



**HAL**  
open science

# Modélisation de l'encéphalite japonaise au Cambodge et prédiction des conséquences de son introduction à l'Île de La Réunion

Hélène Ladreyt

► **To cite this version:**

Hélène Ladreyt. Modélisation de l'encéphalite japonaise au Cambodge et prédiction des conséquences de son introduction à l'Île de La Réunion. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2021. Français. NNT : 2021PA120045 . tel-04060548

**HAL Id: tel-04060548**

**<https://theses.hal.science/tel-04060548v1>**

Submitted on 6 Apr 2023

**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.

**THÈSE DE DOCTORAT  
DE L'UNIVERSITÉ PARIS-EST CRÉTEIL**

ÉCOLE DOCTORALE DE SANTÉ PUBLIQUE N°570

Spécialité du doctorat : Epidémiologie

**Hélène LADREYT**

**MODÉLISATION DE L'ENCÉPHALITE JAPONAISE AU CAMBODGE  
ET PRÉDICTION DES CONSÉQUENCES DE SON INTRODUCTION  
A L'ÎLE DE LA RÉUNION**

**Thèse dirigée par M. Benoit DURAND et Mme Véronique CHEVALIER**

Soutenue le 27 septembre 2021 au laboratoire de santé animale de l'Anses (Maisons-Alfort)

**Composition du Jury :**

Mme Laurence MEYER	Professeure, Université Paris Saclay	Présidente
M. Didier FONTENILLE	Directeur de recherche, IRD	Rapporteur
M. Benjamin ROCHE	Directeur de recherche, IRD	Rapporteur
Mme Cécile BECK	Chargée de recherche, ANSES	Examinatrice
Mme Hélène GUIZ	Chargée de recherche, CIRAD	Examinatrice
M. Benoit DURAND	Directeur de recherche, ANSES	Directeur de thèse
Mme Véronique CHEVALIER	Chargée de recherche, CIRAD	Co-directrice de thèse



## Remerciements

J'aimerais remercier tout d'abord mes directeurs de thèse, l'équipe de choc, **Benoit Durand** et **Véronique Chevalier**, de m'avoir tant appris, de m'avoir soutenue et encouragée, et de m'avoir permis de réaliser ce projet si enrichissant avec eux, et cela dans des conditions idéales. Benoit, merci pour ta gentillesse, ta disponibilité, ta patience (il t'en a fallu !) et ton soutien. Je vais pouvoir maintenant entrer dans l'état de guérison comme mes volailles (ou pas !), mais je n'ai pas envie de partir (ne n'inquiète pas, j'y vais quand même) ! Véronique, merci pour ta disponibilité même à plusieurs milliers de km, ta vision des choses, ton soutien (et ton franc parler mais je continue néanmoins de penser qu'on ne parle pas suffisamment de la dépression des porcelets ni du potentiel dilutif du cabri). J'ai pris goût à la recherche, et cela est entièrement votre faute !

Merci aux membres de mon jury : **Laurence Meyer** d'avoir accepté de présider mon jury de thèse, **Didier Fontenille** et **Benjamin Roche** d'avoir accepté d'être les rapporteurs de cette thèse, et **Cécile Beck** et **Hélène Guis** d'avoir accepté d'en être les examinatrices.

Merci à mes co-encadrants pour leur aide à l'élaboration du projet et tout au long de celui-ci, et leur bonne humeur communicative : **Philippe Dussart**, merci d'avoir rendu possible les analyses par l'unité de virologie de l'IPC, de m'avoir aidée à mettre en place les missions de prélèvements, merci pour ta disponibilité, ta bonne humeur et ton goût pour le karaoké. **Sébastien Boyer**, merci pour ton accompagnement, tes conseils, et d'avoir permis ma formation à l'identification des moustiques par **l'équipe d'entomologie de l'IPC**, que je remercie chaleureusement. **Claire Garros**, merci pour ta disponibilité, ton soutien et ton aide tout au long de la thèse, et pour la mise en place du suivi entomologique à La Réunion. **Thierry Baldet**, merci pour l'accueil chaleureux dans l'équipe, ton aide et ta disponibilité. **Annelise Tran**, merci pour ta disponibilité, ton aide et ta gentillesse, ainsi que pour tes formations sur AlboRUN et Ocelet. Merci également aux membres de mon comité de thèse pour leur aide et conseils, **Julien Cappelle** et **Mathieu Andraud**, et merci **Cécile Beck** pour ta disponibilité et ton aide sur les tests sérologiques flavivirus (en tout début de thèse !). Merci à **Didier Fontenille** de m'avoir permis de collaborer avec l'IPC et pour vos conseils.

Je remercie le laboratoire de santé animale de l'**Anses**, l'**Institut Pasteur du Cambodge**, l'UMR ASTRE du **Cirad** à La Réunion et le **Cyroi** d'avoir rendu cette thèse possible et de m'avoir accueillie pendant ces trois ans, ainsi que l'**EDSP** pour son accompagnement et le **Ministère de l'agriculture et de l'alimentation** pour le financement de cette thèse. Je remercie également le **NAHPRI** pour avoir rendu possible l'enquête sérologique au Cambodge, ainsi que la **DAAF de La Réunion**, le **GDS Réunion (Patrice Jonzo)**, l'**ARS (Guillaume Dupuy)**, Avipôle (**Vincent Gallard**) et l'**EPLFPA (Manuela Mandin)** pour m'avoir aidé dans la collecte des données nécessaires à l'adaptation du modèle à La Réunion.

Je remercie chaleureusement toute la famille **EPI** que je suis très triste de quitter, de rendre l'ambiance au « travail » idéale : **Maud**, merci pour ta gentillesse, tes conseils, ton soutien, tant professionnel que personnel (une vraie coach) et ta disponibilité (merci pour les buffers !). Merci **Gina** pour ta bonne humeur éternelle, nos échanges très intéressants, ta vision des choses et tes conseils (et les cours d'espagnol :)), **Laetitia** pour nous faire bien rigoler (et voyager) avec tes milles histoires, merci pour tes conseils et ton aide (ggplot power), **Benoit** bien sûr, **Viviane**, et merci à mes co-doctorants, stagiaires, post-doc ainsi qu'à la team **EpiMAI** d'avoir partagé ce petit voyage avec moi, **Alex**, **Amaias** (Ay dios mio ! tu es mon rayon de soleil), **Amalia**, **Clémence**, **Hélène**, **Erika**, **Billy**, **Noémie**, **Mathilde**, **Malika**, **Alpha**, **Lucie**, **Éloïse**, **Gabriella**, **Cynthia**, **Simone**, **Julie**, **Barbara**, **Maxime**, **Valentine**, **Guillaume**...quelle ambiance !

Je remercie chaleureusement l'équipe de terrain de l'IPC, **Youth**, **Makara**, **Kim On**, **Raya**, **Rithy Choeung**, **Kimhuor Suor**, les vétérinaires du NAHPRI **M. Uk Berlina**, **M. Sophea** et **Mme Sothearos**, et les **vétérinaires locaux** d'avoir rendu possible cette enquête sérologique et de m'avoir aiguillée tout le long, ainsi que les **familles et éleveurs** qui ont accepté de participer à l'enquête, sans qui aucune donnée ne serait disponible pour calibrer nos modèles. Merci pour votre accueil chaleureux et de m'avoir fait découvrir une petite partie du Cambodge. Thank you **Heidi** for your precious help in the analysis of the serological data, for your availability and for having carried out the analysis of the sera with the virology team, **Leangyi Heng** and **Sreymom Ken**, whom I also thank warmly. Merci à l'ensemble des unités d'épidémiologie, de virologie et d'entomologie de l'IPC pour votre accueil et votre aide.

Merci à l'équipe du Cirad de La Réunion : **Nausicaa**, pour la mise en place et la réalisation des piégeages, pour ton accueil et pour m'avoir formée pour la suite ; **Marlène**, pour avoir pris la suite de cette mission, ainsi que **Catherine** et **Anaïs** pour avoir assuré les piégeages en plein confinement ! ainsi que pour votre gentillesse et votre accueil chaleureux ; **Eric**, pour ton accueil, ton soutien, ton aide et ta bonne humeur communicative, **Thierry**, **Annelise**, **Cécile**, ainsi que mes amis **Florent** (merci pour tes cours de SIG!), **Violette**, **Denis**, **Miguy** et **Nathalie**.

Merci à Yves Confesson de m'avoir accompagnée (et supportée dans ce feuilleton interminable) dans la recherche d'un poste à la suite de cette FCPR, ainsi qu'à Sylvie Mialet pour ses conseils et son soutien.

A ma famille, qui a eu la chance de moins me côtoyer pendant ces 3 années que mes encadrants, merci pour votre soutien permanent, d'avoir fait l'effort de venir me voir dans des destinations plutôt désagréables (mais où allez-vous partir cet hiver ??), quand je pense que Marianna, Paul et Nala ont raté La Réunion...

Merci mon Gilles, de me soutenir quotidiennement, de me supporter (même avec un orteil cassé et dans un 26m<sup>2</sup>, bravo !), on fait une belle équipe.

Merci à tous !

## Productions scientifiques

### ARTICLES SCIENTIFIQUES

**Ladreyt H**, Chevalier V, Durand B, Modelling Japanese Encephalitis Virus transmission dynamics and human exposure in a Cambodian rural multi-host system. *Plos Neglected Tropical Diseases*, submitted.

**Ladreyt H**, Auerswald H, Tum S, Ken S, Heng L, In S, Lay S, Top C, Ly S, Duong V, Dussart P, Durand B, Chevalier V, Comparison of Japanese Encephalitis Force of Infection in Pigs, Poultry and Dogs in Cambodian Villages. *Pathogens* **2020**, 9, 719.

Auerswald H, Ruget A-S, **Ladreyt H**, In S, Mao S, Sorn S, Tum S, Duong V, Dussart P, Cappelle J and Chevalier V, Serological Evidence for Japanese Encephalitis and West Nile Virus Infections in Domestic Birds in Cambodia. *Front. Vet. Sci.* **2020**, 7:15.

**Ladreyt H**, Durand B, Dussart P, Chevalier V, How Central Is the Domestic Pig in the Epidemiological Cycle of Japanese Encephalitis Virus? A Review of Scientific Evidence and Implications for Disease Control. *Viruses* **2019**, 11, 949.

### COMMUNICATIONS ORALES

**ModAH<sup>2</sup> 2021** (Modelling in animal health), Modelling Japanese Encephalitis Virus transmission dynamics and human exposure in a Cambodian rural multi-host system, *online*.

**Journées scientifiques et doctorales de l'Anses 2021**, Modelling Japanese Encephalitis Virus transmission dynamics and human exposure in a Cambodian rural multi-host system, *online*.

