a Host for the *Reston ebolavirus*. *Science*, *325*(5937), 204–206. https://doi.org/10.1126/science.1172705

Barry, A., Ahuka-Mundeke, S., Ali Ahmed, Y., Allarangar, Y., Anoko, J., Archer, B. N., Aruna Abedi, A., Bagaria, J., Belizaire, M. R. D., Bhatia, S., Bokenge, T., Bruni, E., Cori, A., Dabire, E., Diallo, A. M., Diallo, B., Donnelly, C. A., Dorigatti, I., Dorji, T. C., … Kitenge, E. (2018). Outbreak of Ebola virus disease in the Democratic Republic of the Congo, April–May, 2018: An epidemiological study. *The Lancet*, *392*(10143), 213–221. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31387-4

Bebell, L. M., Oduyebo, T., Mph, M. D., Riley, L. E., Hospital, M. G., General, M., Global, H., Collaborative, H., Atlanta, P., Service, E. I., & Hospital, M. G. (2018). *Ebola virus disease and pregnancy—A review of the current knowledge of Ebola virus pathogenesis*,

maternal and neonatal outcomes. *109*(5), 353–362. https://doi.org/10.1002/bdra.23558.Ebola

Beer, E. M., & Rao, V. B. (2019). A systematic review of the epidemiology of human monkeypox outbreaks and implications for outbreak strategy. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *13*(10), e0007791. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007791

Beeson, A., Styczynski, A., Hutson, C. L., Whitehill, F., Angelo, K. M., Minhaj, F. S., Morgan, C., Ciampaglio, K., Reynolds, M. G., McCollum, A. M., & Guagliardo, S. A. J. (2023). Mpox respiratory transmission: The state of the evidence. *The Lancet Microbe*, *4*(4), e277–e283. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(23)00034-4

Bermejo, M., Rodríguez-Teijeiro, J. D., Illera, G., Barroso, A., Vilà, C., & Walsh, P. D. (2006). Ebola Outbreak Killed 5000 Gorillas. *Science*, *314*(5805), 1564. https://doi.org/10.1126/science.1133105

Berthet, N., Descorps-Declère, S., Besombes, C., Curaudeau, M., Nkili Meyong, A. A., Selekon, B., Labouba, I., Gonofio, E. C., Ouilibona, R. S., Simo Tchetgna, H. D., Feher, M., Fontanet, A., Kazanji, M., Manuguerra, J.-C., Hassanin, A., Gessain, A., & Nakoune, E. (2021). Genomic history of human monkey pox infections in the Central African Republic between 2001 and 2018. *Scientific Reports*, *11*(1), 13085. https://doi.org/10.1038/s41598-021-92315-8

Biedenkopf, N., Bukreyev, A., Chandran, K., Di Paola, N., Formenty, P. B. H., Griffiths, A., Hume, A. J., Mühlberger, E., Netesov, S. V., Palacios, G., Pawęska, J. T., Smither, S., Takada, A., Wahl, V., & Kuhn, J. H. (2023). Renaming of genera Ebolavirus and Marburgvirus to Orthoebolavirus and Orthomarburgvirus, respectively, and introduction of binomial species names within family Filoviridae. *Archives of Virology*, *168*(8), 220. https://doi.org/10.1007/s00705-023-05834-2

Biedenkopf, N., Bukreyev, A., Chandran, K., Di Paola, N., Formenty, P. B. H., Griffiths, A., Hume, A. J., Mühlberger, E., Netesov, S. V., Palacios, G., Pawęska, J. T., Smither, S., Takada, A., Wahl, V., & Kuhn, J. H. (2024). ICTV Virus Taxonomy Profile: Filoviridae 2024: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. *Journal of General Virology*, *105*(2). https://doi.org/10.1099/jgv.0.001955

Blattner, Collin M Mortazie, Michael B. Murase, J. E. (2015). Cutaneous manifestations of the ebola virus. *Dermatology Online Journal*, *21*(3).

Bodmer, B. S., Hoenen, T., & Wendt, L. (2024). Molecular insights into the Ebola virus life cycle. *Nature Microbiology*, *9*(6), 1417–1426. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01703-z

Bolanda, J. D., Li, Y., Reynolds, M. G., Moudzeo, H., Wassa, D. W., Learned, L. A., Libama, F., Harvey, J. M., Likos, A., Formenty, P., Kline, R., Damon, I. K., Boumandoki, P., Braden, Z. H., Tarangonia, P., Stempora, L. L., Karem, K., & Olson, V. A. (2005). EXTENDED INTERHUMAN TRANSMISSION OF MONKEYPOX IN A HOSPITAL COMMUNITY IN THE REPUBLIC OF THE CONGO, 2003. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*(2), 428–434. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.428

Bowen, E. T. W., Lloyd, G., Harris, W. J., Platt, G. S., Baskerville, A., & Vella, E. E. (1977). VIRAL HEMORRHAGIC FEVER IN SOUTHERN SUDAN AND NORTHERN ZAIRE: Preliminary Studies on the Aetiological Agent. *The Lancet*, *309*(8011), 571–573. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92001-3

Bower, H., Johnson, S., Bangura, M. S., Kamara, A. J., Kamara, O., Mansaray, S. H., Sesay, D., Turay, C., Checchi, F., & Glynn, J. R. (2016). Exposure-Specific and Age-Specific Attack Rates for Ebola Virus Disease in Ebola-Affected Households, Sierra Leone. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(8), 1403–1411. https://doi.org/10.3201/eid2208.160163

Breman, J. G., & Henderson, D. A. (1998). Poxvirus Dilemmas—Monkeypox, Smallpox, and Biologic Terrorism. *New England Journal of Medicine*, *339*(8), 556–559. https://doi.org/10.1056/NEJM199808203390811

Breman, J. G., Kalisa-Ruti, Steniowski, M. V., Zanotto, E., Gromyko, A. I., & Arita, I. (1980). Human monkeypox, 1970-79. *Bulletin of the World Health Organization*, *58*(2), 165–182.

Bukreyev, A., Yang, L., Zaki, S. R., Shieh, W.-J., Rollin, P. E., Murphy, B. R., Collins, P. L., & Sanchez, A. (2006). A Single Intranasal Inoculation with a Paramyxovirus-Vectored

Vaccine Protects Guinea Pigs against a Lethal-Dose Ebola Virus Challenge. *Journal of Virology*, *80*(5), 2267–2279. https://doi.org/10.1128/JVI.80.5.2267-2279.2006

Bunge, E. M., Hoet, B., Chen, L., Lienert, F., Weidenthaler, H., Baer, L. R., & Steffen, R. (2022). The changing epidemiology of human monkeypox—A potential threat? A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *16*(2), e0010141. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010141

Cabanillas, B., Murdaca, G., Guemari, A., Torres, M. J., Azkur, A. K., Aksoy, E., Vitte, J., de las Vecillas, L., Giovannini, M., Fernández-Santamaria, R., Castagnoli, R., Orsi, A., Amato, R., Giberti, I., Català, A., Ambrozej, D., Schaub, B., Tramper-Stranders, G. A., Novak, N., … Akdis, C. A. (2023). A compilation answering 50 questions on Monkeypox virus and the current Monkeypox outbreak. *Allergy*, all.15633. https://doi.org/10.1111/all.15633

Carroll, D., Daszak, P., Wolfe, N. D., Gao, G. F., Morel, C. M., Morzaria, S., Pablos-Méndez, A., Tomori, O., & Mazet, J. A. K. (2018). The Global Virome Project. *Science*, *359*(6378), 872–874. https://doi.org/10.1126/science.aap7463

Carter, C., Akrami, K., Hall, D., Smith, D., & Aronoff-Spencer, E. (2017). Lyophilized visually readable loop-mediated isothermal reverse transcriptase nucleic acid amplification test for detection Ebola Zaire RNA. *Journal of Virological Methods*, *244*, 32–38. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.02.013

CDC. (2024a, May 6). *Ebola Disease Outbreaks by Species and Size, Since 1976*. Cdc.Gov. https://www.cdc.gov/ebola/outbreaks/index.html

CDC. (2024b, September 13). *Guidelines for Collecting and Handling Specimens for Mpox Testing*. CDC Mpox. https://www.cdc.gov/mpox/hcp/diagnosis-testing/collecting-specimens.html?CDC_AAref_Val=https://www.cdc.gov/poxvirus/mpox/clinicians/prep-collection-specimens.html

CDC. (2024c, September 13). *Mpox Infection Prevention and Control in Healthcare Settings*. CDC Mpox. https://www.cdc.gov/mpox/hcp/infection-control/healthcare-settings.html

CDC, N. (DHCPP). (2022). *2022 Monkeypox and Orthopoxvirus Outbreak Global Map*. https://www.cdc.gov/poxvirus/monkeypox/response/2022/world-map.html

Cepheid. (2015). *Xpert ® Ebola Assay*. *March*. https://doi.org/10.1103/PhysRevA.71.032504

Chauhan, R. P., Fogel, R., & Limson, J. (2023). Overview of Diagnostic Methods, Disease Prevalence and Transmission of Mpox (Formerly Monkeypox) in Humans and Animal Reservoirs. *Microorganisms*, *11*(5), 1186. https://doi.org/10.3390/microorganisms11051186

Chen, N., Li, G., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., Jahrling, P. B., Feng, Z., Schriewer, J., Buck, C., Wang, C., Lefkowitz, E. J., Esposito, J. J., Harms, T., Damon, I. K., Roper, R. L., Upton, C., & Buller, R. M. L. (2005). Virulence differences between monkeypox virus isolates from West Africa and the Congo basin. *Virology*, *340*(1), 46–63. https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.05.030

Choi, E. M.-L., Kasonia, K., Kavunga-Membo, H., Mukadi-Bamuleka, D., Soumah, A., Mossoko, Z., Edwards, T., Tetsa-Tata, D., Makarimi, R., Toure, O., Mambula, G., Brindle, H., Camacho, A., Connor, N. E., Mukadi, P., McLean, C., Keshinro, B., Gaddah, A., Robinson, C., … Muyembe-Tamfum, J. J. (2024). Immunogenicity of an Extended Dose Interval for the Ad26.ZEBOV, MVA-BN-Filo Ebola Vaccine Regimen in Adults and Children in the Democratic Republic of the Congo. *Vaccines*, *12*(8), 828. https://doi.org/10.3390/vaccines12080828

Cooper, T. K., Huzella, L., Johnson, J. C., Rojas, O., Yellayi, S., Sun, M. G., Bavari, S., Bonilla, A., Hart, R., Jahrling, P. B., Kuhn, J. H., & Zeng, X. (2018). Histology, immunohistochemistry, and in situ hybridization reveal overlooked Ebola virus target tissues in the Ebola virus disease guinea pig model. *Scientific Reports*, *8*(1), 1250. https://doi.org/10.1038/s41598-018-19638-x

Curaudeau, M., Besombes, C., Nakouné, E., Fontanet, A., Gessain, A., & Hassanin, A. (2023). Identifying the Most Probable Mammal Reservoir Hosts for Monkeypox Virus Based on Ecological Niche Comparisons. *Viruses*, *15*(3), 727. https://doi.org/10.3390/v15030727

D. L. Heymann, J. S. Weisfeld, P. A. Webb, K. M. Johnson, T. Cairns, H. B. (1980). Ebola Hemorrhagic Fever: Tandala, Zaire, 1977–1978. *The Journal of Infectious Diseases*, *142*(3), 372–376. https://doi.org/10.1093/infdis/142.3.372

Damon, I. K., Roth, C. E., & Chowdhary, V. (2006). Discovery of Monkeypox in Sudan. *New England Journal of Medicine*, *355*(9), 962–963. https://doi.org/10.1056/NEJMc060792

Daszak, P., Carroll, D., Wolfe, N., & Mazet, J. (2016). The global virome project. *International Journal of Infectious Diseases*, *53*, 36. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2016.11.097

Daszak, P., Field, H. E., Hyatt, A. D., Smith, C., Halpin, K., Epstein, J. H., Middleton, D., Fogarty, R., Hughes, T., Bingham, J., & Rahman, S. A. (2011). Pteropid Bats are Confirmed as the Reservoir Hosts of Henipaviruses: A Comprehensive Experimental Study of Virus Transmission. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *85*(5), 946–951. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0567

Davi, S. D., Kissenkötter, J., Faye, M., Böhlken-Fascher, S., Stahl-Hennig, C., Faye, O., Faye, O., Sall, A. A., Weidmann, M., Ademowo, O. G., Hufert, F. T., Czerny, C.-P., & Abd El Wahed, A. (2019). Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Monkeypox virus. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, *95*(1), 41–45. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2019.03.015

De Baetselier, I., Van Dijck, C., Kenyon, C., Coppens, J., Michiels, J., De Block, T., Smet, H., Coppens, S., Vanroye, F., Bugert, J. J., Girl, P., Zange, S., Liesenborghs, L., Brosius, I., Van Griensven, J., Selhorst, P., Florence, E., Van Den Bossche, D., Ariën, K. K., … Vuylsteke, B. (2022). Retrospective detection of asymptomatic monkeypox virus infections among male sexual health clinic attendees in Belgium. *Nature Medicine*, *28*(11), 2288–2292. https://doi.org/10.1038/s41591-022-02004-w

de Greslan, T., Billhot, M., Rousseau, C., Mac Nab, C., Karkowski, L., Cournac, J.-M., Bordes, J., Gagnon, N., Dubrous, P., Duron, S., Moroge, S., Quentin, B., Koulibaly, F., Bompaire, F., Renard, J.-L., & Cellarier, G. (2016). Ebola Virus–Related Encephalitis. *Clinical Infectious Diseases*, *63*(8), 1076–1078. https://doi.org/10.1093/cid/ciw469

De La Vega, M.-A., Stein, D., & Kobinger, G. P. (2015). Ebolavirus Evolution: Past and Present. *PLOS Pathogens*, *11*(11), e1005221. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005221