## Résumé

Malgré l'existence d'un vaccin, le virus de l'encéphalite japonaise (VEJ) reste la principale cause d'encéphalite humaine en Asie avec un taux de létalité pouvant atteindre 30%. Le cycle épidémiologique traditionnellement décrit de cette zoonose à transmission vectorielle est remis en question avec des preuves croissantes de l'implication de systèmes multi-hôtes plus complexes, dans les régions où les densités de porcs (principaux hôtes amplificateurs) ou d'Ardéidés (réservoir généralement décrit) sont faibles. Les porcs jouent un rôle central dans la transmission du VEJ mais des réservoirs secondaires comme les volailles pourraient exister et participer à la circulation du virus. Au Cambodge, le VEJ pourrait se maintenir dans un système multi-hôtes comprenant des porcs et des volailles comme hôtes compétents, mais aussi des chiens, des bovins et des humains comme hôtes non compétents. Nous avons développé un modèle dynamique de la transmission du VEJ dans un village traditionnel de la province de Kandal au Cambodge. Ce modèle a été calibré avec des données démographiques et sérologiques issues d'une enquête que nous avons réalisée en 2018 sur des porcs, des poulets et des canards, ainsi que des chiens dont les sérums avaient été prélevés lors d'une enquête précédente. Le modèle a permis d'analyser les variations du nombre de reproduction de base ( $R_0$ ), du taux d'incidence annuel des infections humaines et de l'impact clinique associé chez l'homme en fonction de la composition du système multi-hôtes. Dans le village modélisé, la circulation endémique du VEJ pourrait être assurée par un système multi-hôtes complexe où les porcs domestiques sont essentiels à la persistance mais où les volailles pourraient agir comme réservoir secondaire. D'après les simulations, l'augmentation de la proportion d'hôtes compétents induisait une concentration des infections chez les enfants. Enfin, selon les prédictions du modèle, la probabilité annuelle d'exposition humaine était linéairement corrélée à la séroprévalence anti-VEJ canine, suggérant que dans notre zone d'étude, la séroprévalence anti-VEJ canine pourrait être un bon proxy de la probabilité annuelle d'exposition des hommes au VEJ. Les nombreux échanges commerciaux et humains dans l'Océan Indien font craindre une introduction du VEJ à l'île de La Réunion, où les vecteurs potentiels et les hôtes (compétents et non compétents) du VEJ sont présents et pourraient constituer un système multi-hôtes permettant la circulation du virus s'il venait à y être introduit. Nous avons adapté le modèle précédemment développé au contexte réunionnais afin d'analyser le risque de circulation du VEJ à La Réunion en cas d'introduction, en calculant des  $R_0$  autour des zones identifiées comme les plus à risque d'émergence : les élevages de porcs et leurs alentours. Le VEJ pourrait circuler au moins autour de certains élevages de porcs, et le risque d'introduction couplé au risque de circulation du VEJ le cas échéant, pose le problème d'une surveillance de l'EJ à La Réunion.

## Abstract

Despite the existence of a vaccine, Japanese encephalitis virus (JEV) remains the leading cause of human encephalitis in Asia with a case fatality rate of up to 30%. The traditionally described epidemiological cycle of this vector-borne zoonosis is being challenged with increasing evidence of the involvement of more complex multi-host systems, in areas with low densities of pigs (the main amplifying host) or Ardeids (the commonly described reservoir). Pigs are central in JEV transmission, but secondary reservoirs such as poultry could exist and participate in virus circulation. In Cambodia, JEV could therefore be maintained in a multi-host system including pigs and poultry as competent hosts, but also dogs, cattle and humans as non-competent hosts (not able to infect back mosquitoes). We developed a dynamic model of JEV transmission in a traditional village in Kandal province, Cambodia. This model was calibrated with demographic and serological data from a survey we conducted in 2018 in pigs, chickens, and ducks, as well as dogs whose sera were collected during a previous survey. The model was used to analyze variations in the basic reproduction number ( $R_0$ ), the annual incidence rate of human infections, and associated clinical impact in humans as a function of the composition of the multi-host system. In the modeled village, endemic JEV circulation could be supported by a complex multi-host system where domestic pigs are essential for persistence but poultry could act as a secondary reservoir. Simulations indicated that increasing the proportion of competent hosts induced a concentration of infections in children. Finally, the model predicted that the annual probability of human exposure was linearly correlated with canine JEV seroprevalence, suggesting that in our study area, canine JEV seroprevalence may be a good proxy for the annual probability of human exposure to JEV. The extensive trade and human exchanges in the Indian Ocean raise concerns about the introduction of JEV to La Reunion Island, where potential vectors and hosts (competent and non-competent) of JEV are present and could constitute a multi-host system allowing the circulation of the virus should it be introduced. We adapted the previously developed model to the Reunion context in order to analyze the risk of circulation of JEV in case of introduction, by calculating  $R_0$  around the areas identified as the most at risk of emergence: pig farms and their surroundings. JEV could circulate at least around some pig farms, and the risk of introduction combined with the risk of JEV circulation, raise the question of JE surveillance in La Reunion.



# TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX .....	12
LISTE DES FIGURES .....	13
LISTE DES ANNEXES .....	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS .....	15
INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	17
1. Zoonoses vectorielles et systèmes multi-hôtes.....	17
2. L'encéphalite japonaise .....	19
3. Cycle épidémiologique de l'encéphalite japonaise .....	21
4. L'encéphalite japonaise au Cambodge.....	23
5. Risque d'émergence de l'encéphalite japonaise à l'île de La Réunion .....	25
6. Stratégie de recherche de la thèse.....	26
CHAPITRE 1 : Quelle est la place du porc domestique dans le cycle épidémiologique du virus de l'encéphalite japonaise ? Bilan et analyses des connaissances et implications pour le contrôle de la maladie. ....	29
1. Introduction .....	29
2. Matériel et méthode.....	29
2.1. Protocole de recherche et bases de données .....	29
2.2. Critères d'inclusion et d'exclusion .....	30
3. Résultats .....	30
3.1. Sélection des études.....	30
3.2. Caractéristiques individuelles de l'infection par le VEJ chez les porcs.....	31
3.3. Mécanismes et schémas de transmission du VEJ et mesures de contrôle ciblant les porcs	38
4. Discussion .....	47
CHAPITRE 2 : Comparaison de la force d'infection par le virus de l'encéphalite japonaise chez les porcs, les volailles et les chiens de villages cambodgiens.....	55
1. Introduction .....	55
2. Matériel et méthode.....	57
2.1. Zone d'étude .....	57
2.2. Prélèvements sanguins des chiens .....	57
2.3. Prélèvements sanguins des porcs, des poulets et des canards domestiques .....	58
2.4. Déclaration d'éthique.....	59
2.5. Analyse de laboratoire des prélèvements sanguins .....	60
2.6. Analyse statistique.....	61

2.7.	Calcul de la force d'infection par unité de surface corporelle .....	62
3.	Résultats .....	63
3.1.	Description des échantillons et de la séroprévalence .....	63
3.2.	Analyse multivariée.....	65
3.3.	Estimation de la force d'infection par les flavivirus et par le VEJ chez les animaux échantillonnés.....	65
3.4.	Force d'infection par surface corporelle (BSA).....	66
3.5.	Force d'infection estimée chez les volailles en 2016 .....	66
4.	Discussion .....	67
CHAPITRE 3 : Modélisation de la dynamique de transmission du virus de l'encéphalite japonaise et de l'exposition humaine dans un système multi-hôtes rural cambodgien. ....		73
1.	Introduction .....	73
2.	Matériel et méthode.....	75
2.1.	Zone d'étude, populations hôtes et données sérologiques .....	75
2.2.	Description du modèle.....	77
2.3.	Paramétrisation .....	82
2.4.	Exploitation du modèle .....	85
3.	Résultats .....	88
3.1.	Estimation des paramètres, ajustement du modèle et analyse de sensibilité .....	88
3.2.	Indicateurs de transmission et d'exposition dans les conditions de terrain.....	90
3.3.	Impact des proportions relatives de BSA d'hôtes compétents et non compétents sur les indicateurs de transmission et d'exposition .....	90
3.4.	Impact des proportions relatives de BSA de porcs, de canards et de poulets parmi les hôtes compétents sur les indicateurs de transmission et d'exposition .....	92
3.5.	Impact des proportions relatives de BSA des bovins et des porcs sur les indicateurs de transmission et d'exposition.....	94
3.6.	Relation entre la séroprévalence anti-VEJ canine et la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ.....	96
4.	Discussion .....	97
CHAPITRE 4 : Risque de circulation du virus de l'encéphalite japonaise suite à son introduction à l'île de La Réunion. ....		105
1.	Introduction .....	105
2.	Matériel et méthode.....	107
2.1.	Système épidémiologique.....	107
2.2.	Données .....	108
2.3.	Description du modèle.....	111
2.4.	Exploitation du modèle .....	114
3.	Résultats .....	116

3.1. Populations d'hôtes et de vecteurs .....	116
3.2. Calculs des $R_0$ et rangs des zones tampons .....	118
4. Discussion .....	121
DISCUSSION GÉNÉRALE .....	129
1. Bilan .....	129
2. Limites et perspectives .....	131
3. Retombées pratiques et recommandations .....	135
4. Conclusion.....	138
BIBLIOGRAPHIE .....	139
ANNEXES .....	163

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1</b> : Virémie et réponse immunitaire chez les porcs après une infection expérimentale par le VEJ. ....	32
<b>Tableau 2</b> : Troubles de la reproduction chez les truies et signes cliniques et lésions chez des porcelets après une infection expérimentale par le VEJ. ....	34
<b>Tableau 3</b> : Détection du VEJ dans les troupeaux de porcs présentant des troubles de la reproduction et quantification de ces troubles. ....	35
<b>Tableau 4</b> : Persistance des anticorps maternels anti-VEJ chez les porcelets dans des conditions de terrain. ....	37
<b>Tableau 5</b> : Démonstrations expérimentales de la transmission directe du VEJ entre porcelets. ....	39
<b>Tableau 6</b> : Taux de séroprévalence du VEJ chez les porcs et sangliers dans le monde. ....	42
<b>Tableau 7</b> : Saisonnalité de la circulation du VEJ chez les porcs par enquêtes sérologiques. ....	44
<b>Tableau 8</b> : Résultats des tests sérologiques pour les taux de séroprévalence anti-flavivirus (mesurés par inhibition de l'hémagglutination (IHA)) et anti-VEJ (mesurés par FRNT).....	63
<b>Tableau 9</b> : Résultats du modèle multivarié pour la séroprévalence anti-flavivirus (mesurée par IHA) et anti-VEJ (mesurée par FRNT) chez les porcs, les volailles et les chiens de la province de Kandal, au Cambodge.....	65
<b>Tableau 10</b> : Estimation des forces d'infection (FOI) mensuelles par les flavivirus et par le VEJ, par espèce. ....	66
<b>Tableau 11</b> : Tailles de populations d'hôtes calculées pour un village traditionnel de chaque district de la zone d'étude, données sérologiques observées issues de Ladreyt et al. (2020) (1), et séroprévalences prédites par le modèle développé dans ce chapitre.....	76
<b>Tableau 12</b> : Paramètres du modèle déterministe .....	82
<b>Tableau 13</b> : Surface corporelle (BSA) calculée pour chaque espèce hôte du modèle .....	86
<b>Tableau 14</b> : Indicateurs calculés et intervalles de confiance à 95% pour la situation observée, <i>i.e.</i> dans les conditions de terrain.....	90
<b>Tableau 15</b> : Paramètres du modèle déterministe adapté à La Réunion (les paramètres en gras sont ceux dont la valeur a été modifiée par rapport au modèle Cambodge).....	112
<b>Tableau 16</b> : Bilan des espèces capturées à La Réunion avec les 3 pièges CDC et 4 pièges BG, du 1er juillet 2019 au 24 juin 2020.....	117
<b>Tableau 17</b> : Moyennes des ratios et des populations de vecteurs estimées pour le système réunion. ....	118
<b>Tableau 18</b> : Taille des populations d'hôtes pour les 9 zones tampons identifiées comme les plus à risque, et valeur moyenne et intervalles de confiance des $R_0$ pour les résultats issus des scénarios 3 (ratios BG été) et 4 (ratios BG hiver). ....	121

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1 :</b> Distribution de l'encéphalite japonaise. Les régions colorées sont celles où le VEJ circule chez l'homme, de manière épidémique ou endémique, et la détection d'un cas autochtone en Angola est représentée par l'étoile colorée.....	20
<b>Figure 2 :</b> Hypothèses sur le cycle de transmission du virus de l'encéphalite japonaise. ....	22
<b>Figure 3 :</b> Diagramme de flux PRISMA représentant le processus de sélection des études. ....	31
<b>Figure 4 :</b> Détection du VEJ chez les porcs de 1966 à 2016, sur la base des études sélectionnées.....	40
<b>Figure 5 :</b> Localisation des sites de prélèvements. ....	58
<b>Figure 6 :</b> Prélèvements sanguins sur porcs et volailles à Kandal avec les membres de l'équipe de l'Institut Pasteur du Cambodge, les vétérinaires officiels de district et de commune, et les responsables d'abattoirs.....	59
<b>Figure 7 :</b> Exemples de basse-cour à Kandal. On observe la proximité entre les différentes espèces (ici porcs, volailles, hommes). ....	78
<b>Figure 8 :</b> Exemple d'élevages de porcs dans la province de Kandal où l'on observe une absence de moustiquaires, une proximité entre les hôtes (ici volailles, porcs et chiens) et une proximité des habitations .....	79
<b>Figure 9 :</b> Diagramme de flux du modèle dynamique de transmission du virus de l'encéphalite japonaise dans un système multi-hôtes.....	81
<b>Figure 10 :</b> Graphique de Morris (gauche) et valeurs de $\mu^*$ (droite) des 9 paramètres les plus influents sur le $R_0$ . ....	89
<b>Figure 11 :</b> $R_0$ , probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ (ligne bleue continue), proportion d'humains sensibles (ligne bleue en pointillés), taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ (ligne rouge) et âge moyen à l'infection, à l'équilibre épidémiologique, en fonction de la proportion d'hôtes compétents dans l'ensemble du système (BSA). ....	92
<b>Figure 12 :</b> $R_0$ , probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ (ligne bleue continue), proportion d'humains sensibles (ligne bleue pointillée), taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ (ligne rouge), et âge moyen à l'infection, à l'équilibre épidémiologique, en fonction de la proportion de porcs parmi les hôtes compétents (BSA), pour trois proportions fixes de poulets parmi les volailles (BSA). ....	94
<b>Figure 13 :</b> $R_0$ , probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ (ligne bleue continue), proportion d'humains sensibles (ligne bleue en pointillés), taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ (ligne rouge) et âge moyen à l'infection, à l'équilibre épidémiologique, en fonction de la proportion de bovins parmi les bovins et les porcs (BSA). ....	95
<b>Figure 14 :</b> Probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ en fonction de la séroprévalence anti-VEJ canine.....	96
<b>Figure 15 :</b> A) Localisation des élevages de porcs, de volailles et de bovins recensés et sites de captures de moustiques (Source GDS Réunion, DAAF, Avipôle) ; B) Carte de densité humaine carroyée au km <sup>2</sup> à La Réunion ; C) Carte de densité des chiens errants estimés dans l'enquête sur l'errance des carnivores domestiques à La Réunion .....	109
<b>Figure 16 :</b> Quatre des sept pièges utilisés pour les captures de moustiques à La Réunion.....	111
<b>Figure 17 :</b> Tailles de populations d'hôtes par zone tampon. ....	116
<b>Figure 18 :</b> <i>Culex</i> spp. mâles et femelles capturés par mois à La Réunion, tous sites et tous pièges confondus (3 CDC et 4 BG) .....	118
<b>Figure 19 :</b> Zones tampons classées dans 3 catégories selon la valeur du $R_0$ calculé.....	119
<b>Figure 20 :</b> Rang des zones tampons (de 1 km de rayon autour des élevages de porcs), classées selon la valeur du $R_0$ calculé.....	120

## LISTE DES ANNEXES

<b>Annexe 1</b> : Variabilité des tests de diagnostic du VEJ pour les porcs.....	163
<b>Annexe 2</b> : Estimation des forces d'infection par les flavivirus par mois chez les poulets et les canards échantillonnés dans la province de Kandal en 2016.....	164
<b>Annexe 3</b> : Forces d'infection (FOI) par les flavivirus et par le VEJ par espèce, dans le district de Khsach Kandal uniquement.....	165
<b>Annexe 4</b> : Equations du modèle déterministe à compartiments (I) et méthode de la « Next Generation Matrix » pour les calculs de $R_0$ (II).....	166
<b>Annexe 5</b> : $R_0$ selon de la proportion de poulets parmi les volailles (BSA), pour cinq proportions de porcs parmi les hôtes compétents (BSA). Le point noir correspond au $R_0$ pour 100% de porcs parmi les hôtes compétents (BSA). ....	170
<b>Annexe 6</b> : Probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ en fonction de la séroprévalence anti-VEJ canine, pour des ratios homme-chien et des tailles de population vectorielle variables.....	170
<b>Annexe 7</b> : Détail des captures de <i>Culex spp.</i> , par site de capture, par piège et par saison de capture.	171
<b>Annexe 8</b> : Rang des zones tampons (de 2 km de rayon autour des élevages de porcs), classées selon la valeur du $R_0$ calculé.....	171
<b>Annexe 9</b> : Articles publiés.....	173

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

Acn : Anticorps neutralisants	jpi : jour post infection
AIC : Critère d'information d' Akaike	LCR : Liquide céphalo rachidien
ARN : Acide ribo-nucléique	LD50 : Dose létale à 50%
ARS : Agence régionale de santé	Micro-VNT : Neutralisation virale en microtitration
BG : Biogents	MVEV : Virus de l'encéphalite Murray Valley
BSA : <i>Body surface area</i> , surface corporelle	NGM : <i>Next generation matrix</i>
CDC : <i>Center for disease control</i>	OIE : Organisation mondiale de la santé animale
CFPPA : Centre de formation professionnelle et de promotion agricole	OR : <i>Odd-ratio</i>
DAAF : Direction de l'agriculture de l'alimentation et de la forêt	PPA : Peste porcine Africaine
ELISA : <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>	PPV : Parvovirus porcin
EPLEFPA : Etablissement public local d'enseignement et de formation professionnelle agricole	PRISMA : <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses</i>
FAO : <i>Food and agriculture organization of the United Nations</i>	PRNT : Test de neutralisation par réduction de plaque
FOI, foi : Force d'infection	PRRSV : Virus du syndrome respiratoire porcin
FRNT : Test de neutralisation par réduction des foyers	PRV : Virus pseudo-rabique
GDAPH : Direction générale de la production et de la santé animales du Cambodge	RT-PCR : <i>reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
GDS : Groupement de défense sanitaire	SC : Sous-cutané
GI à GV : Génotypes I à V	Sd : <i>Standar deviation</i>
IC : Intervalle de confiance	SIG : Système d'information géographique
ICISM : Inoculation intracérébrale au souriceau	SLEV : Virus de l'encéphalite Saint Louis
ID : Intradermique	SNT : Test de séroneutralisation
IgG, IgM : Immunoglobuline G, M	TCID50 : Dose infectieuse à 50% en culture tissulaire
IHA : Test d'inhibition de l'hémagglutination	TR : Trouble de la reproduction
INSEE : Institut national de la statistique et des études économiques	USUTUV : Virus USUTU
IPC : Institut Pasteur Du Cambodge	VEJ : Virus de l'encéphalite japonaise
IRD : Institut de recherche pour le développement	VFVR : Virus de la fièvre de la vallée du Rift
IRIS : Ilots Regroupés pour l'Information Statistique	VN : test de neutralisation virale
IV : Intraveineux	VPPC : Virus de la peste porcine classique
jac : jour après contact	WNV : Virus de la fièvre West Nile
	MVEV : Virus de l'encéphalite Murray Valley
	SLEV : Virus de l'encéphalite Saint Louis



# INTRODUCTION GÉNÉRALE

## 1. Zoonoses vectorielles et systèmes multi-hôtes

Parmi plus de 1400 maladies infectieuses humaines connues, plus des deux tiers sont causées par des agents pathogènes zoonotiques (1–3). Si l'on ne prend en compte que les maladies émergentes ou réémergentes, plus de 70% sont des zoonoses (3,4).

Ces agents pathogènes sont souvent généralistes, c'est à dire qu'ils peuvent infecter un large éventail d'espèces. En effet, plus de 60% d'entre eux possèdent 3 espèces hôtes ou plus, outre l'homme (4). Ces agents pathogènes dits « multi-hôtes » peuvent avoir un impact fort sur la santé publique (comme certains virus influenza d'origine aviaire ou porcine chez l'homme), sur l'économie de l'élevage (comme le virus de la fièvre de la Vallée du Rift chez les ruminants), et la conservation de la faune sauvage (comme le virus de la rougeole chez les grands singes) (5). De plus, la capacité d'un agent pathogène à infecter plusieurs hôtes est reconnue comme un facteur de risque de l'émergence des maladies infectieuses chez l'homme et chez le bétail (6,7).

Les zoonoses à transmission vectorielle figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité chez l'homme et les animaux (8). Elles touchent principalement les régions tropicales et subtropicales, et de manière disproportionnée les populations les plus pauvres.

Certains de leurs agents pathogènes peuvent infecter des hôtes de plusieurs espèces animales (9), comme le virus de la fièvre West Nile (WNV) (infectant oiseaux sauvages et domestiques, ainsi que des mammifères comme l'homme, les chevaux ou les chiens (10–12)) et le virus de la fièvre de la vallée du Rift (VFVR) (infectant les ruminants, petits ruminants et l'homme (13)). Leurs vecteurs sont souvent opportunistes et capables de se nourrir sur différentes espèces selon leur disponibilité (comme *Culex pipiens* pour le WNV aux Etats-Unis (14), et *Culex antennatus* pour le VFVR à Madagascar (15)), et ainsi de leur transmettre les pathogènes qu'ils portent.

Cette écologie particulière induit des systèmes épidémiologiques complexes, qui impliquent donc plusieurs espèces d'hôtes, et la plupart du temps plusieurs espèces de vecteurs. Les hôtes peuvent être compétents, c'est-à-dire capables de développer une virémie suffisante après infection pour réinfecter un vecteur se nourrissant sur eux, mais aussi hôtes « cul-de-sac »

ou non compétents, incapables de réinfecter les vecteurs. La compétence vectorielle est définie comme l'aptitude intrinsèque d'un arthropode à acquérir puis à transmettre un agent pathogène, et est la résultante de 3 composantes : l'attraction du vecteur par l'hôte infectieux, sa capacité à répliquer le pathogène après son repas sanguin, et sa capacité à le transmettre à un hôte lors d'un nouveau repas sanguin (16). Pour cela, le pathogène doit pouvoir passer la barrière digestive, traverser la lame basale entourant l'épithélium de l'intestin moyen pour se disséminer dans le reste du moustique, atteindre les glandes salivaires, s'y multiplier et être excrété avec la salive (17).

La compétence (des vecteurs comme des hôtes) est une caractéristique quantitative et est généralement exprimée sous forme de proportion de vecteurs (respectivement d'hôtes) transmettant le pathogène à un hôte sain (respectivement à un vecteur sain) après une certaine durée d'incubation. La compétence peut varier en fonction des espèces (par exemple, les hôtes « cul-de-sac » ont une compétence nulle), des populations locales et même des individus au sein d'une même espèce (18–20).

Afin de comprendre comment ces zoonoses vectorielles sont transmises au sein de communautés multi-hôtes complexes, il est nécessaire d'aborder leur étude de manière holistique, en prenant en compte l'ensemble des acteurs du cycle ainsi que les facteurs pouvant influencer la dynamique de transmission. Pour cela, il est nécessaire d'analyser le rôle de l'abondance des hôtes et des vecteurs, leurs niveaux de compétence, ainsi que l'accessibilité des hôtes aux vecteurs et les préférences trophiques de ces derniers.

En épidémiologie, différents termes sont utilisés pour désigner les espèces ou groupes d'espèces capables de maintenir un agent pathogène de manière pérenne : hôte ou communauté de maintenance (persistance de l'agent pathogène), ou encore hôte ou communauté réservoir (source durable de transmission de l'agent pathogène à une espèce cible) (21).