Dembek, Z., Hadeed, S., Tigabu, B., Schwartz-Watjen, K., Glass, M., Dressner, M., Frankel, D., Blaney, D., Eccles Iii, T. G., Chekol, T., Owens, A., & Wu, A. (2024). Ebola Virus

Disease Outbreaks: Lessons Learned From Past and Facing Future Challenges. *Military Medicine*, *189*(7–8), e1470–e1478. https://doi.org/10.1093/milmed/usae204

Diallo, B., Sissoko, D., Loman, N. J., Bah, H. A., Bah, H., Worrell, M. C., Conde, L. S., Sacko, R., Mesfin, S., Loua, A., Kalonda, J. K., Erondu, N. A., Dahl, B. A., Handrick, S., Goodfellow, I., Meredith, L. W., Cotten, M., Jah, U., Guetiya Wadoum, R. E., … Duraffour, S. (2016). Resurgence of Ebola Virus Disease in Guinea Linked to a Survivor with Virus Persistence in Seminal Fluid for More Than 500 Days. *Clinical Infectious Diseases*, *63*(10), 1353–1356. https://doi.org/10.1093/cid/ciw601

Diallo, M. S. K., Rabilloud, M., Ayouba, A., Touré, A., Thaurignac, G., Keita, A. K., Butel, C., Kpamou, C., Barry, T. A., Sall, M. D., Camara, I., Leroy, S., Msellati, P., Ecochard, R., Peeters, M., Sow, M. S., Delaporte, E., Etard, J. F., ABOUBACAR, D., … YAZDANPANAH, Y. (2019). Prevalence of infection among asymptomatic and paucisymptomatic contact persons exposed to Ebola virus in Guinea: A retrospective, cross-sectional observational study. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(3), 308–316. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(18)30649-2

Djuicy, D. D., Sadeuh-Mba, S. A., Bilounga, C. N., Yonga, M. G., Tchatchueng-Mbougua, J. B., Essima, G. D., Esso, L., Nguidjol, I. M. E., Metomb, S. F., Chebo, C., Agwe, S. M., Ankone, P. A., Ngonla, F. N. N., Mossi, H. M., Etoundi, A. G. M., Eyangoh, S. I., Kazanji, M., & Njouom, R. (2024). Concurrent Clade I and Clade II Monkeypox Virus Circulation, Cameroon, 1979–2022. *Emerging Infectious Diseases*, *30*(3). https://doi.org/10.3201/eid3003.230861

Doty, J., Malekani, J., Kalemba, L., Stanley, W., Monroe, B., Nakazawa, Y., Mauldin, M., Bakambana, T., Liyandja Dja Liyandja, T., Braden, Z., Wallace, R., Malekani, D., McCollum, A., Gallardo-Romero, N., Kondas, A., Peterson, A., Osorio, J., Rocke, T., Karem, K., … Carroll, D. (2017). Assessing Monkeypox Virus Prevalence in Small Mammals at the Human–Animal Interface in the Democratic Republic of the Congo. *Viruses*, *9*(10), 283. https://doi.org/10.3390/v9100283

Duarte, P. M., Adesola, R. O., Priyadarsini, S., Singh, R., Shaheen, M. N. F., Ogundijo, O. A., Gulumbe, B. H., Lounis, M., Samir, M., Govindan, K., Adebiyi, O. S., Scott, G. Y., Ahmadi, P., Mahmoodi, V., Chogan, H., Gholami, S., Shirazi, O., Moghadam, S. K., Jafari, N., … Tazerji, S. S. (2024). Unveiling the Global Surge of Mpox (Monkeypox):

A comprehensive review of current evidence. *The Microbe*, *4*, 100141. https://doi.org/10.1016/j.microb.2024.100141

Dubois, M. E., Hammarlund, E., & Slifka, M. K. (2012). Optimization of Peptide-Based ELISA for Serological Diagnostics: A Retrospective Study of Human Monkeypox Infection. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *12*(5), 400–409. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0779

Edghill-Smith, Y., Golding, H., Manischewitz, J., King, L. R., Scott, D., Bray, M., Nalca, A., Hooper, J. W., Whitehouse, C. A., Schmitz, J. E., Reimann, K. A., & Franchini, G. (2005). Smallpox vaccine–induced antibodies are necessary and sufficient for protection against monkeypox virus. *Nature Medicine*, *11*(7), 740–747. https://doi.org/10.1038/nm1261

Elliott, L. H., Kiley, M. P., & McCormick, J. B. (1985). Descriptive analysis of Ebola virus proteins. *Virology*, *147*(1), 169–176. https://doi.org/10.1016/0042-6822(85)90236-3

Erez, N., Achdout, H., Milrot, E., Schwartz, Y., Wiener-Well, Y., Paran, N., Politi, B., Tamir, H., Israely, T., Weiss, S., Beth-Din, A., Shifman, O., Israeli, O., Yitzhaki, S., Shapira, S. C., Melamed, S., & Schwartz, E. (2019). Diagnosis of Imported Monkeypox, Israel, 2018. *Emerging Infectious Diseases*, *25*(5), 980–983. https://doi.org/10.3201/eid2505.190076

Etard, J. F., Sow, M. S., Leroy, S., Touré, A., Taverne, B., Keita, A. K., Msellati, P., Magassouba, N., Baize, S., Raoul, H., Izard, S., Kpamou, C., March, L., Savane, I., Barry, M., Delaporte, E., Ayouba, A., Baize, S., Bangoura, K., … Yazdanpanah, Y. (2017). Multidisciplinary assessment of post-Ebola sequelae in Guinea (Postebogui): An observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(5), 545–552. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30516-3

Falasca, L., Agrati, C., Petrosillo, N., Di Caro, A., Capobianchi, M. R., Ippolito, G., & Piacentini, M. (2015). Molecular mechanisms of Ebola virus pathogenesis: Focus on cell death. *Cell Death and Differentiation*, *22*(8), 1250–1259. https://doi.org/10.1038/cdd.2015.67

Fedewa, G., Radoshitzky, S. R., Chī, X., Dǒng, L., Zeng, X., Spear, M., Strauli, N., Ng, M., Chandran, K., Stenglein, M. D., Hernandez, R. D., Jahrling, P. B., Kuhn, J. H., & DeRisi, J. L. (2018). Ebola virus, but not Marburg virus, replicates efficiently and without required adaptation in snake cells. *Virus Evolution*, *4*(2). https://doi.org/10.1093/ve/vey034

Feldmann, H., Sprecher, A., & Geisbert, T. W. (2020). Ebola. *New England Journal of Medicine*, *382*(19), 1832–1842. https://doi.org/10.1056/NEJMra1901594

Fenner, F. (2000). Adventures with poxviruses of vertebrates. *FEMS Microbiology Reviews*, *24*(2), 123–133. https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2000.tb00536.x

Field, H. E. (2009). Bats and Emerging Zoonoses: Henipaviruses and SARS. *Zoonoses and Public Health*, *56*(6–7), 278–284. https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2008.01218.x

Fine, P. E. M., Jezek, Z., Grab, B., & Dixon, H. (1988). The Transmission Potential of Monkeypox Virus in Human Populations. *International Journal of Epidemiology*, *17*(3), 643–650. https://doi.org/10.1093/ije/17.3.643

Fitzpatrick, G., Vogt, F., Gbabai, O. B. M., Decroo, T., Keane, M., De Clerck, H., Grolla, A., Brechard, R., Stinson, K., & Van Herp, M. (2015). The Contribution of Ebola Viral Load at Admission and Other Patient Characteristics to Mortality in a Médecins Sans Frontières Ebola Case Management Centre, Kailahun, Sierra Leone, June-October 2014. *Journal of Infectious Diseases*, *212*(10), 1752–1758. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv304

Formenty, P., Boesch, C., Wyers, M., Steiner, C., Donati, F., Walker, F., & Guenno, B. L. (1999). Ebola Virus Outbreak among Wild Chimpanzees Living in a Rain Forest of Cote d ' Ivoire. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(Suppl 1), 120–126.

Formenty, P., Leroy, E. M., Epelboin, A., Libama, F., Lenzi, M., Sudeck, H., Yaba, P., Allarangar, Y., Boumandouki, P., Nkounkou, V. B., Drosten, C., Grolla, A., Feldmann, H., & Roth, C. (2006). Detection of Ebola Virus in Oral Fluid Specimens during Outbreaks of Ebola Virus Hemorrhagic Fever in the Republic of Congo. *Clinical Infectious Diseases*, *42*(11), 1521–1526. https://doi.org/10.1086/503836

Formenty, P., Muntasir, M. O., Damon, I., Chowdhary, V., Opoka, M. L., Monimart, C., Mutasim, E. M., Manuguerra, J.-C., Davidson, W. B., Karem, K. L., Cabeza, J., Wang, S., Malik, M. R., Durand, T., Khalid, A., Rioton, T., Kuong-Ruay, A., Babiker, A. A., Karsani, M. E. M., & Abdalla, M. S. (2010). Human Monkeypox Outbreak Caused by Novel Virus Belonging to Congo Basin Clade, Sudan, 2005. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(10), 1539–1545. https://doi.org/10.3201/eid1610.100713

Geisbert, T. W., Hensley, L. E., Larsen, T., Young, H. A., Reed, D. S., Geisbert, J. B., Scott, D. P., Kagan, E., Jahrling, P. B., & Davis, K. J. (2003). Pathogenesis of Ebola Hemorrhagic Fever in Cynomolgus Macaques: Evidence that Dendritic Cells are Early and Sustained Targets of Infection. *American Journal of Pathology*, *163*(6), 2347–2370. https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63591-2

Geisbert, T. W., Pushko, P., Anderson, K., Smith, J., Davis, K. J., & Jahrling, P. B. (2002). Evaluation in Nonhuman Primates of Vaccines against Ebola Virus. *Emerging Infectious Diseases*, *8*(5), 503–507. https://doi.org/10.3201/eid0805.010284

Georges, A., Leroy, E. M., Renaut, A. A., Benissan, C. T., Nabias, R. J., Ngoc, M. T., Obiang, P. I., Lepage, J. P. M., Bertherat, E. J., Bénoni, D. D., Wickings, E. J., Amblard, J. P., Lansoud-Soukate, J. M., Milleliri, J. M., Baize, S., & Georges-Courbot, M. (1999). Ebola Hemorrhagic Fever Outbreaks in Gabon, 1994–1997: Epidemiologic and Health Control Issues. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S65–S75. https://doi.org/10.1086/514290

Georges, A.-J., Matton, T., & Courbot-Georges, M.-C. (2004). Le monkey-pox, un paradigme de maladie émergente puis réémergente. *Médecine et Maladies Infectieuses*, *34*(1), 12–19. https://doi.org/10.1016/j.medmal.2003.09.008

Georges-Courbot, M.-C. (1997). Isolation and Phylogenetic Characterization of Ebola Viruses Causing Different Outbreaks in Gabon. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(1), 59–62. https://doi.org/10.3201/eid0301.970107

Germain M. (1978). *COLLECTION OF MAMMALS AND ARTHROPODS DURING THE EPIDEMIC OF HAEMORRHAGIC FEVER IN ZAIRE*.

Gessain, A., Nakoune, E., & Yazdanpanah, Y. (2022). Monkeypox. *New England Journal of Medicine*, *387*(19), 1783–1793. https://doi.org/10.1056/NEJMra2208860

Gigante, C. M., Takakuwa, J., McGrath, D., Kling, C., Smith, T. G., Peng, M., Wilkins, K., Garrigues, J. M., Holly, T., Barbian, H., Kittner, A., Haydel, D., Ortega, E., Richardson, G., Hand, J., Hacker, J. K., Espinosa, A., Haw, M., Kath, C., … Hutson, C. L. (2024). *Notes from the Field*: Mpox Cluster Caused by Tecovirimat-Resistant Monkeypox Virus — Five States, October 2023–February 2024. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report*, *73*(40), 903–905. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm7340a3

Glynn, J. R., Bower, H., Johnson, S., Houlihan, C. F., Montesano, C., Scott, J. T., Semple, M. G., Bangura, M. S., Kamara, A. J., Kamara, O., Mansaray, S. H., Sesay, D., Turay, C., Dicks, S., Wadoum, R. E. G., Colizzi, V., Checchi, F., Samuel, D., & Tedder, R. S. (2017). Asymptomatic infection and unrecognised Ebola virus disease in Ebola-affected households in Sierra Leone: A cross-sectional study using a new non-invasive assay for antibodies to Ebola virus. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(6), 645–653. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30111-1

Goldstein, T., Anthony, S. J., Gbakima, A., Bird, B. H., Bangura, J., Tremeau-Bravard, A., Belaganahalli, M. N., Wells, H. L., Dhanota, J. K., Liang, E., Grodus, M., Jangra, R. K., DeJesus, V. A., Lasso, G., Smith, B. R., Jambai, A., Kamara, B. O., Kamara, S., Bangura, W., … Mazet, J. A. K. (2018). The discovery of Bombali virus adds further support for bats as hosts of ebolaviruses. *Nature Microbiology*, *3*(10), 1084–1089. https://doi.org/10.1038/s41564-018-0227-2

Gong, Q., Wang, C., Chuai, X., & Chiu, S. (2022). Monkeypox virus: A re-emergent threat to humans. *Virologica Sinica*, *37*(4), 477–482. https://doi.org/10.1016/j.virs.2022.07.006

Green, E., Hunt, L., Ross, J. C. G., Nissen, N. M., Curran, T., Badhan, A., Sutherland, K. A., Richards, J., Lee, J. S., Allen, S. H., Laird, S., Blackman, M., Collacott, I., Parker, P. A., Walbridge, A., Phillips, R., Sellu, S. J., Dama, A., Sheriff, A. K., … Brooks, T. J. (2016). Viraemia and Ebola virus secretion in survivors of Ebola virus disease in Sierra Leone: A cross-sectional cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(9), 1052–1056. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)30060-3

Greffe, S., D'Anglejan, E., Coutte, L., Dournon, N., Dinh, A., & Rouveix, E. (2023). MPOX de 1960 à 2022. Du Monkeypox au Mpox. *La Presse Médicale Formation*, *4*(4), 294–301. https://doi.org/10.1016/j.lpmfor.2023.07.017