Face aux nombreuses définitions, différentes et parfois contradictoires, Haydon *et al.* (2002) proposent qu'un réservoir soit défini comme une ou plusieurs populations ou environnements épidémiologiquement connectés dans lesquels l'agent pathogène peut être maintenu en permanence et à partir desquels l'infection est transmise à une population cible. Le réservoir constitue une communauté de maintenance et toutes les populations au sein de la communauté de maintenance sont directement ou indirectement connectées les unes aux autres (22). Roberts *et al.* (2020) montrent ensuite que le même groupe d'hôtes peut constituer une communauté de maintenance dans un contexte écologique mais pas dans un autre : il n'est donc

pas possible d'affirmer qu'une espèce ou un groupe d'espèces est une communauté de maintenance pour un pathogène donné sans préciser le contexte écologique. L'écosystème étant défini par un ensemble complexe d'interactions déterminant collectivement la dynamique des populations des espèces qui le composent, toutes les espèces influenceront la dynamique des agents pathogènes via les effets de ces interactions sur les espèces hôtes, compétentes ou non compétentes (7,21,23).

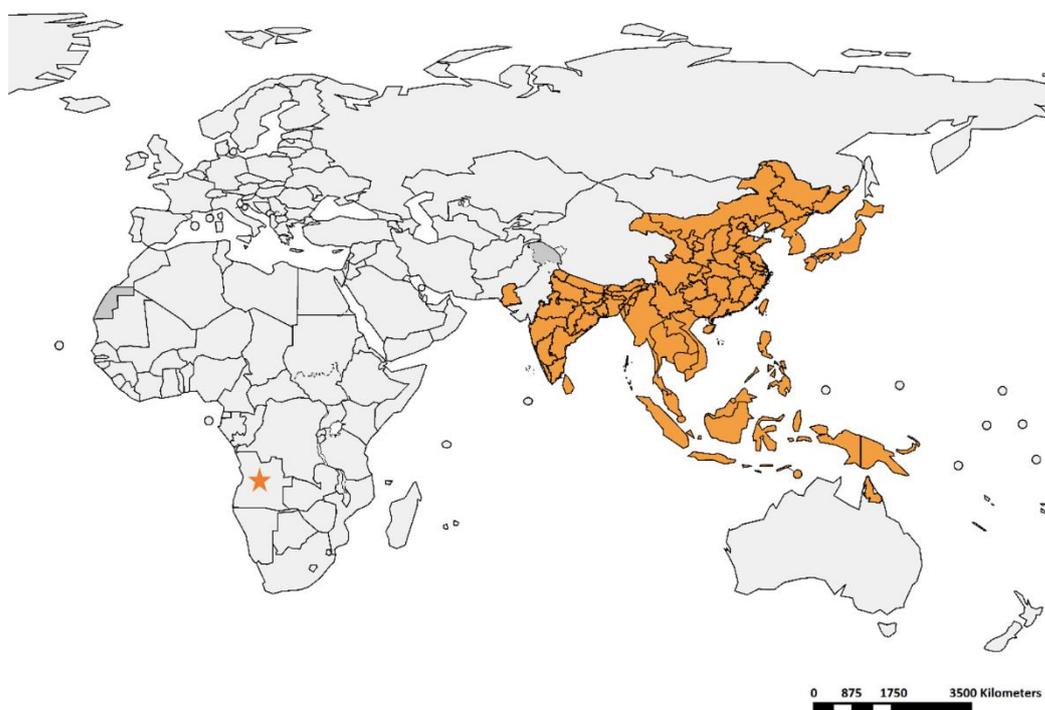
## 2. L'encéphalite japonaise

L'encéphalite japonaise (EJ) est une zoonose à transmission vectorielle et probablement la principale cause d'encéphalite épidémique humaine dans le monde (24). Même si la charge globale de l'infection au virus de l'encéphalite japonaise (VEJ) sur la santé humaine est difficile à évaluer, une estimation effectuée en 2011 suggère que l'EJ serait à l'origine d'environ 68 000 cas et de plus de 20 000 décès par an répartis dans 24 pays d'Asie et du Pacifique occidental (25). Environ trois quarts de ces cas concernent des enfants, et l'EJ reste un problème de santé publique, même dans les régions ayant mis en place des programmes de vaccination humaine (25). Les infections sont le plus souvent asymptomatiques mais peuvent entraîner une maladie grave caractérisée par une forte fièvre, des maux de tête, une raideur de la nuque, une désorientation, un coma, des convulsions, une paralysie spastique voire la mort, avec un taux de létalité pouvant atteindre 30 %, et 30 à 50 % des survivants pouvant conserver des séquelles neurologiques ou psychiatriques définitives (26–31). Les recherches sur le type de séquelles et leur fréquence font néanmoins défaut (32). En outre, ces différents chiffres sont probablement sous-estimés en raison de réactions croisées des tests avec d'autres flavivirus comme le virus de la dengue (DENV), de la sous-détection et du sous-diagnostic, en particulier dans les pays en développement (33,34). Il n'existe pas de traitement antiviral spécifique au VEJ, la prise en charge des patients est donc avant tout symptomatique.

Un examen des données de surveillance et des programmes de vaccination dans les 24 pays présentant un risque de transmission du VEJ a révélé qu'en 2016, 22 pays effectuaient au moins une surveillance de l'EJ, et 12 avaient mis en place un programme de vaccination contre l'EJ. Cela représente des progrès substantiels dans les mesures de prévention et de contrôle de l'EJ, mais des défis subsistent liés notamment à la sous-déclaration et au sous-diagnostic des cas d'EJ (35,36).

Le VEJ a été isolé pour la première fois en 1935 au Japon (37). C'est un flavivirus faisant partie du même sérocomplexe que le virus de la fièvre West Nile (WNV), le virus de l'encéphalite Murray Valley (MVEV), le virus de l'encéphalite de Saint Louis (SLEV) et le virus Usutu (USUV). À ce jour, cinq génotypes (GI à GV) ont été décrits et la plupart des souches isolées appartiennent aux génotypes I, II et III (38). Alors que le génotype III (GIII) était le génotype le plus fréquemment isolé dans la majeure partie de l'Asie entre 1935 et les années 1990, un changement de génotype s'est produit au cours des 30 dernières années. Chez les porcs notamment, le génotype I (GI) a commencé à être le plus isolé après les années 90 au Japon, en Corée du Sud, en Inde, au Népal, en Thaïlande, au Vietnam et au Cambodge (39,40).

Le VEJ circule en Asie et en Océanie, du Pakistan à l'Ouest à la Papouasie-Nouvelle-Guinée à l'Est, et de la Chine au Nord au Nord de l'Australie au Sud (41). En raison de sa large distribution géographique (Figure 1), plus de deux milliards de personnes sont exposées au risque d'infection (42). Une infection par le VEJ a récemment été confirmée en Angola en coïnfection avec le virus de la fièvre jaune et, le patient n'ayant jamais voyagé, il s'agirait d'un cas autochtone (43).



**Figure 1 :** Distribution de l'encéphalite japonaise. Les régions colorées sont celles où le VEJ circule chez l'homme, de manière épidémique ou endémique, et la détection d'un cas autochtone en Angola est représentée par l'étoile colorée (Source : WHO, 2018 (44))

### 3. Cycle épidémiologique de l'encéphalite japonaise

Le cycle de transmission du VEJ communément décrit implique les oiseaux de la famille des ardéidés (aigrettes et hérons) comme réservoir, les porcs domestiques comme principaux hôtes amplificateurs et les moustiques du genre *Culex* comme vecteurs (Figure 2) (45–50). Deux études en Inde ont observé des anticorps neutralisant anti-VEJ chez 12.5% à 22.5% des ardéidés prélevés, et un étude à Singapour a rapporté une séroprévalence anti-VEJ chez des oiseaux sauvages, dont certains hérons et aigrettes, de 3% (51–53). Chez les porcs, les enquêtes sérologiques ont rapporté de 3% à 74% de séroprévalence anti-VEJ selon la région d'étude (54). Outre la transmission vectorielle, des études récentes suggèrent qu'une transmission directe du VEJ entre porcs pourrait se produire (55–57). Les hôtes non compétents, exposés au VEJ mais ne développant pas une virémie suffisante pour réinfecter les vecteurs se nourrissant sur eux, sont nombreux et incluent l'homme et le cheval, également susceptible de développer une encéphalite grave, ainsi que les bovins et les chiens (41,58–67). Des anticorps neutralisant anti-VEJ ont en effet été trouvés chez 17% (n=100) et 40% (n=106) des chiens prélevés lors d'enquêtes sérologiques au Japon et à Singapour respectivement (61,67). Une étude expérimentale a montré que des chiens infectés expérimentalement (n = 3) ne développaient qu'une très faible virémie (62). Les taux de séroprévalence rapportés chez les bovins variaient de 2% à 88% selon la région d'étude mais les tests utilisés n'étaient pas spécifiques du VEJ, mais des flavivirus (58,68–72). Néanmoins, le VEJ a déjà été isolé chez ces animaux (64,65).

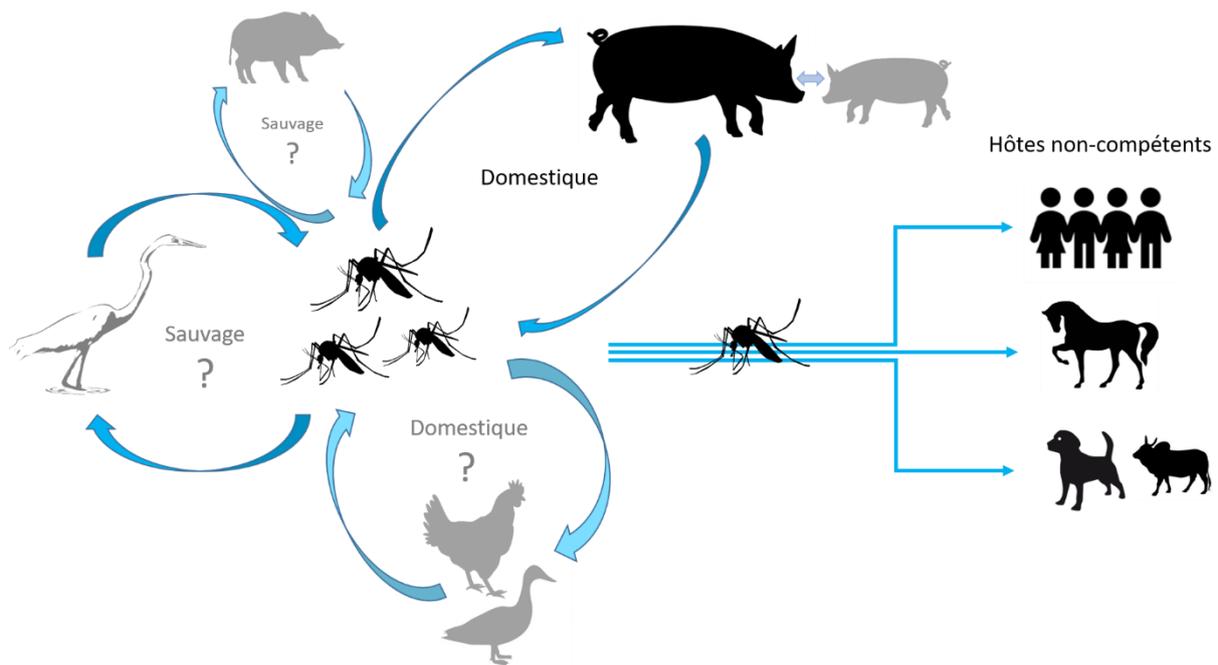


Figure 2 : Hypothèses sur le cycle de transmission du virus de l'encéphalite japonaise.