Gryseels, S., Mbala-Kingebeni, P., Akonda, I., Angoyo, R., Ayouba, A., Baelo, P., Mukadi, D. B., Bugentho, E., Bushmaker, T., Butel, C., Calvignac-Spencer, S., Delaporte, E., De Smet, B., Düx, A., Edidi-Atani, F., Fischer, R., Kahandi, C., Kapetshi, J., Sumba, S. K., … Ahuka-Mundeke, S. (2020). Role of Wildlife in Emergence of Ebola Virus in Kaigbono (Likati), Democratic Republic of the Congo, 2017. *Emerging Infectious Diseases*, *26*(9), 2205–2209. https://doi.org/10.3201/eid2609.191552

Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., Sagulenko, P., Bedford, T., & Neher, R. A. (2018). Nextstrain: Real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics*, *34*(23), 4121–4123. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty407

Haller, S. L., Peng, C., McFadden, G., & Rothenburg, S. (2014). Poxviruses and the evolution of host range and virulence. *Infection, Genetics and Evolution*, *21*, 15–40. https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.10.014

Happi, C., Adetifa, I., Mbala, P., Njouom, R., Nakoune, E., Happi, A., Ndodo, N., Ayansola, O., Mboowa, G., Bedford, T., Neher, R. A., Roemer, C., Hodcroft, E., Tegally, H., O'Toole, Á., Rambaut, A., Pybus, O., Kraemer, M. U. G., Wilkinson, E., … de Oliveira, T. (2022). Urgent need for a non-discriminatory and non-stigmatizing nomenclature for monkeypox virus. *PLOS Biology*, *20*(8), e3001769. https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3001769

Hartley, M. A., Young, A., Tran, A. M., Okoni-Williams, H. H., Suma, M., Mancuso, B., Al-Dikhari, A., & Faouzi, M. (2017). Predicting Ebola Severity: A Clinical Prioritization Score for Ebola Virus Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, *11*(2), 1–20. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005265

Hayes, C. G., Burans, J. P., Ksiazek, T. G., Del Rosario, R. A., Miranda, M. E. G., Manaloto, C. R., Barrientos, A. B., Robles, C. G., Dayrit, M. M., & Peters, C. J. (1992). Outbreak of Fatal Illness among Captive Macaques in the Philippines Caused by an Ebola-

Related Filovirus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *46*(6), 664–671. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1992.46.664

Henao-Restrepo, A. M., Camacho, A., Longini, I. M., Watson, C. H., Edmunds, W. J., Egger, M., Carroll, M. W., Dean, N. E., Diatta, I., Doumbia, M., Draguez, B., Duraffour, S., Enwere, G., Grais, R., Gunther, S., Gsell, P. S., Hossmann, S., Watle, S. V., Kondé, M. K., … Kieny, M. P. (2017). Efficacy and effectiveness of an rVSV-vectored vaccine in preventing Ebola virus disease: Final results from the Guinea ring vaccination, open-label, cluster-randomised trial (Ebola Ça Suffit!). *The Lancet*, *389*(10068), 505–518. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32621-6

Hendrickson, R. C., Wang, C., Hatcher, E. L., & Lefkowitz, E. J. (2010). Orthopoxvirus Genome Evolution: The Role of Gene Loss. *Viruses*, *2*(9), 1933–1967. https://doi.org/10.3390/v2091933

Heymann, D. L., Szczeniowski, M., & Esteves, K. (1998). Re-emergence of monkeypox in Africa: A review of the past six years. *British Medical Bulletin*, *54*(3), 693–702. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a011720

Holloway, I. W. (2022). Lessons for Community-Based Scale-Up of Monkeypox Vaccination From Previous Disease Outbreaks Among Gay, Bisexual, and Other Men Who Have Sex With Men in the United States. *American Journal of Public Health*, *112*(11), 1572–1575. https://doi.org/10.2105/AJPH.2022.307075

Holmes, E. C., Dudas, G., Rambaut, A., & Andersen, K. G. (2016). The evolution of Ebola virus: Insights from the 2013–2016 epidemic. *Nature*, *538*(7624), 193–200. https://doi.org/10.1038/nature19790

Huhn, G. D., Bauer, A. M., Yorita, K., Graham, M. B., Sejvar, J., Likos, A., Damon, I. K., Reynolds, M. G., & Kuehnert, M. J. (2005). Clinical Characteristics of Human Monkeypox, and Risk Factors for Severe Disease. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(12), 1742–1751. https://doi.org/10.1086/498115

Huijbregts, B., De Wachter, P., Obiang, L. S. N., & Akou, M. E. (2003). Ebola and the decline of gorilla Gorilla gorilla and chimpanzee Pan troglodytes populations in Minkebe

Forest, north-eastern Gabon. *Oryx*, *37*(04). https://doi.org/10.1017/S0030605303000802

Human Monkeypox (with Jezek, Z.). (1988). S. Karger.

Hume, A. J., & Mühlberger, E. (2019). Distinct Genome Replication and Transcription Strategies within the Growing Filovirus Family. *Journal of Molecular Biology*, *431*(21), 4290–4320. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.029

Hunt, L., Gupta-Wright, A., Simms, V., Tamba, F., Knott, V., Tamba, K., Heisenberg-Mansaray, S., Tamba, E., Sheriff, A., Conteh, S., Smith, T., Tobin, S., Brooks, T., Houlihan, C., Cummings, R., & Fletcher, T. (2015). Clinical presentation, biochemical, and haematological parameters and their association with outcome in patients with Ebola virus disease: An observational cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, *15*(11), 1292–1299. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00144-9

Hutin, Y. J. F., Williams, R. J., Malfait, P., Pebody, R., Loparev, V. N., Ropp, S. L., Rodriguez, M., Knight, J. C., Tshioko, F. K., Khan, A. S., Szczeniowski, M. V., & Esposito, J. J. (2001). Outbreak of Human Monkeypox, Democratic Republic of Congo, 1996 to 1997. *Emerging Infectious Diseases*, *7*(3), 434–438. https://doi.org/10.3201/eid0703.017311

Hutson, C. L., Carroll, D. S., Gallardo-Romero, N., Weiss, S., Clemmons, C., Hughes, C. M., Salzer, J. S., Olson, V. A., Abel, J., Karem, K. L., & Damon, I. K. (2011). Monkeypox Disease Transmission in an Experimental Setting: Prairie Dog Animal Model. *PLoS ONE*, *6*(12), e28295. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028295

Iizuka, I., Saijo, M., Shiota, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Hasegawa, H., Sakai, K., Fukushi, S., Mizutani, T., Ogata, M., Nakauchi, M., Kurane, I., Mizuguchi, M., & Morikawa, S. (2009). Loop-mediated isothermal amplification-based diagnostic assay for monkeypox virus infections. *Journal of Medical Virology*, *81*(6), 1102–1108. https://doi.org/10.1002/jmv.21494

Ilhem Messaoudi, Gaya K. Amarasinghe, & Christopher F. Basler. (2015). *Filovirus pathogenesis and immune evasion: Insights from Ebola virus and Marburg virus*. *13*(11), 663–676. https://doi.org/10.1038/nm.2451.A

INRB. (2024, July 5). *First mpox virus clade Ib cases in Goma, North Kivu, DRC: Potential risk for a larger outbreak.* Virological.Org. https://virological.org/t/mpox-clade-ib-cases-in-goma/962

Jaax, N. K., Davis, K. J., Geisbert, T. J., Vogel, P., Jaax, G. P., Topper, M., & Jahrling, P. B. (1996). Lethal experimental infection of rhesus monkeys with Ebola-Zaire (Mayinga) virus by the oral and conjunctival route of exposure. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, *120*(2), 140–155.

Jacob, S. T., Crozier, I., Fischer, W. A., Hewlett, A., Kraft, C. S., Vega, M.-A. D. L., Soka, M. J., Wahl, V., Griffiths, A., Bollinger, L., & Kuhn, J. H. (2020). Ebola virus disease. *Nature Reviews Disease Primers*, *6*(1). https://doi.org/10.1038/s41572-020-0147-3

Jacobs, M., Rodger, A., Bell, D. J., Bhagani, S., Cropley, I., Filipe, A., Gifford, R. J., Hopkins, S., Hughes, J., Jabeen, F., Johannessen, I., Karageorgopoulos, D., Lackenby, A., Lester, R., Liu, R. S. N., MacConnachie, A., Mahungu, T., Martin, D., Marshall, N., … Thomson, E. C. (2016). Late Ebola virus relapse causing meningoencephalitis: A case report. *The Lancet*, *388*(10043), 498–503. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30386-5

Jahrling, P. B., Geisbert, T. W., Johnson, E. D., Peters, C. J., Dalgard, D. W., & Hall, W. C. (1990). Preliminary report: Isolation of Ebola virus from monkeys imported to USA. *The Lancet*, *335*(8688), 502–505. https://doi.org/10.1016/0140-6736(90)90737-P

Jahrling, P. B., Huggins, J. W., Ibrahim, M. S., Lawler, J., & Martin, J. W. (2009). *SMALLPOX AND RELATED ORTHOPOXVIRUSES*. https://api.semanticscholar.org/CorpusID:3217900

Jain, S., Martynova, E., Rizvanov, A., Khaiboullina, S., & Baranwal, M. (2021). Structural and Functional Aspects of Ebola Virus Proteins. *Pathogens*, *10*(10), 1330. https://doi.org/10.3390/pathogens10101330

James, A. S., Todd, S., Pollak, N. M., Marsh, G. A., & Macdonald, J. (2018). Ebolavirus diagnosis made simple, comparable and faster than molecular detection methods: Preparing for the future. *Virology Journal*, *15*(1), 75. https://doi.org/10.1186/s12985-018-0985-8

Jezek, Z., Grab, B., Szczeniowski, M. V., Paluku, K. M., & Mutombo, M. (1988). Human monkeypox: Secondary attack rates. *Bulletin of the World Health Organization*, *66*(4), 465–470.

Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990–993. https://doi.org/10.1038/nature06536

Jonsson, C. B., Figueiredo, L. T. M., & Vapalahti, O. (2010). A Global Perspective on Hantavirus Ecology, Epidemiology, and Disease. *Clinical Microbiology Reviews*, *23*(2), 412–441. https://doi.org/10.1128/CMR.00062-09

Judson, S. D., & Munster, V. J. (2023). The Multiple Origins of Ebola Disease Outbreaks. *The Journal of Infectious Diseases*, *228*(Supplement_7), S465–S473. https://doi.org/10.1093/infdis/jiad352

Kabuga, A. I., & El Zowalaty, M. E. (2019). A review of the monkeypox virus and a recent outbreak of skin rash disease in Nigeria. *Journal of Medical Virology*, *91*(4), 533–540. https://doi.org/10.1002/jmv.25348

Kang, J. H., Chang, W. Y., Choi, S., Rho, J., & Lee, K. H. (2015). The 2013-2015 ebola outbreak in West Africa. *Journal of Bacteriology and Virology*, *45*(4), 304–313. https://doi.org/10.4167/jbv.2015.45.4.304

Karagoz, A., Tombuloglu, H., Alsaeed, M., Tombuloglu, G., AlRubaish, A. A., Mahmoud, A., Smajlović, S., Ćordić, S., Rabaan, A. A., & Alsuhaimi, E. (2023). Monkeypox (mpox) virus: Classification, origin, transmission, genome organization, antiviral drugs, and molecular diagnosis. *Journal of Infection and Public Health*, *16*(4), 531–541. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2023.02.003

Kebela, B. (2004). Le profil epidemiologique de monkeypox en RDC 1998–2002. *Bull Epidemiol Republ Democr Congo*, *29*, 2–6.

Keita, A. K., Koundouno, F. R., Faye, M., Düx, A., Hinzmann, J., Diallo, H., Ayouba, A., Le Marcis, F., Soropogui, B., Ifono, K., Diagne, M. M., Sow, M. S., Bore, J. A., Calvignac-Spencer, S., Vidal, N., Camara, J., Keita, M. B., Renevey, A., Diallo, A., … Magassouba, N. F. (2021). Resurgence of Ebola virus in 2021 in Guinea suggests a new

paradigm for outbreaks. *Nature*, *597*(7877), 539–543. https://doi.org/10.1038/s41586-021-03901-9

Keita, A. K., Vidal, N., Toure, A., Diallo, M. S. K., Magassouba, N., Baize, S., Mateo, M., Raoul, H., Mely, S., Subtil, F., Kpamou, C., Koivogui, L., Traore, F., Sow, M. S., Ayouba, A., Etard, J. F., Delaporte, E., Peeters, M., & POSTEBOGUI Study Group. (2019). A 40 months follow-up of Ebola virus disease survivors in Guinea (Postebogui) reveals longterm detection of Ebola viral RNA in semen and breast milk. *Open Forum Infectious Diseases*, ofz482. https://doi.org/10.1093/ofid/ofz482

Kennedy, S. B., Bolay, F., Kieh, M., Grandits, G., Badio, M., Ballou, R., Eckes, R., Feinberg, M., Follmann, D., Grund, B., Gupta, S., Hensley, L., Higgs, E., Janosko, K., Johnson, M., Kateh, F., Logue, J., Marchand, J., Monath, T., … Lane, H. C. (2017). Phase 2 Placebo-Controlled Trial of Two Vaccines to Prevent Ebola in Liberia. *New England Journal of Medicine*, *377*(15), 1438–1447. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1614067

Kerr, P. J., Ghedin, E., DePasse, J. V., Fitch, A., Cattadori, I. M., Hudson, P. J., Tscharke, D. C., Read, A. F., & Holmes, E. C. (2012). Evolutionary History and Attenuation of Myxoma Virus on Two Continents. *PLoS Pathogens*, *8*(10), e1002950. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002950

Khan, A. S., Tshioko, F. K., Heymann, D. L., Le Guenno, B., Nabeth, P., Kerstiëns, B., Fleerackers, Y., Kilmarx, P. H., Rodier, G. R., Nkuku, O., Rollin, P. E., Sanchez, A., Zaki, S. R., Swanepoel, R., Tomori, O., Nichol, S. T., Peters, C. J., Muyembe-Tamfum, J. J., & Ksiazek, T. G. (1999). The Reemergence of Ebola Hemorrhagic Fever, Democratic Republic of the Congo, 1995. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S76–S86. https://doi.org/10.1086/514306

Kibungu, E., Vakaniaki, E., Kinganda-Lusamaki, E., Kalonji-Mukendi, T., Pukuta, E., Hoff, N., Bogoch, I., Cevik, M., Gonsalves, G., Hensley, L., Low, N., Shaw, S., Schillberg, E., Hunter, M., Lunyanga, L., Linsuke, S., Madinga, J., Peeters, M., Cigolo, J.-C. M., … Lushima, R. (2024). Clade I–Associated Mpox Cases Associated with Sexual Contact, the Democratic Republic of the Congo. *Emerging Infectious Disease Journal*, *30*(1). https://doi.org/10.3201/eid3001.231164

Kile, J. C., Fleischauer, A. T., Beard, B., Kuehnert, M. J., Kanwal, R. S., Pontones, P., Messersmith, H. J., Teclaw, R., Karem, K. L., Braden, Z. H., Damon, I., Khan, A. S., & Fischer, M. (2005). Transmission of monkeypox among persons exposed to infected prairie dogs in Indiana in 2003. *Archives of Pediatrics & Adolescent Medicine*, *159*(11), 1022. https://doi.org/10.1001/archpedi.159.11.1022

Kiley, M. P., Regnery, R. L., & Johnson, K. M. (1980). Ebola Virus: Identification of Virion Structural Proteins. *Journal of General Virology*, *49*(2), 333–341. https://doi.org/10.1099/0022-1317-49-2-333

Kinganda-Lusamaki, E., Black, A., Mukadi, D. B., Hadfield, J., Mbala-Kingebeni, P., Pratt, C. B., Aziza, A., Diagne, M. M., White, B., Bisento, N., Nsunda, B., Akonga, M., Faye, M., Faye, O., Edidi-Atani, F., Matondo-Kuamfumu, M., Mambu-Mbika, F., Bulabula, J., Di Paola, N., … Tamfum, J.-J. M. (2021). Integration of genomic sequencing into the response to the Ebola virus outbreak in Nord Kivu, Democratic Republic of the Congo. *Nature Medicine*, *27*(4), 710–716. https://doi.org/10.1038/s41591-021-01302-z

Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y. I., Yutin, N., Zerbini, F. M., & Kuhn, J. H. (2019). *Create a megataxonomic framework, filling all principal taxonomic ranks, for DNA viruses encoding vertical jelly roll-type major capsid proteins*. https://doi.org/10.13140/RG.2.2.14886.47684

Koonin, E. V., Dolja, V. V., Krupovic, M., Varsani, A., Wolf, Y. I., Yutin, N., Zerbini, F. M., & Kuhn, J. H. (2020). Global Organization and Proposed Megataxonomy of the Virus World. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *84*(2), e00061-19. https://doi.org/10.1128/MMBR.00061-19

Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Williams, A. J., Bressler, D. S., Martin, M. L., Swanepoel, R., Burt, F. J., Leman, P. A., Khan, A. S., Rowe, A. K., Mukunu, R., Sanchez, A., & Peters, C. J. (1999). Clinical Virology of Ebola Hemorrhagic Fever (EHF): Virus, Virus Antigen, and IgG and IgM Antibody Findings among EHF Patients in Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S177–S187. https://doi.org/10.1086/514321

Kugelman, J. R., Johnston, S. C., Mulembakani, P. M., Kisalu, N., Lee, M. S., Koroleva, G., McCarthy, S. E., Gestole, M. C., Wolfe, N. D., Fair, J. N., Schneider, B. S., Wright, L. L., Huggins, J., Whitehouse, C. A., Wemakoy, E. O., Muyembe-Tamfum, J. J., Hensley, L. E., Palacios, G. F., & Rimoin, A. W. (2014). Genomic Variability of Monkeypox Virus among Humans, Democratic Republic of the Congo. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(2). https://doi.org/10.3201/eid2002.130118

Kuhn, J. H. (2008a). *Filoviruses: A Compendium of 40 Years of Epidemiological, Clinical, and Laboratory Studies*.

Kuhn, J. H. (2008b). *Filoviruses: A Compendium of 40 Years of Epidemiological, Clinical, and Laboratory Studies*.

Kuhn, J. H., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S. V., Amarasinghe, G. K., Anthony, S. J., Avšič-Županc, T., Ayllón, M. A., Bahl, J., Balkema-Buschmann, A., Ballinger, M. J., Bartonička, T., Basler, C., Bavari, S., Beer, M., Bente, D. A., Bergeron, É., Bird, B. H., Blair, C., … Zhou, X. (2020). 2020 taxonomic update for phylum Negarnaviricota (Riboviria: Orthornavirae), including the large orders Bunyavirales and Mononegavirales. *Archives of Virology*, *165*(12), 3023–3072. https://doi.org/10.1007/s00705-020-04731-2

Kuhn, J. H., Becker, S., Geisbert, T. W., Johnson, K. M., Nichol, S. T., & Peters, C. J. (2011). *Proposal for a revised taxonomy of the family Filoviridae: Classification, names of taxa and viruses, and virus abbreviations*. *155*(12), 2083–2103. https://doi.org/10.1007/s00705-010-0814-x.Proposal

Kulesh, D. A., Loveless, B. M., Norwood, D., Garrison, J., Whitehouse, C. A., Hartmann, C., Mucker, E., Miller, D., Wasieloski, L. P., Huggins, J., Huhn, G., Miser, L. L., Imig, C., Martinez, M., Larsen, T., Rossi, C. A., & Ludwig, G. V. (2004). Monkeypox virus detection in rodents using real-time 3′-minor groove binder TaqMan® assays on the Roche LightCycler. *Laboratory Investigation*, *84*(9), 1200–1208. https://doi.org/10.1038/labinvest.3700143

Kurosaki, Y., Magassouba, N., Bah, H. A., Soropogui, B., Doré, A., Kourouma, F., Cherif, M. S., Keita, S., & Yasuda, J. (2016). Deployment of a Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Test for Ebola Virus Surveillance in Remote Areas

in Guinea. *Journal of Infectious Diseases*, *214*(suppl 3), S229–S233. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw255

Kurosaki, Y., Magassouba, N., Oloniniyi, O. K., Cherif, M. S., Sakabe, S., Takada, A., Hirayama, K., & Yasuda, J. (2016). Development and Evaluation of Reverse Transcription-Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) Assay Coupled with a Portable Device for Rapid Diagnosis of Ebola Virus Disease in Guinea. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *10*(2), e0004472. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004472

Lacroix, A., Mbala Kingebeni, P., Ndimbo Kumugo, S. P., Lempu, G., Butel, C., Serrano, L., Vidal, N., Thaurignac, G., Esteban, A., Mukadi Bamuleka, D., Likofata, J., Delaporte, E., Muyembe Tamfum, J.-J., Ayouba, A., Peeters, M., & Ahuka Mundeke, S. (2021a). Investigating the Circulation of Ebola Viruses in Bats during the Ebola Virus Disease Outbreaks in the Equateur and North Kivu Provinces of the Democratic Republic of Congo from 2018. *Pathogens*, *10*(5), 557. https://doi.org/10.3390/pathogens10050557

Lacroix, A., Mbala Kingebeni, P., Ndimbo Kumugo, S. P., Lempu, G., Butel, C., Serrano, L., Vidal, N., Thaurignac, G., Esteban, A., Mukadi Bamuleka, D., Likofata, J., Delaporte, E., Muyembe Tamfum, J.-J., Ayouba, A., Peeters, M., & Ahuka Mundeke, S. (2021b). Investigating the Circulation of Ebola Viruses in Bats during the Ebola Virus Disease Outbreaks in the Equateur and North Kivu Provinces of the Democratic Republic of Congo from 2018. *Pathogens*, *10*(5), 557. https://doi.org/10.3390/pathogens10050557

Ladnyj, I. D., Ziegler, P., & Kima, E. (1972). A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bulletin of the World Health Organization*, *46*(5), 593–597.

Lahm, S. A., Kombila, M., Swanepoel, R., & Barnes, R. F. W. (2007). Morbidity and mortality of wild animals in relation to outbreaks of Ebola haemorrhagic fever in Gabon, 1994–2003. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *101*(1), 64–78. https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2006.07.002

Lawrence, P., Heung, M., Nave, J., Henkel, C., & Escudero-Pérez, B. (2023). The natural virome and pandemic potential: Disease X. *Current Opinion in Virology*, *63*, 101377. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2023.101377

Learned, L. A., Reynolds, M. G., Wassa, D. W., Li, Y., Olson, V. A., Karem, K., Stempora, L. L., Braden, Z. H., Kline, R., Likos, A., Libama, F., Moudzeo, H., Bolanda, J. D., Tarangonia, P., Boumandoki, P., Formenty, P., Harvey, J. M., & Damon, I. K. (2005). EXTENDED INTERHUMAN TRANSMISSION OF MONKEYPOX IN A HOSPITAL COMMUNITY IN THE REPUBLIC OF THE CONGO, 2003. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *73*(2), 428–434. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2005.73.428

Leirs, H., Mills, J. N., Krebs, J. W., Childs, J. E., Akaibe, D., Woollen, N., Ludwig, G., Peters, C. J., Ksiazek, T. G., & other study group members. (1999). Search for the Ebola Virus Reservoir in Kikwit, Democratic Republic of the Congo: Reflections on a Vertebrate Collection. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S155–S163. https://doi.org/10.1086/514299

Leroy, E. M., Baize, S., Volchkov, V. E., Capron, M., Debré, P., Mccormick, J. B., & Georges, A. J. (2000). Human asymptomatic Ebola infection and strong inflammatory response. *The Lancet*, *355*, 2210–2215.

Leroy, E. M., Epelboin, A., Mondonge, V., Pourrut, X., Gonzalez, J.-P., Muyembe-Tamfum, J.-J., & Formenty, P. (2009). Human Ebola Outbreak Resulting from Direct Exposure to Fruit Bats in Luebo, Democratic Republic of Congo, 2007. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *9*(6), 723–728. https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0167

Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J.-P., & Swanepoel, R. (2005a). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, *438*(7068), 575–576. https://doi.org/10.1038/438575a

Leroy, E. M., Kumulungui, B., Pourrut, X., Rouquet, P., Hassanin, A., Yaba, P., Délicat, A., Paweska, J. T., Gonzalez, J.-P., & Swanepoel, R. (2005b). Fruit bats as reservoirs of Ebola virus. *Nature*, *438*(7068), 575–576. https://doi.org/10.1038/438575a

Leroy, E. M., Rouquet, P., Formenty, P., Souquière, S., Kilbourne, A., Froment, J.-M., Bermejo, M., Smit, S., Karesh, W., Swanepoel, R., Zaki, S. R., & Rollin, P. E. (2004). Multiple Ebola Virus Transmission Events and Rapid Decline of Central African Wildlife. *Science*, *303*(5656), 387. https://doi.org/10.1126/science.1092528

Leroy, É., & Maganga, G. D. (2018). Diversité des modalités de transmission du virus Ébola à l'homme. *Bulletin de l'Académie Vétérinaire de France*, *171*(2), 128–136. https://doi.org/10.4267/2042/69030

Les zoonoses (with Vourc'h, Gwenaël., Jourdain, E., Morand, S., & Moutou, F.). (2021). éditions Quae.

Lewis-Jones, S. (2004). Zoonotic poxvirus infections in humans: *Current Opinion in Infectious Diseases*, *17*(2), 81–89. https://doi.org/10.1097/00001432-200404000-00003

Li, D., Wilkins, K., McCollum, A. M., Osadebe, L., Kabamba, J., Nguete, B., Likafi, T., Balilo, M. P., Lushima, R. S., Malekani, J., Damon, I. K., Vickery, M. C. L., Pukuta, E., Nkawa, F., Karhemere, S., Tamfum, J.-J. M., Okitolonda, E. W., Li, Y., & Reynolds, M. G. (2017). Evaluation of the GeneXpert for Human Monkeypox Diagnosis. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *96*(2), 405–410. https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0567

Li, H., Huang, Q.-Z., Zhang, H., Liu, Z.-X., Chen, X.-H., Ye, L.-L., & Luo, Y. (2023). The land-scape of immune response to monkeypox virus. *eBioMedicine*, *87*, 104424. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2022.104424

Li, J. X., Hou, L. H., Meng, F. Y., Wu, S. P., Hu, Y. M., Liang, Q., Chu, K., Zhang, Z., Xu, J. J., Tang, R., Wang, W. J., Liu, P., Hu, J. L., Luo, L., Jiang, R., Zhu, F. C., & Chen, W. (2017). Immunity duration of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine and a homologous prime-boost immunisation in healthy adults in China: Final report of a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1 trial. *The Lancet Global Health*, *5*(3), e324–e334. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30367-9

Li, Y. H., & Chen, S. P. (2014). Evolutionary history of Ebola virus. *Epidemiology and Infection*, *142*(6), 1138–1145. https://doi.org/10.1017/s0950268813002215

Li, Y., Olson, V. A., Laue, T., Laker, M. T., & Damon, I. K. (2006). Detection of monkeypox virus with real-time PCR assays. *Journal of Clinical Virology*, *36*(3), 194–203. https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.03.012

Li, Y., Zhao, H., Wilkins, K., Hughes, C., & Damon, I. K. (2010). Real-time PCR assays for the specific detection of monkeypox virus West African and Congo Basin strain DNA.