Les ardéidés sont souvent considérés comme étant les réservoirs sauvages du VEJ (50–52,73–75). Cependant, peu d'études récentes à ce sujet sont disponibles (47,51,76). De plus, le VEJ circule dans des régions où la densité de porcs domestiques et d'ardéidés est faible. A Singapour, même si le risque pour la santé humaine reste faible, la transmission du VEJ chez plusieurs espèces d'animaux s'est poursuivie (séroconversion chez des poulets sentinelles et séroprévalences anti-VEJ observées de 3% chez des oiseaux sauvages et de 15% chez des porcs sauvages) malgré l'abandon progressif de l'élevage porcin il y a près de trente ans (53).

Dans les années 50, Gresser *et al.* (1958) avaient déjà discuté l'implication potentielle des oiseaux domestiques dans le cycle du VEJ, en plus des porcs (77). Plus récemment, des enquêtes sérologiques ont montré que les poulets et canards domestiques étaient exposés au VEJ dans plusieurs régions d'Asie comme le Cambodge, l'Inde, le Népal et l'Indonésie, avec des séroprévalences anti-VEJ de 10% et des séroprévalences anti-flavivirus dans des régions endémiques (test non spécifique au VEJ) de 21% à 37% (33,78–81). Des infections expérimentales ont par ailleurs montré qu'ils étaient capables de développer une virémie suffisante pour infecter les moustiques en retour (33,82,83). L'association étroite entre les oiseaux domestiques et les hommes, les différents niveaux de séroprévalence anti-VEJ observés chez les volailles, les mesures de virémies ainsi que le comportement trophique opportuniste

des vecteurs du VEJ, permettent de supposer l'implication des volailles dans la transmission du VEJ (Figure 2).

*Culex tritaeniorhynchus* est considéré comme le principal vecteur du VEJ mais de nombreuses espèces de *Culex* sont également compétentes pour le VEJ comme *Culex vishnui*, *Culex gelidus* et *Culex quinquefasciatus* (84–91). Deux études expérimentales suggèrent également qu'*Aedes albopictus* européen d'une part et *Aedes japonicus japonicus* européen d'autre part pourraient être compétents pour le VEJ (92,93). Les études sur les préférences trophiques des vecteurs du VEJ ont montré que les espèces de *Culex* étaient souvent opportunistes. Plusieurs études au Sénégal, en Chine et en Inde ont montré que les principaux vecteurs du VEJ, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* et *Culex gelidus*, pouvaient se nourrir sur plusieurs hôtes, tels que les porcs, les volailles, les chiens, les bovins et les hommes, dans des proportions différentes (94–100). En Inde, deux études ont confirmé que la disponibilité des hôtes jouait un rôle important dans le comportement alimentaire de *Culex tritaeniorhynchus* (94,101). Tuno *et al.* (2017) ont montré que *Culex tritaeniorhynchus* et *Culex vishnui* présentaient des taux plus élevés de repas sanguins sur les porcs que sur les vaches, probablement en raison de leur plasticité à la disponibilité des hôtes puisque dans les zones rurales en question, les porcs étaient plus abondants que les vaches (102).

Ces considérations soulèvent la question d'un cycle épidémiologique de l'EJ plus complexe que celui fréquemment décrit. Il paraît alors nécessaire d'utiliser une approche globale pour comprendre les dynamiques de transmission du VEJ, dont la circulation pourrait être maintenue au sein de systèmes multi-hôtes apparentés à des communautés de maintenance différentes selon la région concernée. Ce concept peut en effet être appliqué à l'étude de la circulation du VEJ, notamment au Cambodge où la circulation du VEJ est intense alors que la densité des porcs et oiseaux sauvages est relativement faible (21,76,82).

#### 4. L'encéphalite japonaise au Cambodge

Au Cambodge, l'EJ est la cause la plus fréquente d'encéphalite humaine, en particulier chez les enfants et les adolescents, bien que l'exposition globale de la population soit mal connue (103,104). Entre 2010 et 2013, une enquête menée dans deux hôpitaux cambodgiens montre qu'un quart des méningo-encéphalites aiguës étaient dues à une infection par l'EJ (105). En 2018, plus de 45 % des cas d'encéphalite infantile traités dans un hôpital de Phnom Penh ont été confirmés comme étant dus au VEJ (communication personnelle de l'Institut Pasteur du

Cambodge). De plus, les données disponibles proviennent de suivis hospitaliers de patients pris en charge et présentant des symptômes d'encéphalite. L'exposition globale de la population est donc probablement sous-estimée et l'incidence clinique de l'EJ au Cambodge reste difficile à évaluer.

Un premier programme de vaccination a été initié en 2013, et en 2016, le gouvernement a financé la remise en place d'un programme de vaccination national (35). En 2019, une enquête menée dans le nord du Cambodge a montré que plus de 90% des enfants de la zone d'étude étaient vaccinés contre le VEJ (106), mais les données de suivi de l'impact de la vaccination restent limitées.

Les porcs domestiques sont largement exposés au VEJ au Cambodge (avec une séroprévalence anti-VEJ observée d'environ 60% (107)), et la transmission est intense en zone rurale comme en zone péri-urbaine, où Cappelle *et al.* (2016) et Di Francesco *et al.* (2018) ont montré que les porcs suivis séroconvertissaient en moins de 6 mois (108,109). Cependant, même si l'élevage de porcs traditionnel est répandu au Cambodge notamment dans la province de Kandal autour de Phnom Penh, la densité de porcs reste faible : à Kandal, on l'estime à 66 porcs au km<sup>2</sup> (alors que la densité est d'en moyenne 250 porcs/km<sup>2</sup> en Bretagne, France) (110–112). Auerswald *et al.* (2020) ont montré que 29% des volailles prélevées présentaient des anticorps anti-flavivirus, dans la plupart des cas confirmés comme étant spécifiquement anti-VEJ (33). Quatre-vingt-dix pour cent à 95% des familles cambodgiennes élèvent des volailles, et cela à proximité des habitations et des autres espèces (111). Les volailles sont donc exposées au VEJ au Cambodge mais leur influence sur l'intensité de transmission du VEJ n'a pas encore été étudiée. Les bovins sont considérés comme des hôtes non compétents du VEJ. A Kandal, la densité des bovins est d'environ 40 bovins au km<sup>2</sup>, avec en moyenne entre 1 et 3 bovins par famille. Les bovins sont en effet élevés essentiellement en zone rurale pour la riziculture (trait, labourage, engrais) (113,114). L'exposition des chiens n'a jamais été investiguée au Cambodge. Cependant, les chiens y sont nombreux (ratio chien/homme estimé à 1:3,8 dans certaines régions (115) et vivent à proximité des humains même lorsqu'ils sont en liberté. Au Cambodge, ils feraient donc également partie du système multi-hôtes dans lequel se maintient le VEJ. Des études antérieures ont montré que les chiens pouvaient être de bonnes sentinelles pour le WNV (10,116), la maladie de Lyme (117) et d'autres maladies transmises par des arthropodes (118). Des infections expérimentales par le VEJ chez des chiens ont montré qu'ils développaient une immunité durable mais sans signes cliniques et une faible virémie (62). La séroprévalence canine pourrait donc être un bon indicateur de l'exposition humaine au VEJ. Même si l'on sait

que l'EJ est endémique et répandue au Cambodge, la distribution spatiale et temporelle de la maladie n'est pas bien connue, car les études se concentrent sur la capitale, Phnom Penh, et la province voisine de Kandal. Par conséquent, l'utilisation de chiens comme sentinelles permettrait d'étudier le niveau de circulation du virus et d'identifier les principales zones à risque.

Au Cambodge, la transmission du VEJ pourrait, au bilan, se maintenir dans un système multi-hôtes composé de porcs domestiques et de volailles comme hôtes compétents, et d'autres hôtes composant généralement un village traditionnel cambodgien (bovins, chiens, humains) comme hôtes non compétents.

## 5. Risque d'émergence de l'encéphalite japonaise à l'île de La Réunion

Les modifications anthropiques des paysages, en particulier la destruction et la fragmentation des habitats, l'empiètement sur les zones sauvages et le réchauffement climatique, participent à l'expansion des vecteurs et à l'émergence des arboviroses (2,119–123). Les échanges humains et commerciaux contribuent également à façonner la distribution et l'intensité de la transmission des arboviroses en impactant la distribution des vecteurs et des hôtes (122,124–129), et ont déjà conduit à l'émergence d'arboviroses dans de nouvelles régions comme le Zika au Brésil et probablement la fièvre de West Nile aux Etats-Unis (130,131).

Dans l'Océan Indien, les échanges commerciaux sont importants et ne cessent de croître. De nombreuses lignes commerciales relient des pays où l'EJ est endémiques comme la Thaïlande et l'Inde à l'île de La Réunion (132–134). A La Réunion, le terrain semble favorable à l'émergence de certaines arboviroses. Entre 2005 et 2006, le virus du chikungunya, probablement introduit depuis l'Afrique de l'Est par l'intermédiaire des Comores, a provoqué une épidémie touchant près de 40% de la population (135). Ce type d'émergence, ainsi que le risques d'introduction de zoonoses vectorielles comme la fièvre de la vallée du Rift (dont le premier cas humain a été détecté à Mayotte en 2007 (136)) et la fièvre de West Nile (circulant à Madagascar et dont les anticorps ont été détectés sur des chevaux à La Réunion, sans cas humains autochtone observé (137,138)), indiquent qu'il existe un risque d'émergence de l'EJ sur l'île de La Réunion.

Les vecteurs connus du VEJ, *Culex tritaeniorhynchus* et *Culex quinquefasciatus*, sont présents à l'île de La Réunion (139,140). Les principaux hôtes amplificateurs (porcs domestiques) et les réservoirs secondaires suspectés (volailles) y sont également présents, et les conditions éco-climatiques qui prévalent dans Océan Indien et dans certaines régions d'Asie du Sud Est sont similaires.

Ainsi, la proximité de zones endémiques couplée à un environnement potentiellement propice (densité vectorielle importante, taux de contact entre hôtes et vecteurs, températures élevées) et à une absence d'immunité de la population d'hôtes compétents pourraient rendre possible l'introduction et la pérennisation du virus.

## 6. Stratégie de recherche de la thèse

L'objectif général de cette thèse est de mieux comprendre l'épidémiologie de la transmission du VEJ au Cambodge, dans des zones où les densités des réservoirs et hôtes amplificateurs fréquemment décrits (ardéidés et porcs domestiques) peuvent être faibles. Le second objectif est d'évaluer si le contexte réunionnais permettrait de maintenir une circulation du VEJ en cas d'introduction du virus sur l'île. La stratégie de recherche permettant d'atteindre ces objectifs se décline selon quatre axes qui constituent les quatre chapitres de cette thèse.

Dans un premier chapitre, nous avons effectué un travail bibliographique afin de réévaluer le rôle du porc domestique dans l'épidémiologie de l'EJ. Nous avons synthétisé les connaissances relatives à l'infection par le VEJ chez les porcs, en termes de caractéristiques individuelles et populationnelles. Cette étude nous a permis d'identifier différents « pattern » épidémiologiques et de discuter d'une part de l'importance du porc dans le cycle de transmission du VEJ et d'autre part des potentielles mesures de contrôle potentielles ciblées sur les porcs domestiques.

Dans un second chapitre, nous avons analysé les données sérologiques issues d'une campagne de prélèvement réalisée sur quatre espèces d'hôtes : les porcs, les poulets, les canards et les chiens, dans des villages de la province de Kandal, au Cambodge, où le virus circule. Nous avons en effet prélevé des porcs, des poulets et des canards, dont les sérums, ajoutés à des sérums de chiens récoltés dans le cadre d'une précédente enquête dans la même province, ont été analysés en sérologie par l'unité de virologie de l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC). Nous avons ainsi quantifié l'exposition relative au VEJ de ces quatre espèces et estimé la force

d'infection du VEJ exercée sur chacun de ces hôtes, correspondant à la probabilité instantanée d'infection des hôtes. Ce chapitre permet d'identifier un système multi-hôtes potentiellement impliqué dans la circulation du VEJ dans les villages de la province de Kandal au Cambodge, et de clarifier l'exposition relative au VEJ de quatre espèces d'hôtes qui composent en partie ce système.