Journal of Virological Methods, *169*(1), 223–227. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2010.07.012

Likos, A. M., Sammons, S. A., Olson, V. A., Frace, A. M., Li, Y., Olsen-Rasmussen, M., Davidson, W., Galloway, R., Khristova, M. L., Reynolds, M. G., Zhao, H., Carroll, D. S., Curns, A., Formenty, P., Esposito, J. J., Regnery, R. L., & Damon, I. K. (2005). A tale of two clades: Monkeypox viruses. *Journal of General Virology*, *86*(10), 2661–2672. https://doi.org/10.1099/vir.0.81215-0

Liu, D. X., Cooper, T. K., Perry, D. L., Huzella, L. M., Hischak, A. M. W., Hart, R. J., Isic, N., Byrum, R., Ragland, D., St. Claire, M., Cooper, K., Reeder, R., Logue, J., Jahrling, P. B., Holbrook, M. R., Bennett, R. S., & Hensley, L. E. (2022). Expanded Histopathology and Tropism of Ebola Virus in the Rhesus Macaque Model. *The American Journal of Pathology*, *192*(1), 121–129. https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2021.09.009

Liu, W. J., Sesay, F. R., Coursier, A., Knust, B., Marrinan, J. E., Whitmer, S., McDonald, S. L. R., Gaillard, P., Liu, Y., Su, Q., Zhang, Y., Crozier, I., Ariyarajah, A., Carino, M., Massaquoi, T., Broutet, N., Xu, W., Wu, G., Ströher, U., … Davies, T. (2019). Comprehensive Clinical and Laboratory Follow-up of a Female Patient With Ebola Virus Disease: Sierra Leone Ebola Virus Persistence Study. *Open Forum Infectious Diseases*, *6*(3), ofz068. https://doi.org/10.1093/ofid/ofz068

Lüdtke, A., Ruibal, P., Wozniak, D. M., Pallasch, E., Wurr, S., Bockholt, S., Gómez-Medina, S., Qiu, X., Kobinger, G. P., Rodríguez, E., Günther, S., Krasemann, S., Idoyaga, J., Oestereich, L., & Muñoz-Fontela, C. (2017a). Ebola virus infection kinetics in chimeric mice reveal a key role of T cells as barriers for virus dissemination. *Scientific Reports*, *7*(1), 43776. https://doi.org/10.1038/srep43776

Lüdtke, A., Ruibal, P., Wozniak, D. M., Pallasch, E., Wurr, S., Bockholt, S., Gómez-Medina, S., Qiu, X., Kobinger, G. P., Rodríguez, E., Günther, S., Krasemann, S., Idoyaga, J., Oestereich, L., & Muñoz-Fontela, C. (2017b). Ebola virus infection kinetics in chimeric mice reveal a key role of T cells as barriers for virus dissemination. *Scientific Reports*, *7*(1), 43776. https://doi.org/10.1038/srep43776

M. Johnson, K., A. Webb, P., Lange, J. V., & F. A. Murphy. (1977a). Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *The Lancet*, *309*(5), 569–571.

M. Johnson, K., A. Webb, P., Lange, J. V., & F. A. Murphy. (1977b). Isolation and partial characterisation of a new virus causing acute haemorrhagic fever in Zaire. *The Lancet*, *309*(5), 569–571.

MacNeil, A., Farnon, E. C., Wamala, J., Okware, S., Cannon, D. L., Reed, Z., Towner, J. S., Tappero, J. W., Lutwama, J., Downing, R., Nichol, S. T., Ksiazek, T. G., & Rollin, P. E. (2010). Proportion of deaths and clinical features in Bundibugyo Ebola virus infection, Uganda. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(12), 1969–1972. https://doi.org/10.3201/eid1612.100627

MacNeil, A., Reynolds, M. G., Carroll, D. S., Karem, K., Braden, Z., Lash, R., Moundeli, A., Mombouli, J.-V., Jumaan, A. O., Schmid, D. S., & Damon, I. K. (2009). Monkeypox or varicella? Lessons from a rash outbreak investigation in the Republic of the Congo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *80*(4), 503–507.

Maganga, G. D., Kapetshi, J., Berthet, N., Ilunga, B. K., Kabange, F., Kingebeni, P. M., Mondonge, V., Muyembe, J.-J. T., Bertherat, E., Briand, S., Cabore, J., Epelboin, A., Formenty, P., Kobinger, G., González-Angulo, L., Labouba, I., Manuguerra, J.-C., Okwo-Bele, J.-M., Dye, C., & Leroy, E. M. (2014). Ebola virus disease in the Democratic Republic of Congo. *New England Journal of Medicine*, *371*(22). https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411099

Magnus, P. V., Andersen, E. K., Petersen, K. B., & Birch-Andersen, A. (1959). A POX-LIKE DISEASE IN CYNOMOLGUS MONKEYS. *Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica*, *46*(2), 156–176. https://doi.org/10.1111/j.1699-0463.1959.tb00328.x

Maksyutov, R. A., Gavrilova, E. V., & Shchelkunov, S. N. (2016). Species-specific differentiation of variola, monkeypox, and varicella-zoster viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*, *236*, 215–220. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2016.07.024

Malik, S., Kishore, S., Nag, S., Dhasmana, A., Preetam, S., Mitra, O., León-Figueroa, D. A., Mohanty, A., Chattu, V. K., Assefi, M., Padhi, B. K., & Sah, R. (2023). Ebola Virus Disease Vaccines: Development, Current Perspectives & Challenges. *Vaccines*, *11*(2), 268. https://doi.org/10.3390/vaccines11020268

Malvy, D., McElroy, A. K., de Clerck, H., Günther, S., & van Griensven, J. (2019a). Ebola virus disease. *The Lancet*, *393*(10174), 936–948. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33132-5

Malvy, D., McElroy, A. K., de Clerck, H., Günther, S., & van Griensven, J. (2019b). Ebola virus disease. *The Lancet*, *393*(10174), 936–948. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)33132-5

Mari Saez, A., Weiss, S., Nowak, K., Lapeyre, V., Zimmermann, F., Dux, A., Kuhl, H. S., Kaba, M., Regnaut, S., Merkel, K., Sachse, A., Thiesen, U., Villanyi, L., Boesch, C., Dabrowski, P. W., Radonic, A., Nitsche, A., Leendertz, S. A. J., Petterson, S., … Leendertz, F. H. (2015). Investigating the zoonotic origin of the West African Ebola epidemic. *EMBO Molecular Medicine*, *7*(1), 17–23. https://doi.org/10.15252/emmm.201404792

Mariën, J., Laudisoit, A., Patrono, L., Baelo, P., Vredendaal, R. V., Musaba, P., Gembu, G., Mande, C., Ngoy, S., Mussaw, M., Houtte, N. V., De Perre, F. V., Gryseels, S., Muyembe-Tamfum, J., Bottieau, E., Calvignac-Spencer, S., Leendertz, F., Leirs, H., & Verheyen, E. (2024). *Monkeypox viruses circulate in distantly related small mammal species and only diversified recently*. https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-414280/v2

Marzi, A., & Feldmann, H. (2014). Ebola virus vaccines: An overview of current approaches. *Expert Review of Vaccines*, *13*(4), 521–531. https://doi.org/10.1586/14760584.2014.885841

Masirika, L. M., Udahemuka, J. C., Schuele, L., Ndishimye, P., Otani, S., Mbiribindi, J. B., Marekani, J. M., Mambo, L. M., Bubala, N. M., Boter, M., Nieuwenhuijse, D. F., Lang, T., Kalalizi, E. B., Musabyimana, J. P., Aarestrup, F. M., Koopmans, M., Oude Munnink, B. B., & Siangoli, F. B. (2024). Ongoing mpox outbreak in Kamituga, South Kivu province, associated with monkeypox virus of a novel Clade I sub-lineage,

Democratic Republic of the Congo, 2024. *Eurosurveillance*, *29*(11). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2024.29.11.2400106

Mauldin, M. R., McCollum, A. M., Nakazawa, Y. J., Mandra, A., Whitehouse, E. R., Davidson, W., Zhao, H., Gao, J., Li, Y., Doty, J., Yinka-Ogunleye, A., Akinpelu, A., Aruna, O., Naidoo, D., Lewandowski, K., Afrough, B., Graham, V., Aarons, E., Hewson, R., … Reynolds, M. G. (2022). Exportation of Monkeypox Virus From the African Continent. *The Journal of Infectious Diseases*, *225*(8), 1367–1376. https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa559

Mbala-Kingebeni, P. (2020). *Virus Ebola à l'interface homme – faune sauvage et réservoir animal des virus Ebola en République Démocratique du Congo* [Université de Montpellier]. https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02479442/document

Mbala-Kingebeni, P., Aziza, A., Di Paola, N., Wiley, M. R., Makiala-Mandanda, S., Caviness, K., Pratt, C. B., Ladner, J. T., Kugelman, J. R., Prieto, K., Chitty, J. A., Larson, P. A., Beitzel, B., Ayouba, A., Vidal, N., Karhemere, S., Diop, M., Diagne, M. M., Faye, M., … Ahuka-Mundeke, S. (2019). Medical countermeasures during the 2018 Ebola virus disease outbreak in the North Kivu and Ituri Provinces of the Democratic Republic of the Congo: A rapid genomic assessment. *The Lancet Infectious Diseases*, *3099*(19), 1–10. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30118-5

Mbala-Kingebeni, P., Pratt, C., Mutafali-Ruffin, M., Pauthner, M. G., Bile, F., Nkuba-Ndaye, A., Black, A., Kinganda-Lusamaki, E., Faye, M., Aziza, A., Diagne, M. M., Mukadi, D., White, B., Hadfield, J., Gangavarapu, K., Bisento, N., Kazadi, D., Nsunda, B., Akonga, M., … Muyembe Tamfum, J.-J. (2021). Ebola Virus Transmission Initiated by Relapse of Systemic Ebola Virus Disease. *New England Journal of Medicine*, *384*(13), 1240–1247. https://doi.org/10.1056/NEJMoa2024670

M.C., G.-C., A., S., C.Y., L., S., B., E., L., J., L.-S., C., T.-B., A.J., G., S.G., T., S.R., Z., R., S., P.A., L., P.E., R., C.J., P., S.T., N., & T.G., K. (1997). Isolation and phylogenetic characterization of Ebola viruses causing different outbreaks in Gabon. *Emerging Infectious Diseases*, *3*(1), 59–62.

McCollum, A. M., Nakazawa, Y., Ndongala, G. M., Pukuta, E., Karhemere, S., Lushima, R. S., Ilunga, B. K., Kabamba, J., Wilkins, K., Gao, J., Li, Y., Emerson, G., Damon, I. K.,

Carroll, D. S., Reynolds, M. G., Malekani, J., & Tamfum, J.-J. M. (2015). Human Monkeypox in the Kivus, a Conflict Region of the Democratic Republic of the Congo. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *93*(4), 718–721. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0095

McElroy, A. K., Mühlberger, E., & Muñoz-Fontela, C. (2018a). Immune barriers of Ebola virus infection. *Current Opinion in Virology*, *28*, 152–160. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.01.010

McElroy, A. K., Mühlberger, E., & Muñoz-Fontela, C. (2018b). Immune barriers of Ebola virus infection. *Current Opinion in Virology*, *28*, 152–160. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2018.01.010

McInnes, C. J., Damon, I. K., Smith, G. L., McFadden, G., Isaacs, S. N., Roper, R. L., Evans, D. H., Damaso, C. R., Carulei, O., Wise, L. M., & Lefkowitz, E. J. (2023). ICTV Virus Taxonomy Profile: Poxviridae 2023: This article is part of the ICTV Virus Taxonomy Profiles collection. *Journal of General Virology*, *104*(5). https://doi.org/10.1099/jgv.0.001849

Mekibib, B., & Ariën, K. (2016). Aerosol Transmission of Filoviruses. *Viruses*, *8*(5), 148. https://doi.org/10.3390/v8050148

Meyer, H., Perrichot, M., Stemmler, M., Emmerich, P., Schmitz, H., Varaine, F., Shungu, R., Tshioko, F., & Formenty, P. (2002). Outbreaks of Disease Suspected of Being Due to Human Monkeypox Virus Infection in the Democratic Republic of Congo in 2001. *Journal of Clinical Microbiology*, *40*(8), 2919–2921. https://doi.org/10.1128/JCM.40.8.2919-2921.2002

Meyer, H., Ropp, S. L., & Esposito, J. J. (1997). Gene for A-type inclusion body protein is useful for a polymerase chain reaction assay to differentiate orthopoxviruses. *Journal of Virological Methods*, *64*(2), 217–221. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(96)02155-6

Miranda, M. E. G., & Miranda, N. L. J. (2011). Reston Ebolavirus in humans and animals in the Philippines: A review. *Journal of Infectious Diseases*, *204*(SUPPL. 3), 757–760. https://doi.org/10.1093/infdis/jir296

Miranda, MaryE. G., White, MarkE., Dayrit, ManuelM., Hayes, CurtisG., Ksiazek, ThomasG., & Burans, JamesP. (1991). Seroepidemiological study of filovirus related to Ebola in the Philippines. *The Lancet*, *337*(8738), 425–426. https://doi.org/10.1016/0140-6736(91)91199-5

Monadjem, A. (2010). *Bats of central and southern Africa: A biogeographic and taxonomic syntheis*. Witwatersrand University Press.

Moss, B. (2016). Membrane fusion during poxvirus entry. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *60*, 89–96. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.07.015

Moss, B. (2024). Understanding the biology of monkeypox virus to prevent future outbreaks. *Nature Microbiology*, *9*(6), 1408–1416. https://doi.org/10.1038/s41564-024-01690-1

Muehlenbachs, A., De La Rosa Vázquez, O., Bausch, D. G., Schafer, I. J., Paddock, C. D., Nyakio, J. P., Lame, P., Bergeron, E., McCollum, A. M., Goldsmith, C. S., Bollweg, B. C., Prieto, M. A., Lushima, R. S., Ilunga, B. K., Nichol, S. T., Shieh, W.-J., Ströher, U., Rollin, P. E., & Zaki, S. R. (2017). Ebola Virus Disease in Pregnancy: Clinical, Histopathologic, and Immunohistochemical Findings. *Journal of Infectious Diseases*, *215*(1), 64–69. https://doi.org/10.1093/infdis/jiw206

Mukadi-Bamuleka, D., Bulabula-Penge, J., Jacobs, B. K. M., De Weggheleire, A., Edidi-Atani, F., Mambu-Mbika, F., Legand, A., Klena, J. D., Fonjungo, P. N., Mbala-Kingebeni, P., Makiala-Mandanda, S., Kajihara, M., Takada, A., Montgomery, J. M., Formenty, P., Muyembe-Tamfum, J.-J., Ariën, K. K., Van Griensven, J., Ahuka-Mundeke, S., … Nkuba-Ndaye, A. (2023). Head-to-head comparison of diagnostic accuracy of four Ebola virus disease rapid diagnostic tests versus GeneXpert® in eastern Democratic Republic of the Congo outbreaks: A prospective observational study. *eBioMedicine*, *91*, 104568. https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2023.104568

Mukadi-Bamuleka, D., Edidi-Atani, F., Morales-Betoulle, M. E., Legand, A., Nkuba-Ndaye, A., Bulabula-Penge, J., Mbala-Kingebeni, P., Crozier, I., Mambu-Mbika, F., Whitmer, S., Tshiani Mbaya, O., Hensley, L. E., Kitenge-Omasumbu, R., Davey, R., Mulangu, S., Fonjungo, P. N., Wiley, M. R., Klena, J. D., Peeters, M., … Kavunga-Membo, H. (2024). Fatal meningoencephalitis associated with Ebola virus persistence in two

survivors of Ebola virus disease in the Democratic Republic of the Congo: A case report study. *The Lancet Microbe*, 100905. https://doi.org/10.1016/S2666-5247(24)00137-X

Mukinda, V., Mwema, G., Kilundu, M., Heymann, D., Khan, A., & Esposito, J. (1997). Re-emergence of human monkeypox in Zaire in 1996. *The Lancet*, *349*(9063), 1449–1450. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)63725-7

Mulangu, S., Dodd, L. E., Davey, R. T., Tshiani Mbaya, O., Proschan, M., Mukadi, D., Lusakibanza Manzo, M., Nzolo, D., Tshomba Oloma, A., Ibanda, A., Ali, R., Coulibaly, S., Levine, A. C., Grais, R., Diaz, J., Lane, H. C., Muyembe-Tamfum, J.-J., & the PALM Writing Group. (2019). A Randomized, Controlled Trial of Ebola Virus Disease Therapeutics. *New England Journal of Medicine*, *381*(24), 2293–2303. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1910993

Mupapa, K., Mukundu, W., Bwaka, M. A., Kipasa, M., De Roo, A., Kuvula, K., Kibadi, K., Massamba, M., Ndaberey, D., Colebunders, R., & Muyembe-Tamfum, J. J. (1999). Ebola Hemorrhagic Fever and Pregnancy. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S11–S12. https://doi.org/10.1086/514289

Mutombo, M. (1983). HUMAN MONKEYPOX TRANSMITTED BY A CHIMPANZEE IN A TROPICAL RAIN-FOREST AREA OF ZAIRE. *The Lancet*, *321*(8327), 735–737. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(83)92027-5

Mwamba, D., Kebela, B., Shongo, R., Pukuta, E., & Kayembe, N. (2014). Profil épidemiologique du monkeypox en RDC, 2010–2014. *Ann African Med*, *8*(1), 1855–1860.

Nakazawa, Y., Mauldin, M., Emerson, G., Reynolds, M., Lash, R., Gao, J., Zhao, H., Li, Y., Muyembe, J.-J., Kingebeni, P., Wemakoy, O., Malekani, J., Karem, K., Damon, I., & Carroll, D. (2015). A Phylogeographic Investigation of African Monkeypox. *Viruses*, *7*(4), 2168–2184. https://doi.org/10.3390/v7042168

Neubauer, H., Reischl, U., Ropp, S., Esposito, J. J., Wolf, H., & Meyer, H. (1998). Specific detection of monkeypox virus by polymerase chain reaction. *Journal of Virological Methods*, *74*(2), 201–207. https://doi.org/10.1016/S0166-0934(98)00099-8

Ng, O. T., Lee, V., Marimuthu, K., Vasoo, S., Chan, G., Lin, R. T. P., & Leo, Y. S. (2019). A case of imported Monkeypox in Singapore. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(11), 1166. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30537-7

Nkuba-Ndaye, A., Mukadi-Bamuleka, D., Bulabula-Penge, J., Thaurignac, G., Edidi-Atani, F., Mambu-Mbika, F., Danga-Yema, B., Matondo-Kuamfumu, M., Kinganda-Lusamaki, E., Bisento, N., Lumembe-Numbi, R., Kabamba-Lungenyi, G., Kitsa-Mutsumbirwa, D., Kambale-Sivihwa, N., Boillot, F., Delaporte, E., Mbala-Kingebeni, P., Ayouba, A., Peeters, M., & Ahuka-Mundeke, S. (2022). Added Value of an Anti-Ebola Serology for the Management of Clinically Suspected Ebola Virus Disease Patients Discharged as Negative in an Epidemic Context. *The Journal of Infectious Diseases*, *226*(2), 352–356. https://doi.org/10.1093/infdis/jiac057

Nolen, L. D., Osadebe, L., Katomba, J., Likofata, J., Mukadi, D., Monroe, B., Doty, J., Hughes, C. M., Kabamba, J., Malekani, J., Bomponda, P. L., Lokota, J. I., Balilo, M. P., Likafi, T., Lushima, R. S., Ilunga, B. K., Nkawa, F., Pukuta, E., Karhemere, S., … Reynolds, M. G. (2016). Extended Human-to-Human Transmission during a Monkeypox Outbreak in the Democratic Republic of the Congo. *Emerging Infectious Diseases*, *22*(6), 1014–1021. https://doi.org/10.3201/eid2206.150579

Okwor, T., Mbala, P. K., Evans, D. H., & Kindrachuk, J. (2023). A contemporary review of clade-specific virological differences in monkeypox viruses. *Clinical Microbiology and Infection*, *29*(12), 1502–1507. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2023.07.011

Oliveira, G., Rodrigues, R., Lima, M., Drumond, B., & Abrahão, J. (2017). Poxvirus Host Range Genes and Virus–Host Spectrum: A Critical Review. *Viruses*, *9*(11), 331. https://doi.org/10.3390/v9110331

Oloniniyi, O., Kurosaki, Y., Miyamoto, H., Takada, A., & Yasuda, J. (2017). Rapid detection of all known ebolavirus species by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP). *Journal of Virological Methods*, *246*, 8–14.

O'Toole, Á., Neher, R. A., Ndodo, N., Borges, V., Gannon, B., Gomes, J. P., Groves, N., King, D. J., Maloney, D., Lemey, P., Lewandowski, K., Loman, N., Myers, R., Omah, I. F., Suchard, M. A., Worobey, M., Chand, M., Ihekweazu, C., Ulaeto, D., … Rambaut, A. (2023). APOBEC3 deaminase editing in mpox virus as evidence for sustained human

transmission since at least 2016. *Science*, *382*(6670), 595–600. https://doi.org/10.1126/science.adg8116

Oude Munnink, B. B., Masirika, L. M., Bengenya Mbiribindi, J., Belesi Siangoli, F., Ndishimye, P., Udahemuka, J. C., Musabyimana, J. P., M. Aarestrup, F., Nieuwenhuijse, D. F., Schuele, L., Boter, M., & Koopmans, M. (2024, August 5). *Preliminary analysis of full genome sequences of 58 MPXV clade Ib cases from Kamituga and Kamanyola, South-Kivu , DRC*. Virological.Org. https://virological.org/t/preliminary-analysis-of-full-genome-sequences-of-58-mpxv-clade-ib-cases-from-kamituga-and-kamanyola-south-kivu-drc/975

Patel, M., Adnan, M., Aldarhami, A., Bazaid, A., Saeedi, N., Alkayyal, A., Saleh, F., Awadh, I., Saeed, A., & Alshaghdali, K. (2023). Current Insights into Diagnosis, Prevention Strategies, Treatment, Therapeutic Targets, and Challenges of Monkeypox (Mpox) Infections in Human Populations. *Life*, *13*(1), 249. https://doi.org/10.3390/life13010249

Patrono, L. V., Pléh, K., Samuni, L., Ulrich, M., Röthemeier, C., Sachse, A., Muschter, S., Nitsche, A., Couacy-Hymann, E., Boesch, C., Wittig, R. M., Calvignac-Spencer, S., & Leendertz, F. H. (2020). Monkeypox virus emergence in wild chimpanzees reveals distinct clinical outcomes and viral diversity. *Nature Microbiology*, *5*(7), 955–965. https://doi.org/10.1038/s41564-020-0706-0

Pattyn, S., Groen, G. vander, Jacob, W., Piot, P., & Courteille, G. (1977a). ISOLATION OF MARBURG-LIKE VIRUS FROM A CASE OF HEMORRHAGIC FEVER IN ZAIRE. *The Lancet*, *309*(8011), 573–574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92002-5

Pattyn, S., Groen, G. vander, Jacob, W., Piot, P., & Courteille, G. (1977b). ISOLATION OF MARBURG-LIKE VIRUS FROM A CASE OF HEMORRHAGIC FEVER IN ZAIRE. *The Lancet*, *309*(8011), 573–574. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(77)92002-5

Pauli, G., Blümel, J., Burger, R., Drosten, C., Gröner, A., Gürtler, L., Heiden, M., Hildebrandt, M., Jansen, B., Montag-Lessing, T., Offergeld, R., Seitz, R., Schlenkrich, U., Schottstedt, V., Strobel, J., Willkommen, H., & von König, C.-H. W. (2010). Orthopox Viruses: Infections in Humans. *Transfusion Medicine and Hemotherapy : Offizielles*

Organ Der Deutschen Gesellschaft Fur Transfusionsmedizin Und Immunhamatologie, *37*(6), 351–364. https://doi.org/10.1159/000322101

Peeters, M., Champagne, M., Ndong Bass, I., Goumou, S., Ndimbo Kumugo, S.-P., Lacroix, A., Esteban, A., Meta Djomsi, D., Soumah, A. K., Mbala Kingebeni, P., Mba Djonzo, F. A., Lempu, G., Thaurignac, G., Mpoudi Ngole, E., Kouanfack, C., Mukadi Bamuleka, D., Likofata, J., Muyembe Tamfum, J.-J., De Nys, H., … Ayouba, A. (2023). Extensive Survey and Analysis of Factors Associated with Presence of Antibodies to Orthoebolaviruses in Bats from West and Central Africa. *Viruses*, *15*(9), 1927. https://doi.org/10.3390/v15091927

Pischel, L., Martini, B. A., Yu, N., Cacesse, D., Tracy, M., Kharbanda, K., Ahmed, N., Patel, K. M., Grimshaw, A. A., Malik, A. A., Goshua, G., & Omer, S. B. (2024). Vaccine effectiveness of 3rd generation mpox vaccines against mpox and disease severity: A systematic review and meta-analysis. *Vaccine*, *42*(25), 126053. https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2024.06.021

Pittman, P. R., Martin, J. W., Kingebeni, P. M., Tamfum, J.-J. M., Mwema, G., Wan, Q., Ewala, P., Alonga, J., Bilulu, G., Reynolds, M. G., Quinn, X., Norris, S., Townsend, M. B., Satheshkumar, P. S., Wadding, J., Soltis, B., Honko, A., Güereña, F. B., Korman, L., … on behalf of The Kole Human Mpox Infection Study Group. (2023). Clinical characterization and placental pathology of mpox infection in hospitalized patients in the Democratic Republic of the Congo. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *17*(4), e0010384. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010384

Pourrut, X., Souris, M., Towner, J. S., Rollin, P. E., Nichol, S. T., Gonzalez, J.-P., & Leroy, E. (2009). Large serological survey showing cocirculation of Ebola and Marburg viruses in Gabonese bat populations, and a high seroprevalence of both viruses in Rousettus aegyptiacus. *BMC Infectious Diseases*, *9*(1), 159. https://doi.org/10.1186/1471-2334-9-159

Prescott, J., Bushmaker, T., Fischer, R., Miazgowicz, K., Judson, S., & Munster, V. J. (2015). Postmortem Stability of Ebola Virus. *Emerging Infectious Diseases*, *21*(5), 856–859. https://doi.org/10.3201/eid2105.150041

Qin, L., & Evans, D. H. (2014). Genome Scale Patterns of Recombination between Coinfecting Vaccinia Viruses. *Journal of Virology*, *88*(10), 5277–5286. https://doi.org/10.1128/JVI.00022-14

Radonić, A., Metzger, S., Dabrowski, P. W., Couacy-Hymann, E., Schuenadel, L., Kurth, A., Mätz-Rensing, K., Boesch, C., Leendertz, F. H., & Nitsche, A. (2014). Fatal Monkeypox in Wild-Living Sooty Mangabey, Côte d'Ivoire, 2012. *Emerging Infectious Diseases*, *20*(6), 1009–1011. https://doi.org/10.3201/eid2006.131329

Reed, K. D., Melski, J. W., Graham, M. B., Regnery, R. L., Sotir, M. J., Wegner, M. V., Kazmierczak, J. J., Stratman, E. J., Li, Y., Fairley, J. A., Swain, G. R., Olson, V. A., Sargent, E. K., Kehl, S. C., Frace, M. A., Kline, R., Foldy, S. L., Davis, J. P., & Damon, I. K. (2004). The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere. *New England Journal of Medicine*, *350*(4), 342–350. https://doi.org/10.1056/NEJMoa032299

Reiter, P., Turell, M., Coleman, R., Miller, B., Maupin, G., Liz, J., Kuehne, A., Barth, J., Geisbert, J., Dohm, D., Glick, J., Pecor, J., Robbins, R., Jahrling, P., Peters, C., & Ksiazek, T. (1999). Field Investigations of an Outbreak of Ebola Hemorrhagic Fever, Kikwit, Democratic Republic of the Congo, 1995: Arthropod Studies. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S148–S154. https://doi.org/10.1086/514304