Dans un troisième chapitre, nous avons développé un modèle déterministe à compartiments de la transmission du VEJ dans un village traditionnel cambodgien de la province de Kandal, calibré avec des données démographiques et sérologiques. Nous avons analysé les variations du nombre de reproduction de base ( $R_0$ ), de la probabilité annuelle d'exposition des hommes au VEJ (*i.e.* la probabilité annuelle de recevoir au moins une piqûre infectante) et de l'impact clinique potentiellement associé chez l'homme en fonction de la composition du système multi-hôtes. Ce modèle nous a permis de proposer une quantification de l'exposition des hommes au VEJ dans la province d'étude et d'évaluer le rôle potentiel des chiens comme sentinelles de l'exposition humaine au VEJ.

Dans un quatrième et dernier chapitre, nous avons adapté le modèle précédemment développé au contexte réunionnais afin d'analyser le risque de circulation du VEJ à l'île de La Réunion en cas d'introduction. Le risque d'introduction du VEJ à l'île de La Réunion est réel au vu des nombreux échanges dans l'Océan Indien mais au-delà des zones voisines des ports et des aéroports, la circulation beaucoup plus large des containers rend le risque d'introduction très diffus, et les lieux d'introduction potentielle impossibles à prévoir. En revanche il est possible d'analyser le risque de circulation locale du VEJ, suite à une introduction, dans les lieux identifiés comme les plus à risque : les élevages de porcs et leurs alentours. De la même manière que le modèle cambodgien, le modèle réunionnais permet de calculer des  $R_0$ , mais cette fois autour des élevages de porcs recensés. Il permet ainsi d'identifier les zones les plus à risque de maintenir une circulation du VEJ suite à une introduction.



# CHAPITRE 1 : Quelle est la place du porc domestique dans le cycle épidémiologique du virus de l'encéphalite japonaise ? Bilan et analyses des connaissances et implications pour le contrôle de la maladie.

## 1. Introduction

En l'absence de traitement antiviral ou de prophylaxie antivirale, la vaccination humaine reste le seul outil disponible pour protéger l'homme de l'infection par le VEJ, mais elle ne permet pas d'arrêter la circulation du VEJ entre les vecteurs et les réservoirs (141). De plus, des cas humains d'encéphalite japonaise surviennent encore dans les pays où des campagnes de vaccination de masse sont mises en œuvre. Si le porc est le principal hôte amplificateur de l'encéphalite japonaise, la rupture du cycle de transmission moustiques-porcs devrait permettre de rompre le cycle de circulation du virus et de protéger l'homme de l'infection par le VEJ. Il est donc nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les caractéristiques de l'infection porcine par le VEJ en termes de virémie, de réponse immunitaire, de mécanismes de transmission et de signes cliniques, afin de mieux évaluer le rôle des porcs domestiques dans le cycle épidémiologique, et d'identifier des mesures de contrôle supplémentaires qui cibleraient les porcs domestiques. La présente revue systématique a pour but de synthétiser les connaissances relatives aux porcs et au VEJ, tant au niveau individuel qu'au niveau populationnel, afin de discuter l'importance des porcs dans le cycle de transmission du virus, et de mesures de lutte éventuelles ciblant les porcs.

Cette revue de la littérature a donné lieu à une publication dans *Viruses* (54).

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Protocole de recherche et bases de données

Nous avons utilisé pour cette étude la méthode PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) pour les revues systématiques et les méta-analyses (142). Toutes les études traitant à la fois du VEJ et des porcs étaient éligibles. Les enquêtes sérologiques, les études expérimentales et écologiques ainsi que les enquêtes sur les épidémies de VEJ ont été prises en compte. Nous n'avons conservé que les articles rédigés en anglais et aucune restriction de date de publication n'a été imposée. Ainsi, l'année de publication s'étendait

de 1947 à 2019. La base de données Scopus a été interrogée électroniquement en utilisant la requête suivante : ("Japanese encephalitis" ou "Japanese B encephalitis") et ("pigs" ou "swine"). Nous avons utilisé l'option "all field" afin de recueillir les articles dans lesquels les termes de recherche apparaissaient dans les titres, les résumés ou les mots-clés.

La même personne a effectué l'ensemble de la recherche initiale et du tri. Les articles ont été répertoriés dans un fichier Excel afin de les trier et de garder la trace de ceux qui ont été exclus. Les doublons ont été supprimés et la sélection des études s'est faite en trois étapes de sélection sur la base : i) du titre de l'article, ii) de la lecture des résumés des articles sélectionnés à l'étape (i), iii) de la lecture du texte intégral des articles sélectionnés à l'étape (ii).

## 2.2. Critères d'inclusion et d'exclusion

Les critères d'inclusion étaient les suivants : Articles rédigés en anglais rapportant des enquêtes sérologiques transversales ou longitudinales, des infections expérimentales, des descriptions de l'infection clinique, de la pathogénicité, des voies de transmission, de la virémie, de la réponse immunitaire et du diagnostic, des effets de la vaccination, des mesures de contrôle, et/ou traitant du cycle et des systèmes épidémiologiques, tous ces sujets étant directement liés aux porcs. Les critères d'exclusion étaient les suivants : revues, notes et rapports de congrès, recommandations aux voyageurs, séquençage du génome seul, virologie expérimentale seule (structure virale, interactions virus-cellules), développement de tests diagnostiques, non axés sur le porc (mais plutôt sur l'homme, les vecteurs), notification d'épidémies humaines, travaux axés sur d'autres virus que le VEJ, études de modélisation mathématique.

## 3. Résultats

### 3.1. Sélection des études

L'interrogation de la base de données Scopus a été effectuée le 15 mars 2019, proposant 667 études. Le processus de sélection des études est représenté dans la figure 3. A l'issue de ce processus, 127 études ont été incluses dans la revue systématique.

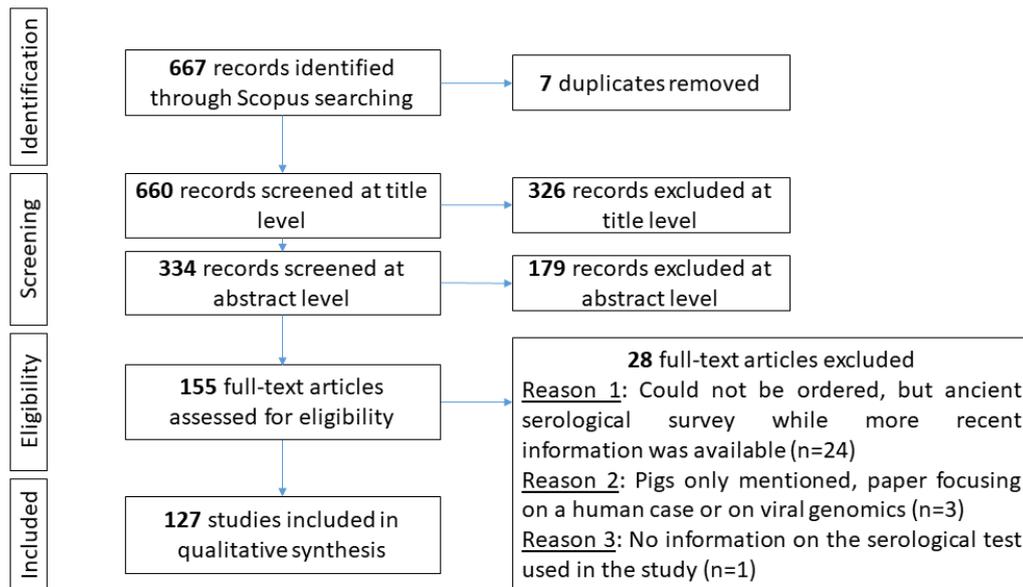


Figure 3 : Diagramme de flux PRISMA représentant le processus de sélection des études.

### 3.2. Caractéristiques individuelles de l'infection par le VEJ chez les porcs

Tous les tests virologiques et sérologiques mentionnés dans cette section sont décrits en Annexe 1 (143–149).

#### 3.2.1. Virémie chez les porcs infectés par le VEJ

La virémie correspond à la présence de virus dans le sang. Pendant cette phase, le VEJ peut être transmis aux moustiques qui piquent le porc virémique si le niveau de virémie est suffisamment élevé. Il a été démontré expérimentalement que des niveaux de virémie d'environ  $10^4$  unités infectieuses par ml semblaient être suffisants pour transmettre le virus aux moustiques (150–153). Six articles ont rapporté des travaux expérimentaux relatifs à la virémie chez les porcs infectés par le VEJ. Des truies et des porcelets ont été inoculés avec différentes souches de VEJ et prélevés quotidiennement, afin de détecter le virus par inoculation intracérébrale au souriceau (ICISM) dans les études les plus anciennes, et par détection de l'acide ribonucléique (ARN) du VEJ par transcription inverse - réaction de polymérisation en chaîne quantitative (RT-qPCR) dans les plus récentes. Les résultats sont présentés dans le tableau 1. Selon l'étude, la virémie était détectée entre 1 et 5 jours après l'infection (jpi), et durait de 3 à 5 jours (56,150,155–158). Une étude a conclu que plus la concentration du virus inoculé était élevée, plus le virus était détecté tôt (dès le premier jour). Lorsqu'ils étaient détectés, les titres de virus atteignaient 2.6 log LD<sub>50</sub>/0,03 ml de sang lors du titrage intracrânien chez le

souriceau nouveau-né, LD<sub>50</sub> étant la dose létale à 50% (150). Plus récemment, la virémie a été quantifiée en détectant l'ARN du VEJ par RT-PCR quantitative (RT-qPCR) sur les porcelets inoculés, et atteignait environ 10<sup>4</sup> unités d'ARN/ml (56,158).

Les deux mesures de la virémie ne peuvent pas être comparées quantitativement, car l'ICISM détecte la présence de virions infectieux, tandis que la RT-qPCR détecte l'ARN des virions qu'ils soient infectieux ou défectifs (157).

**Tableau 1 :** Virémie et réponse immunitaire chez les porcs après une infection expérimentale par le VEJ.

Protocole	Virémie			Réponse immunitaire		Référence
	Test	Période de détection	Valeur du pic de virémie	Test sérologique	Détection d'anticorps	
5 truies, inoculation IV, souche Kanagawa, prélèvement sanguin quotidien	ICISM	1-4 jpi	NA	VN chez souris	> 7 jpi	(155)
4 porcelets, inoculation SC, souches M5/596 et pig9, prélèvement sanguin quotidien	ICISM	Pendant 4 jours	2,6 log LD <sub>50</sub> /0,03 ml	IHA	7-35* jpi	(150)
2 porcelets, inoculation SC, souche 9215, prélèvement sanguin quotidien	ICISM	1-4 jpi	NA	IHA	Tous positifs à 7 jpi	(156)
6 porcelets, inoculation SC, souche Nakayama, prélèvement sanguin quotidien	ICISM et RT-PCR	2-5 jpi	NA	SNT	Tous positifs à 14 jpi	(157)
12 porcelets, inoculation IV+ID, souche Nakayama, prélèvement sanguin quotidien	RT-PCR	1-5 jpi	10 <sup>4</sup> U/ml**	SNT	3-11* jpi	(56)
10 porcelets, inoculation IV, souche JE-91, prélèvement sanguin quotidien	RT-PCR	3-5 jpi	10 <sup>3,5</sup> U/ml**	SNT	Tous positifs à 28 jpi	(158)

IV=intraveineux; SC=sous-cutané; ID=intradermique; LD<sub>50</sub>=dose létale 50%; TCID<sub>50</sub>=Dose infectieuse 50% en culture tissulaire; ICISM= inoculation intracérébrale du souriceau nouveau-né; RT-PCR=reverse transcription-polymerase chain reaction; VN=test de neutralisation virale; IHA=inhibition de l'hémagglutination; SNT=test de séroneutralisation; jpi=jours post infection; \* Tous les porcelets positifs à cette date, à la fin du suivi; \*\* Une U a été définie comme la quantité d'ARN viral correspondant à 1 TCID<sub>50</sub> de la préparation virale utilisée comme standard par les auteurs.; NA: non applicable, lorsque la détection de la virémie était qualitative.