Reynolds, M. G., Carroll, D. S., Olson, V. A., Hughes, C., Galley, J., Likos, A., Montgomery, J. M., Suu-Ire, R., Kwasi, M. O., Jeffrey Root, J., Braden, Z., Abel, J., Clemmons, C., Regnery, R., Karem, K., & Damon, I. K. (2010). A Silent Enzootic of an Orthopoxvirus in Ghana, West Africa: Evidence for Multi-Species Involvement in the Absence of Widespread Human Disease. *The American Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *82*(4), 746–754. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2010.09-0716

Reynolds, M. G., Yorita, K. L., Kuehnert, M. J., Davidson, W. B., Huhn, G. D., Holman, R. C., & Damon, I. K. (2006). Clinical Manifestations of Human Monkeypox Influenced by Route of Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *194*(6), 773–780. https://doi.org/10.1086/505880

Rimoin, A. W., Kisalu, N., Kebela-Ilunga, B., Mukaba, T., Wright, L. L., Formenty, P., Wolfe, N. D., Shongo, R. L., Tshioko, F., Okitolonda, E., Muyembe, J.-J., Ryder, R. W., &

Meyer, H. (2007). Endemic Human Monkeypox, Democratic Republic of Congo, 2001–2004. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(6), 934–937. https://doi.org/10.3201/eid1306.061540

Rimoin, A. W., Mulembakani, P. M., Johnston, S. C., Lloyd Smith, J. O., Kisalu, N. K., Kinkela, T. L., Blumberg, S., Thomassen, H. A., Pike, B. L., Fair, J. N., Wolfe, N. D., Shongo, R. L., Graham, B. S., Formenty, P., Okitolonda, E., Hensley, L. E., Meyer, H., Wright, L. L., & Muyembe, J.-J. (2010). Major increase in human monkeypox incidence 30 years after smallpox vaccination campaigns cease in the Democratic Republic of Congo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *107*(37), 16262–16267. https://doi.org/10.1073/pnas.1005769107

Rizk, J. G., Lippi, G., Henry, B. M., Forthal, D. N., & Rizk, Y. (2022). Prevention and Treatment of Monkeypox. *Drugs (New York, N.Y.)*, *82*(9), 957–963. https://doi.org/10.1007/s40265-022-01742-y

Robert Swanepoel, P. A. L., Felicity J. Burt, N. A. Z., Braack, L. E. O., Thomas G. Ksiazek, P. E. R., Sherif R. Zaki, & Peters, C. J. (1996). *Experimental Inoculation of Plants and Animals with Ebola Virus*. *2*(4), 321–325.

Rojek, A., Horby, P., & Dunning, J. (2017). Insights from clinical research completed during the west Africa Ebola virus disease epidemic. *The Lancet Infectious Diseases*, *17*(9), e280–e292. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30234-7

Ropp, S. L., Jin, Q., Knight, J. C., Massung, R. F., & Esposito, J. J. (1995). PCR strategy for identification and differentiation of small pox and other orthopoxviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *33*(8), 2069–2076. https://doi.org/10.1128/jcm.33.8.2069-2076.1995

Rosenbaum, J. T., & Dick, A. D. (2018). The Eyes Have it: A Rheumatologist's View of Uveitis. *Arthritis & Rheumatology*, *70*(10), 1533–1543. https://doi.org/10.1002/art.40568

Rouquet, P., Froment, J.-M., Bermejo, M., Kilbourn, A., Karesh, W., Reed, P., Kumulungui, B., Yaba, P., Délicat, A., Rollin, P. E., & Leroy, E. M. (2005). Wild Animal Mortality Monitoring and Human Ebola Outbreaks, Gabon and Republic of Congo, 2001–2003.

Emerging Infectious Diseases, *11*(2), 283–290. https://doi.org/10.3201/eid1102.040533

Rowe, A. K., Bertolli, J., Khan, A. S., Mukunu, R., Muyembe-Tamfum, J. J., Bressler, D., Williams, A. J., Peters, C. J., Rodriguez, L., Feldmann, H., Nichol, S. T., Rollin, P. E., & Ksiazek, T. G. (1999). Clinical, Virologic, and Immunologic Follow-Up of Convalescent Ebola Hemorrhagic Fever Patients and Their Household Contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S28–S35. https://doi.org/10.1086/514318

Ryabchikova, E. I., Kolesnikova, L. V., & Luchko, S. V. (1999). An Analysis of Features of Pathogenesis in Two Animal Models of Ebola Virus Infection. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S199–S202. https://doi.org/10.1086/514293

Sagui, E., Janvier, F., Baize, S., Foissaud, V., Koulibaly, F., Savini, H., Maugey, N., Aletti, M., Granier, H., & Carmoi, T. (2015). Severe Ebola Virus Infection With Encephalopathy: Evidence for Direct Virus Involvement. *Clinical Infectious Diseases*, *61*(10), 1627–1628. https://doi.org/10.1093/cid/civ606

Sagulenko, P., Puller, V., & Neher, R. A. (2018). TreeTime: Maximum-likelihood phylodynamic analysis. *Virus Evolution*, *4*(1). https://doi.org/10.1093/ve/vex042

Schieffelin, J. S., Shaffer, J. G., Goba, A., Gbakie, M., Gire, S. K., Colubri, A., Sealfon, R. S. G., Kanneh, L., Moigboi, A., Momoh, M., Fullah, M., Moses, L. M., Brown, B. L., Andersen, K. G., Winnicki, S., Schaffner, S. F., Park, D. J., Yozwiak, N. L., Jiang, P.-P., … Garry, R. F. (2014). Clinical Illness and Outcomes in Patients with Ebola in Sierra Leone. *New England Journal of Medicine*. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411680

Seang, S., Burrel, S., Todesco, E., Leducq, V., Monsel, G., Le Pluart, D., Cordevant, C., Pourcher, V., & Palich, R. (2022). Evidence of human-to-dog transmission of monkeypox virus. *The Lancet*, *400*(10353), 658–659. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(22)01487-8

Seet, B. T., Johnston, J. B., Brunetti, C. R., Barrett, J. W., Everett, H., Cameron, C., Sypula, J., Nazarian, S. H., Lucas, A., & McFadden, G. (2003). Poxviruses and Immune Evasion.

Annual Review of Immunology, *21*(1), 377–423. https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.21.120601.141049

Semper, A. E., Broadhurst, M. J., Richards, J., Foster, G. M., Simpson, A. J. H., Logue, C. H., Kelly, J. D., Miller, A., Brooks, T. J. G., Murray, M., & Pollock, N. R. (2016). Performance of the GeneXpert Ebola Assay for Diagnosis of Ebola Virus Disease in Sierra Leone: A Field Evaluation Study. *PLoS Medicine*, *13*(3), 1–15. https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001980

SGI-Mpox. (2024). *Epidémie de Mpox en Republique Démocratique du Congo* (Rapport Hébdomadaire de La Semaine Épidémiologique 27, 2024 24). Ministère de la Santé, Système de Gestion de l'Incident. not published

Sharif, N., Sharif, N., Alzahrani, K. J., Halawani, I. F., Alzahrani, F. M., Díez, I. D. L. T., Lipari, V., Flores, M. A. L., Parvez, A. K., & Dey, S. K. (2023). Molecular epidemiology, transmission and clinical features of 2022-mpox outbreak: A systematic review. *Health Science Reports*, *6*(10), e1603. https://doi.org/10.1002/hsr2.1603

Shchelkunov, S. N. (2013). An Increasing Danger of Zoonotic Orthopoxvirus Infections. *PLoS Pathogens*, *9*(12), e1003756. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003756

Shchelkunov, S. N., Shcherbakov, D. N., Maksyutov, R. A., & Gavrilova, E. V. (2011). Species-specific identification of variola, monkeypox, cowpox, and vaccinia viruses by multiplex real-time PCR assay. *Journal of Virological Methods*, *175*(2), 163–169. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2011.05.002

Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V., Safronov, P. F., Mikheev, M. V., Gutorov, V. V., Ryazankina, O. I., Petrov, N. A., Babkin, I. V., Uvarova, E. A., Sandakhchiev, L. S., Sisler, J. R., Esposito, J. J., Damon, I. K., Jahrling, P. B., & Moss, B. (2002). Analysis of the Monkeypox Virus Genome. *Virology*, *297*(2), 172–194. https://doi.org/10.1006/viro.2002.1446

Shchelkunov, S., Totmenin, A., Babkin, I., Safronov, P., Ryazankina, O., Petrov, N., Gutorov, V., Uvarova, E., Mikheev, M., Sisler, J., Esposito, J., Jahrling, P., Moss, B., & Sandakhchiev, L. (2001). Human monkeypox and smallpox viruses: Genomic

comparison. *FEBS Letters*, *509*, 66–70. https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03144-1

Shchelkunova, G. A., & Shchelkunov, S. N. (2022). Smallpox, Monkeypox and Other Human Orthopoxvirus Infections. *Viruses*, *15*(1), 103. https://doi.org/10.3390/v15010103

Shipley, R., Wright, E., Selden, D., Wu, G., Aegerter, J., Fooks, A. R., & Banyard, A. C. (2019). Bats and Viruses: Emergence of Novel Lyssaviruses and Association of Bats with Viral Zoonoses in the EU. *Tropical Medicine and Infectious Disease*, *4*(1), 31. https://doi.org/10.3390/tropicalmed4010031

Silva, N. I. O., De Oliveira, J. S., Kroon, E. G., Trindade, G. D. S., & Drumond, B. P. (2020). Here, There, and Everywhere: The Wide Host Range and Geographic Distribution of Zoonotic Orthopoxviruses. *Viruses*, *13*(1), 43. https://doi.org/10.3390/v13010043

Sissoko, D., Duraffour, S., Kerber, R., Kolie, J. S., Beavogui, A. H., Camara, A. M., Colin, G., Rieger, T., Oestereich, L., Pályi, B., Wurr, S., Guedj, J., Nguyen, T. H. T., Eggo, R. M., Watson, C. H., Edmunds, W. J., Bore, J. A., Koundouno, F. R., Cabeza-Cabrerizo, M., … Günther, S. (2017). Persistence and clearance of Ebola virus RNA from seminal fluid of Ebola virus disease survivors: A longitudinal analysis and modelling study. *The Lancet Global Health*, *5*(1), e80–e88. https://doi.org/10.1016/S2214-109X(16)30243-1

Sissoko, D., Keïta, M., Diallo, B., Aliabadi, N., Fitter, D. L., Dahl, B. A., Akoi Bore, J., Raymond Koundouno, F., Singethan, K., Meisel, S., Enkirch, T., Mazzarelli, A., Amburgey, V., Faye, O., Alpha Sall, A., Magassouba, N., Carroll, M. W., Anglaret, X., Malvy, D., … Duraffour, S. (2016). Ebola Virus Persistence in Breast Milk After No Reported Illness: A Likely Source of Virus Transmission From Mother to Child. *Clinical Infectious Diseases*, ciw793. https://doi.org/10.1093/cid/ciw793

Sklenovská, N. (2020). Monkeypox Virus. In Y. S. Malik, R. K. Singh, & K. Dhama (Eds.), *Animal-Origin Viral Zoonoses* (pp. 39–68). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-2651-0_2

Sklenovská, N., & Van Ranst, M. (2018). Emergence of Monkeypox as the Most Important Orthopoxvirus Infection in Humans. *Frontiers in Public Health*, *6*, 241. https://doi.org/10.3389/fpubh.2018.00241

Spengler, J. R., Saturday, G., Lavender, K. J., Martellaro, C., Keck, J. G., Nichol, S. T., Spiropoulou, C. F., Feldmann, H., & Prescott, J. (2018). Severity of Disease in Humanized Mice Infected With Ebola Virus or Reston Virus Is Associated With Magnitude of Early Viral Replication in Liver. *The Journal of Infectious Diseases*, *217*(1), 58–63. https://doi.org/10.1093/infdis/jix562

Sullivan, N. J., Sanchez, A., Rollin, P. E., Yang, Z., & Nabel, G. J. (2000). Development of a preventive vaccine for Ebola virus infection in primates. *Nature*, *408*(6812), 605–609. https://doi.org/10.1038/35046108

Suzuki, Y., & Gojobori, T. (1997). The origin and evolution of Ebola and Marburg viruses. *Molecular Biology and Evolution*, *14*(8), 800–806. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025820

Swanepoel, R., Smit, S. B., Rollin, P. E., Formenty, P., Leman, P. A., Kemp, A., Burt, F. J., Grobbelaar, A. A., Croft, J., Bausch, D. G., Zeller, H., Leirs, H., Braack, L. E. O., Libande, M. L., Zaki, S., Nichol, S. T., Ksiazek, T. G., Paweska, J. T., on behalf of the International Scientific, & Technical Committee for Marburg Hemorrhagic Fever Control in the Democratic Republic of the Congo. (2007). Studies of Reservoir Hosts for Marburg Virus. *Emerging Infectious Diseases*, *13*(12), 1847–1851. https://doi.org/10.3201/eid1312.071115

Talani, P., Maniane-Nanga, J., Konongo, J., Gromyko, A., & Yala, F. (1999). Prevalence des anticorps specifiques du monkeypox au Congo-Brazzaville. *Médecine d'Afrique Noire*, *46*(8–9), 421–423.

Tamfum, J.-J. M., Kabamba, J., Likofata, J., Katomba, J., McCollum, A. M., Monroe, B., Kalemba, L., Mukadi, D., Nolen, L. D., Bomponda, P. L., Balilo, M. P., Doty, J., Malekani, J., Lushima, R. S., Lokota, J. I., Likafi, T., Osadebe, L., Okitolonda, E. W., & Reynolds, M. G. (2015). Introduction of Monkeypox into a Community and Household: Risk Factors and Zoonotic Reservoirs in the Democratic Republic of the

Congo. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, *93*(2), 410–415. https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0168

Tapia, M. D., Sow, S. O., Lyke, K. E., Haidara, F. C., Diallo, F., Doumbia, M., Traore, A., Coulibaly, F., Kodio, M., Onwuchekwa, U., Sztein, M. B., Wahid, R., Campbell, J. D., Kieny, M. P., Moorthy, V., Imoukhuede, E. B., Rampling, T., Roman, F., De Ryck, I., … Levine, M. M. (2016). Use of ChAd3-EBO-Z Ebola virus vaccine in Malian and US adults, and boosting of Malian adults with MVA-BN-Filo: A phase 1, single-blind, randomised trial, a phase 1b, open-label and double-blind, dose-escalation trial, and a nested, randomised, double-bli. *The Lancet Infectious Diseases*, *16*(1), 31–42. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(15)00362-X

The international outbreak response team,. (2003). Outbreak(s) of Ebola haemorrhagicfever, Congo and Gabon,October 2001–July 2002. *Weekly Epidemiological Record*, *26*.

The PREVAIL II Writing Group, for the M.-N. P. I. S. T. (2015). A Randomized, Controlled Trial of ZMapp for Ebola Virus Infection. *N Engl J Med.*, *40*(4), 1291–1296. https://doi.org/10.1097/CCM.0b013e31823da96d.Hydrogen

Towner, J. S., Amman, B. R., Sealy, T. K., Carroll, S. A. R., Comer, J. A., Kemp, A., Swanepoel, R., Paddock, C. D., Balinandi, S., Khristova, M. L., Formenty, P. B. H., Albarino, C. G., Miller, D. M., Reed, Z. D., Kayiwa, J. T., Mills, J. N., Cannon, D. L., Greer, P. W., Byaruhanga, E., … Rollin, P. E. (2009). Isolation of Genetically Diverse Marburg Viruses from Egyptian Fruit Bats. *PLoS Pathogens*, *5*(7), e1000536. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000536

Traité de virologie médicale (2e éd). (2019). Société française de microbiologie Société française de virologie.

Trial, C., Griensven, J. V., Bah, E. I., Haba, N., Delamou, A., Camara, B. S., Olivier, K. J., Clerck, H. D., Nordenstedt, H., Semple, M. G., Herp, M. V., Buyze, J., & Crop, M. D. (2017). *Electrolyte and Metabolic Disturbances in Ebola Patients*. *22*(12).

Tsuda, Y., Caposio, P., Parkins, C. J., Botto, S., Messaoudi, I., Cicin-Sain, L., Feldmann, H., & Jarvis, M. A. (2011). A Replicating Cytomegalovirus-Based Vaccine Encoding a Single Ebola Virus Nucleoprotein CTL Epitope Confers Protection against Ebola Virus.

PLoS Neglected Tropical Diseases, *5*(8), e1275. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001275

Twist Bioscience. (2021). *Twist Pan-Viral Panel Confident identification of over 1,000 viral human pathogens from a single sample*. https://www.twistbioscience.com/sites/default/files/resources/2021-12/ProductSheet_NGS_PanViralPanel_30NOV21_Rev2.0.pdf).

Ulaeto, D., Agafonov, A., Burchfield, J., Carter, L., Happi, C., Jakob, R., Krpelanova, E., Kuppalli, K., Lefkowitz, E. J., Mauldin, M. R., De Oliveira, T., Onoja, B., Otieno, J., Rambaut, A., Subissi, L., Yinka-Ogunleye, A., & Lewis, R. F. (2023). New nomenclature for mpox (monkeypox) and monkeypox virus clades. *The Lancet Infectious Diseases*, *23*(3), 273–275. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(23)00055-5

Vakaniaki, E. H., Kacita, C., Kinganda-Lusamaki, E., O'Toole, Á., Wawina-Bokalanga, T., Mukadi-Bamuleka, D., Amuri-Aziza, A., Malyamungu-Bubala, N., Mweshi-Kumbana, F., Mutimbwa-Mambo, L., Belesi-Siangoli, F., Mujula, Y., Parker, E., Muswamba-Kayembe, P.-C., Nundu, S. S., Lushima, R. S., Makangara-Cigolo, J.-C., Mulopo-Mukanya, N., Pukuta-Simbu, E., … Mbala-Kingebeni, P. (2024). Sustained Human Outbreak of a New MPXV Clade I Lineage in the Eastern Democratic Republic of the Congo. *Nature Medicine*. https://doi.org/10.1038/s41591-024-03130-3

Vallée, G., Norris, P., Paszkowski, P., Noyce, R. S., & Evans, D. H. (2021). Vaccinia Virus Gene Acquisition through Nonhomologous Recombination. *Journal of Virology*, *95*(14), e00318-21. https://doi.org/10.1128/JVI.00318-21

Vaughan, A., Aarons, E., Astbury, J., Balasegaram, S., Beadsworth, M., Beck, C. R., Chand, M., O'Connor, C., Dunning, J., Ghebrehewet, S., Harper, N., Howlett-Shipley, R., Ihekweazu, C., Jacobs, M., Kaindama, L., Katwa, P., Khoo, S., Lamb, L., Mawdsley, S., … Wilburn, J. (2018). Two cases of monkeypox imported to the United Kingdom, September 2018. *Eurosurveillance*, *23*(38). https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.38.1800509

Wamala, J. F., Lukwago, L., Malimbo, M., Nguku, P., Yoti, Z., Musenero, M., Amone, J., Mbabazi, W., Nanyunja, M., Zaramba, S., Opio, A., Lutwama, J. J., Talisuna, A. O., & Okware, S. I. (2010). Ebola hemorrhagic fever associated with novel virus strain,

Uganda, 2007-2008. *Emerging Infectious Diseases*, *16*(7), 1087–1092. https://doi.org/10.3201/eid1607.091525

Wang, Y., Li, J., Hu, Y., Liang, Q., Wei, M., & Zhu, F. (2017). Ebola vaccines in clinical trial: The promising candidates. *Human Vaccines and Immunotherapeutics*, *13*(1), 153–168. https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1225637

Wanninger, T. G., Millian, D. E., Saldarriaga, O. A., Maruyama, J., Saito, T., Reyna, R. A., Taniguchi, S., Arroyave, E., Connolly, M. E., Stevenson, H. L., & Paessler, S. (2022). Macrophage infection, activation, and histopathological findings in ebolavirus infection. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 1023557. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.1023557

Warfield, K. L., & Aman, M. J. (2011). Advances in Virus-Like Particle Vaccines for Filoviruses. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(suppl_3), S1053–S1059. https://doi.org/10.1093/infdis/jir346

Warfield, K. L., Swenson, D. L., Olinger, G. G., Kalina, W. V., Aman, M. J., & Bavari, S. (2007). Ebola Virus-Like Particle–Based Vaccine Protects Nonhuman Primates against Lethal Ebola Virus Challenge. *The Journal of Infectious Diseases*, *196*(s2), S430–S437. https://doi.org/10.1086/520583

Weinstein, R. A., Nalca, A., Rimoin, A. W., Bavari, S., & Whitehouse, C. A. (2005). Reemergence of Monkeypox: Prevalence, Diagnostics, and Countermeasures. *Clinical Infectious Diseases*, *41*(12), 1765–1771. https://doi.org/10.1086/498155

WHO (Ed.). (1980). *The global eradication of smallpox: Final report of the Global Commission for the Certification of Smallpox Eradication, Geneva, December 1979*. WHO.

WHO. (2018a). *International meeting on persistence of Ebola virus RNA in semen and implications for public health*. https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/272716/WHO-VHF-2018.1-eng.pdf?sequence=1

WHO. (2018b). *Managing epidemics: Key facts about major deadly diseases*. World Health Organization. https://iris.who.int/handle/10665/272442

WHO. (2019). *Optimized supportive care for Ebola virus disease: Clinical management standard operating procedures*. World Health Organization. https://iris.who.int/handle/10665/325000

WHO. (2020, July 29). *Zoonoses*. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zoonoses

WHO. (2022a). *2022 Mpox Outbreak: Global Trends.* https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/

WHO. (2022b). *Laboratory testing for the monkeypox virus: Interim guidance, 23 May 2022* (p. 6 p.) [Technical documents]. World Health Organization.

WHO. (2022c, July 23). *WHO Director-General's statement at the press conference following IHR Emergency Committee regarding the multi-country outbreak of monkeypox*. Https://Www.Who.Int/. https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-statement-on-the-press-conference-following-IHR-emergency-committee-regarding-the-multi--country-outbreak-of-monkeypox--23-july-2022

WHO. (2022d, August 12). *Monkeypox: Experts give virus variants new names*. https://www.who.int/news/item/12-08-2022-monkeypox--experts-give-virus-variants-new-names

WHO. (2023, November 20). *2022-23 Mpox (Monkeypox) Outbreak: Global Trends*. https://worldhealthorg.shinyapps.io/mpx_global/#5_Genomic_epidemiology

WHO. (2024a). *Mpox: Multi-country external situation report* (Situation Report 39). https://cdn.who.int/media/docs/default-source/documents/emergencies/20241006_mpox_external-sitrep_-39.pdf?sfvrsn=a07716dc_1&download=true

WHO. (2024b). *Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts*. who.int. https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts

WHO. (2024c, June 14). *Mpox—Democratic Republic of the Congo*. Disease Outbreak News. https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2024-DON522

WHO. (2024d, August 7). *WHO Director-General's opening remarks at the media briefing*. https://www.who.int/director-general/speeches/detail/who-director-general-s-opening-remarks-at-the-media-briefing---7-august-2024

WHO. (2024e, August 14). *WHO Director-General declares mpox outbreak a public health emergency of international concern.* https://www.who.int/news/item/14-08-2024-who-director-general-declares-mpox-outbreak-a-public-health-emergency-of-international-concern

WHO Ebola Response Team. (2014). Ebola Virus Disease in West Africa—The First 9 Months of the Epidemic and Forward Projections. *New England Journal of Medicine*, *371*(16), 1481–1495. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1411100

WHO Team, W. I. S. (1978). *Ebola haemorrhagic fever in Sudan , 1976*. *56*(November 1976).

WHO/International Study Team. (1978). Ebola haemorrhagic fever in Sudan , 1976. *Bulletin of the World Health Organization*, *56*(2), 247–270.

Wong, A., Li, X., Lau, S., & Woo, P. (2019). Global Epidemiology of Bat Coronaviruses. *Viruses*, *11*(2), 174. https://doi.org/10.3390/v11020174

Woo, A. C., Gaia, M., Guglielmini, J., Da Cunha, V., & Forterre, P. (2021). Phylogeny of the Varidnaviria Morphogenesis Module: Congruence and Incongruence With the Tree of Life and Viral Taxonomy. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 704052. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.704052

World Health Organization. (1978). *Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976* (pp. 271–293).

World Health Organization. (1990). Viral haemorrhagic fever in imported monkeys. *Weekly Epidemiological Record*, *19*(7), 45–52.

World Health Organization. (2005). Outbreak of Ebola haemorrhagic fever in Yambio, south Sudan, April—June 2004 = Flambée de fièvre hémorragique à virus Ebola à Yambio, sud du Soudan, avril-juin 2004. *Weekly Epidemiological Record = Relevé Épidémiologique Hebdomadaire*, *80*(43), 370–375.

World Health Organization. (2020). *Guidelines for the management of pregnant and breastfeeding women in the context of Ebola virus disease*. World Health Organization. https://iris.who.int/handle/10665/330851

Yang, C.-H., Song, A.-L., Qiu, Y., & Ge, X.-Y. (2024). Cross-species transmission and host range genes in poxviruses. *Virologica Sinica*, *39*(2), 177–193. https://doi.org/10.1016/j.virs.2024.01.007

Yinka-Ogunleye, A., Aruna, O., Dalhat, M., Ogoina, D., McCollum, A., Disu, Y., Mamadu, I., Akinpelu, A., Ahmad, A., Burga, J., Ndoreraho, A., Nkunzimana, E., Manneh, L., Mohammed, A., Adeoye, O., Tom-Aba, D., Silenou, B., Ipadeola, O., Saleh, M., … Satheshkumar, P. S. (2019). Outbreak of human monkeypox in Nigeria in 2017–18: A clinical and epidemiological report. *The Lancet Infectious Diseases*, *19*(8), 872–879. https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30294-4

Zaki, S. R., Shieh, W., Greer, P. W., Goldsmith, C. S., Ferebee, T., Katshitshi, J., Tshioko, F. K., Bwaka, M. A., Swanepoel, R., Calain, P., Khan, A. S., Lloyd, E., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., & Peters, C. J. (1999). A Novel Immunohistochemical Assay for the Detection of Ebola Virus in Skin: Implications for Diagnosis, Spread, and Surveillance of Ebola Hemorrhagic Fever. *The Journal of Infectious Diseases*, *179*(s1), S36–S47. https://doi.org/10.1086/514319

Zeng, X., Blancett, C. D., Koistinen, K. A., Schellhase, C. W., Bearss, J. J., Radoshitzky, S. R., Honnold, S. P., Chance, T. B., Warren, T. K., Froude, J. W., Cashman, K. A., Dye, J. M., Bavari, S., Palacios, G., Kuhn, J. H., & Sun, M. G. (2017). Identification and pathological characterization of persistent asymptomatic Ebola virus infection in rhesus monkeys. *Nature Microbiology*, *2*(9), 17113. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.113

Zhou, Y., & Chen, Z. (2023). Mpox: A review of laboratory detection techniques. *Archives of Virology*, *168*(8), 221. https://doi.org/10.1007/s00705-023-05848-w

Zhu, F. C., Wurie, A. H., Hou, L. H., Liang, Q., Li, Y. H., Russell, J. B. W., Wu, S. P., Li, J. X., Hu, Y. M., Guo, Q., Xu, W. B., Wurie, A. R., Wang, W. J., Zhang, Z., Yin, W. J., Ghazzawi, M., Zhang, X., Duan, L., Wang, J. Z., & Chen, W. (2017). Safety and immunogenicity of a recombinant adenovirus type-5 vector-based Ebola vaccine in

healthy adults in Sierra Leone: A single-centre, randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. *The Lancet*, *389*(10069), 621–628. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)32617-4

Ziegler, P., & Kima, E. (1972). A human infection caused by monkeypox virus in Basankusu Territory, Democratic Republic of the Congo. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, *46*, 593–597.