Ces études expérimentales montrent systématiquement que la virémie provoquée par l'infection au VEJ est précoce et courte. Cela peut expliquer pourquoi le VEJ est difficile à isoler chez les porcs dans des conditions de terrain lors d'études transversales ou longitudinales,

si la périodicité des prélèvements sanguins n'est pas assez élevée. A titre de comparaison, d'autres maladies porcines importantes provoquent des virémies plus longues : la peste porcine africaine (PPA) provoque une virémie de 3 semaines à 2 mois (159–161) et la peste porcine classique (PPC) de 1 à 3 semaines (162,163).

Les caractéristiques de la virémie dans des conditions de terrain ont pu être documentées lors de suivis de cohortes de porcs chez qui le VEJ a été détecté. Ueba *et al.* (1972) ont suivi des porcelets pendant plusieurs mois et les ont testés par ICISM d'une fois par jour à une fois tous les quatre jours. Les résultats ont confirmé les durées de virémie observées dans des conditions expérimentales : de 3 à 5 jours (164).

### 3.2.2. Réponse humorale des porcs après une infection par le VEJ

L'apparition d'anticorps après une infection expérimentale par le VEJ a été étudiée dans six articles (Tableau 1). Selon le protocole de l'étude (souche VEJ, voie et dose d'inoculation, âge des porcelets), après une infection expérimentale par le VEJ, les anticorps apparaissaient entre 3 et 7 jpi, et étaient détectés jusqu'à la fin de l'étude (7-35 jpi). Ueba *et al.* (1972) ont signalé que la virémie chutait dès que les anticorps anti-VEJ étaient détectés. Cela suggère que la virémie est courte en raison de l'apparition précoce de la réponse immunitaire. Dans les années 90, Geevarghese *et al.* (1994) ont montré une persistance des anticorps détectés par IHA jusqu'à 3 ans, bien que, selon ces auteurs, cette immunité durable puisse être imputable à une exposition répétée au VEJ (165).

### 3.2.3. Signes cliniques

Les signes cliniques, chez les truies et porcelets après inoculation expérimentale du virus ou après infection naturelle, ont été décrits dans quatorze articles. La méthodologie détaillée des études et leurs résultats sont présentés dans le tableau 2.

Une étude expérimentale décrivait des troubles de la reproduction chez des truies associés au VEJ (Tableau 2) (155). Selon la souche du VEJ inoculée aux truies, les conséquences de l'infection expérimentale de truies séronégatives allaient de l'absence d'impact sur la portée à des troubles de la reproduction chez 2 truies sur 6. L'existence d'un trouble de la reproduction était caractérisée par la présence d'au moins un fœtus momifié ou hydrocéphale dans la portée. Les deux truies présentant des troubles de la reproduction ont développé une virémie et une réponse immunitaire après l'infection.

Il a été démontré que des porcelets infectés expérimentalement par le VEJ pouvaient également développer des signes cliniques. Les résultats des quatre études concernées sont

résumés dans le tableau 2. Chaque porcelet présentait de la fièvre un jour après l'infection. Chez certains d'entre eux, des signes neurologiques légers (tremblement des membres postérieurs, léthargie), ont pu être observés jusqu'à un maximum de 10 jours post-infection. Tous les signes cliniques ont disparu en quelques jours sans traitement. Aucune lésion macroscopique n'a été détectée mais trois articles ont rapporté des lésions microscopiques non spécifiques sur les porcelets inoculés.

**Tableau 2 :** Troubles de la reproduction chez les truies et signes cliniques et lésions chez des porcelets après une infection expérimentale par le VEJ.

Méthode	Signes cliniques	Lésions macroscopiques	Lésions microscopiques	Référence
5 truies gestantes, inoculation IV, souche Fuji, prélèvement sanguin quotidien jusqu'à la mise-bas	Non	/	/	(155) 1 <sup>ere</sup> expérience
6 truies gestantes, inoculation IV, souche Kanagawa, prélèvement sanguin quotidien jusqu'à la mise-bas	Fœtus momifiés et hydrocéphales dans 2/6 portées	/	/	(155) 2 <sup>nd</sup> expérience
14 porcelets, inoculation IV, surveillance des signes et histopathologie après euthanasie	Fièvre jusqu'à 4 jpi, léthargie et tremblement des membres postérieurs	Non	Encéphalite non suppurative avec bourrelet périvasculaire de cellules mononucléaires, gliose multifocale dans la matière grise et blanche du cerveau.	(166)
10 porcelets, inoculation intranasale, surveillance des signes et histopathologie après euthanasie	Fièvre jusqu'à 4 jpi, léthargie et léger tremblement des membres postérieurs sur 4 porcelets jusqu'à 10 jpi	Non	Encéphalite non suppurative avec bourrelet périvasculaire de lymphocytes, gliose multifocale, dégénérescence neuronale et nécrose.	(167)
12 porcelets, inoculation IV+ID, surveillance des signes et histopathologie après euthanasie et RT-PCR sur tissus	Fièvre jusqu'à 5 jpi, diminution de l'appétit, constipation et réticence à se déplacer jusqu'à 6 à 9 jpi.	Non	Signes de méningo-encéphalomyélite virale	(56)
10 porcelets, inoculation IV, surveillance des signes et histopathologie après euthanasie et RT-PCR sur tissus	Fièvre jusqu'à 5 jpi, léthargie jusqu'à 5 jpi, légère ataxie entre 10 et 13 jpi, 2 porcs avec ataxie des membres postérieurs entre 19 et 27 jpi.	Non	Non	(158)

IV : intraveineux ; ID : intradermique ; jpi : jours post infection ; RT-PCR : reverse transcription-polymerase chain reaction ; / : non investigué.

Les répercussions cliniques du VEJ sont plus difficiles à mettre en évidence dans des conditions de terrain. Dans sept articles, des tissus de porcelets avortés ou mort-nés dans des troupeaux présentant des troubles apparents de la reproduction pour lesquels le VEJ était suspecté ont été testés par RT-PCR, ICISM ou IHA selon les études. Les résultats sont résumés dans le tableau 3. Le VEJ a pu être isolé dans 5/37 à 8/8 des cerveaux de porcelets avortés ou mort-nés. Quatre articles ont également fourni des informations quantitatives sur les troubles de la reproduction chez des truies (c'est-à-dire la présence de porcelets mort-nés ou de fœtus avortés ou momifiés dans une portée) des troupeaux affectés. Les auteurs ont identifié des taux de trouble de la reproduction allant de 15 à 36% des truies reproductrices (153,168–170). Une étude présentait l'analyse de questionnaires adressés aux propriétaires d'un élevage où des anticorps contre le VEJ avaient été détectés sur les truies. Des informations relatives aux performances de reproduction ont été collectées (nombre de porcelets nés au total et vivants dans la dernière portée, avortements, naissances de porcelets mort-nés ou faibles, avec ou sans symptômes neurologiques). Selon les éleveurs, dans l'un des troupeaux enquêtés, 31 truies sur 51 avaient présenté des troubles de la reproduction. Les auteurs ont ensuite montré une corrélation positive entre la détection d'anticorps contre le VEJ (sur la base des résultats de tests immuno-enzymatiques détectant les IgG (ELISA IgG)) et le nombre de porcelets mort-nés dans les portées des truies âgées de moins de 1,5 ans (171), suggérant que l'infection par le VEJ provoquerait à la fois des troubles de la reproduction et l'apparition d'anticorps chez les jeunes truies gestantes.

*Tableau 3 : Détection du VEJ dans les troupeaux de porcs présentant des troubles de la reproduction et quantification de ces troubles.*

<b>Méthodes de laboratoires</b>	<b>Matériel</b>	<b>Résultat</b>	<b>Diagnostic différentiel</b>	<b>Troubles de la reproduction (TR)</b>	<b>Pays</b>	<b>Référence</b>
RT-PCR	Fœtus avortés	Détection	Non	Pas de données quantitatives	Chine	(172)
RT-PCR	Echantillon de 37 LCR de porcelets avortés	5/37	Non	Pas de données quantitatives	Chine	(173)
ICISM, RT-PCR	Echantillon de 108 tissus cérébraux de porcelets mort-nés	20/108	Non	Pas de données quantitatives	Chine	(174)
RT-PCR	Echantillon de 3 tissus cérébraux de porcelets mort-nés	3/3	VPPC, PRRSV, PRV, PPV non détectés	30/200 truies présentant des TR (15%)	Chine	(168)

RT-PCR	31 tissus cérébraux de porcelets mort-nés (tous les porcelets mort-nés de la ferme)	7/31	Non	10/28 truies présentant des TR (36%), 2-5 mort-nés/truie, 31 mort-nés au total	Inde	(169)
RT-PCR	Echantillon de 8 tissus cérébraux de porcelets mort-nés	8/8	VPPC, PRRSV, PRV, PPV non détectés	37 truies avec TR/128 truies (29%)	Chine	(170)
IHA sur les fluides corporels + isolement du virus (méthode non précisée)	Fœtus avortés	Isolement sur "certains" fœtus	Non	50 truies avec TR/320 truies (3 fermes) (16%)	Japon	(153)

RT-PCR=reverse transcription-polymerase chain reaction ; ICISM = inoculation intracérébrale de souris de lait ; IHA = inhibition de l'hémagglutination ; LCR = liquide céphalo-rachidien ; VPPC = virus de la peste porcine classique ; PRRSV = virus du syndrome respiratoire porcine ; PRV = virus pseudo-rabique ; PPV = parvovirus porcine ; TR = trouble de la reproduction (avortement ou au moins un porcelet mort-né dans la portée).

Deux études de terrain ont rapporté des signes cliniques chez des porcelets potentiellement induits par le VEJ. En 2009, des porcelets ont développé une encéphalite virale et sont morts dans une ferme au Japon. Sept cerveaux ont été prélevés, dans lesquels le VEJ a été détecté par RT-PCR (175). En 2014 en Inde, une étude a été menée chez des truies ayant des antécédents de troubles de la reproduction. Des lésions macroscopiques et microscopiques ont été détectées en association avec une infection par le VEJ chez des porcelets mort-nés, confirmée par RT-PCR. Les porcelets mort-nés présentaient des hémorragies sous-cutanées, une hydranencéphalie, ou un cerveau gonflé avec dilatation des espaces ventriculaires et amincissement du parenchyme environnant. L'histopathologie du tissu cérébral a révélé un œdème généralisé, une congestion, des microhémorragies dans le parenchyme, une dégénérescence neuronale et une accumulation de cellules gliales (169). Ces lésions microscopiques étaient en accord avec les travaux expérimentaux présentés ci-dessus.

Enfin, le VEJ pourrait causer des troubles de la reproduction chez les verrats mais les études sont peu nombreuses. Ogasa *et al.* (1977) ont détecté par ICISM le VEJ dans la semence de 2 des 5 verrats inoculés expérimentalement, et ont rapporté une réduction de la motilité et de la concentration des spermatozoïdes chez deux autres verrats (73). D'autre part, dans l'étude de Teng *et al.* (2013), 2 des 12 verrats malades présentant un gonflement testiculaire ont été testés positifs par RT-PCR sur le liquide séminal (173).

En conclusion, les études expérimentales et de terrain montrent que les signes cliniques du VEJ consistent principalement en des troubles de la reproduction chez les femelles (et dans une

moindre mesure chez les mâles), allant de la naissance de porcelets faibles à des avortements. Le VEJ est détecté dans les tissus cérébraux des porcelets infectés pouvant développer des signes non spécifiques d'encéphalite.

#### 3.2.4. Anticorps maternels anti-VEJ

La persistance des anticorps maternels anti-VEJ chez les porcelets dans des conditions de terrain a été décrite dans quatre articles. Les résultats sont présentés dans le tableau 4. Les quatre études étaient basées sur le suivi de porcelets au Japon, au Cambodge et en Inde du Sud. Dans les premières études, les anticorps maternels anti-VEJ disparaissaient chez les porcelets à l'âge de 1,5 à 4 mois (155,176). Ces résultats ont été confirmés par des études récentes montrant une disparition des anticorps maternels anti-VEJ chez les porcelets entre 2 et 3,5 mois (108,109).

**Tableau 4 :** *Persistance des anticorps maternels anti-VEJ chez les porcelets dans des conditions de terrain.*

<b>Protocole</b>	<b>Test</b>	<b>Âge moyen à la disparition des anticorps maternels anti-VEJ</b>	<b>Pays</b>	<b>Référence</b>
80 porcelets de 2 à 7 mois, provenant de fermes, prélèvement sanguins mensuels	IHA	> 4 mois	Japon	(150)
9 porcelets, placés dans des pièges à moustiques, prélèvement sanguins mensuels	IHA	> 1.5 mois	Japon	(150)
2 cohortes de 15 porcelets de 2 mois, prélèvement sanguins tous les 10 jours pendant 4 mois	IgG ELISA	> 3 mois	Cambodge, zone périurbaine	(108)
2 cohorte de 15 porcelets de 2 mois, prélèvement sanguins tous les 10 jours pendant 4 mois	IgG ELISA	Périurbain: > 2 mois Rural: > 3,5 mois	Cambodge, zone périurbaine et rurale	(109)
5 porcelets de 2 mois, prélèvement sanguins mensuels pendant 3 ans	IHA	> 2 mois	Inde du Sud	(165)

IHA=inhibition de l'hémagglutination; ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

### 3.2.5. Excrétion du VEJ

Trois études ont porté sur l'excrétion oro-nasale du VEJ, pouvant participer à la diffusion du VEJ dans les troupeaux de porcs où la densité vectorielle est très faible, voire nulle. Des porcelets ont été infectés de manière expérimentale et les auteurs ont suivi l'apparition des signes cliniques, la virémie, l'excrétion et le tropisme du virus. L'excrétion virale dans les sécrétions nasales a été détectée par RT-qPCR de 2 à 8 jpi, à des niveaux similaires à ceux de la virémie, soit de  $10^1$  à  $10^4$  unités/ml selon l'étude. Les auteurs ont également signalé une détection de l'ARN du VEJ dans les amygdales jusqu'à 28 jpi (56,57,158).

Aucune étude n'a recherché l'excrétion du VEJ dans les liquides d'avortement, alors que le virus est détecté dans les tissus cérébraux de porcelets avortés ou mort-nés (voir tableau 3). Ricklin *et al.* (2016) ont détecté l'ARN du VEJ dans l'urine à une faible fréquence (dans l'échantillon d'urine d'un des 28 porcelets suivis) (55), et les auteurs ont suggéré des différences de tropisme entre le VEJ et d'autres flavivirus comme le WNV ou le virus de la dengue (DENV) (177,178).

Enfin, une étude a rapporté la détection du VEJ dans les fluides séminaux de sangliers malades (173).

## 3.3. Mécanismes et schémas de transmission du VEJ et mesures de contrôle ciblant les porcs

### 3.3.1. Mécanismes de transmission du VEJ

Deux mécanismes de transmission du VEJ vers et entre les porcs ont été analysés dans les articles étudiés : la transmission vectorielle et la transmission directe par voie oro-nasale.

#### 3.3.1.1. Transmission vectorielle du VEJ

En 1964, une étude expérimentale a analysé la transmission moustique-porc et porc-moustique (154). Les auteurs ont inoculé le VEJ à des *Culex tritaeniorhynchus* et les ont fait se nourrir sur des porcs présentant des titres d'anticorps anti-VEJ variables. Les porcs ont été prélevés quotidiennement avant et après leur contact avec les moustiques infectés. Des tests ICISM ont été effectués sur des échantillons de sang (inoculation intracrânienne au souriceau nouveau-né) et le titre viral a été exprimé en LD<sub>50</sub>. Le VEJ a été détecté chez tous les porcs, sauf chez celui présentant le titre d'anticorps anti-VEJ le plus élevé, montrant une transmission moustique-porc efficace. Des moustiques sains ont ensuite été mis en contact avec les porcs

virémiques. Quatorze jours après leur repas de sang, le VEJ a été détecté dans la sécrétion salivaire de ces moustiques. Les porcs exempts d'anticorps anti-VEJ présentaient la virémie la plus élevée (log 1,1-2,5 LD<sub>50</sub>) et ont infecté de 10 à 96% des moustiques se nourrissant sur eux. Ces résultats ont été confirmés quelques années plus tard (156).

Plus récemment, en Chine, les génomes des souches de VEJ isolées de porcs et de moustiques se sont révélés très similaires, suggérant la circulation vectorielle du VEJ entre les 2 populations en conditions naturelles (174).

### 3.3.1.2. Transmission directe du VEJ

Outre la transmission vectorielle, les trois études expérimentales montrant une excrétion nasale et orale du VEJ présentées ci-dessus (3.2.5. Excrétion du VEJ), suggèrent un risque de transmission directe entre porcs (56,57,158). Le tableau 5 présente les résultats de deux autres études montrant l'efficacité de cette transmission directe en situation expérimentale. Les auteurs ont d'abord inoculé des porcelets avec des doses connues de VEJ et les ont mis en contact avec des porcelets naïfs, en l'absence de moustiques (55). Ensuite, les porcelets ont été inoculés par voie orale et intra-nasale avec des doses connues de VEJ et ont été suivis (55,167). Dans les deux études, des signes cliniques ont été observés et le VEJ a été détecté par RT-PCR dans le sang et les excréments oro-nasales. La période d'incubation des porcs infectés par contact était de 3 à 5 jours. La période d'incubation des porcs infectés par voie oro-nasale était de 1 à 3 jours en fonction des doses inoculées. Le niveau de virémie atteignait 10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup> U/ml, une unité (U) correspondant à la quantité d'ARN trouvée dans une TCID<sub>50</sub> de la préparation virale utilisée.

*Tableau 5 : Démonstrations expérimentales de la transmission directe du VEJ entre porcelets.*

<b>Voie d'infection</b>	<b>Test pour la virémie et les fluides oro-nasaux</b>	<b>Signes cliniques</b>	<b>Virémie</b>	<b>Excrétion oro-nasale</b>	<b>Référence</b>
Contact avec des porcs infectés dans des bâtiments exempts de vecteurs	RT-PCR	Oui	Oui, 3-10 jac ~ 10 <sup>4</sup> U/ml	Oui, 5-10 jac ~10 <sup>1.5</sup> U/ml	(55) 1 <sup>ere</sup> expérience
Inoculation oro-nasale	RT-PCR	Oui	Oui, 1-9 jpi ~10 <sup>3.5</sup> U/ml	Oui, 3-9 jpi ~10 <sup>3</sup> U/ml	(55) 2 <sup>nd</sup> expérience
Inoculation intranasale	/	Oui	/	/	(167)

jpi: jours post infection; jac: jours après contact; RT-PCR: reverse transcription-polymerase chain reaction; /: non investigué.

En outre, une étude récente suggère que l'épithélium nasal pourrait être une voie d'entrée et de sortie pour le VEJ chez les porcs. Le VEJ étant excrété à la fois sur la face apicale et basolatérale des cellules épithéliales, une telle infection pourrait permettre l'entrée du virus chez l'hôte ainsi que la propagation oro-nasale du virus à d'autres hôtes d'une manière comparable à celle de virus respiratoires tels que le virus de la grippe (179).

### 3.3.2. Distribution géographique du VEJ chez les porcs

De 1966 à 2016, la présence d'anticorps anti-VEJ a été signalée chez des porcs dans dix-sept pays d'Asie et/ou du Pacifique, de l'Inde à l'ouest au Japon à l'est, et du nord de l'Australie au sud à la Chine au nord (Figure 4). Cependant, les anticorps détectés par ELISA ou IHA peuvent être des anticorps orientés contre d'autres virus du même sérocomplexe que le VEJ en raison des réactions croisées de ces tests et de leur faible spécificité (33). Les tests de séroneutralisation (SNT) tels que le test de neutralisation par réduction de plaque (PRNT), permettent de confirmer une exposition au VEJ. Certaines études ont néanmoins suggéré une bonne cohérence entre un titre IHA élevé et un titre de PRNT de 50% (107–109).

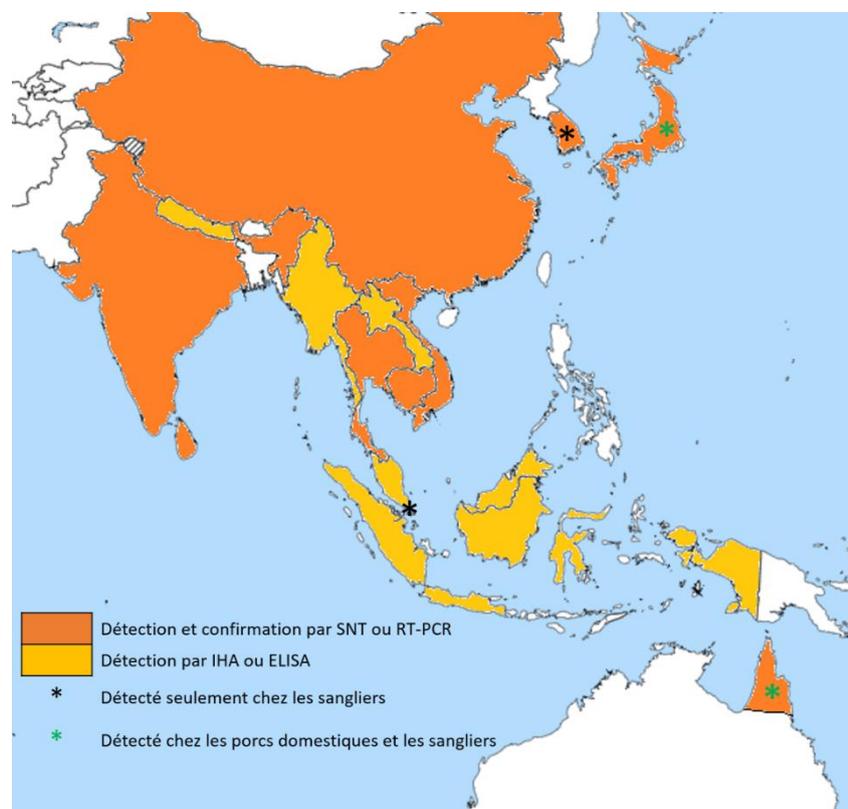


Figure 4 : Détection du VEJ chez les porcs de 1966 à 2016, sur la base des études sélectionnées.

Le tableau 6 résume, pour chaque pays, les enquêtes sérologiques transversales et longitudinales les plus récentes réalisées chez les porcs, les références plus anciennes étant indiquées dans la dernière colonne.

Les taux de séroprévalence varient de 3,1% à 74% (dans le tableau 6, le taux de séroprévalence n'a été calculé que si plus de 100 porcs avaient été testés). Dans les études les plus récentes (porcs échantillonnés après 2007), les séroprévalences les plus élevées chez les porcs domestiques (>50%) ont été observées au Laos, au Cambodge, au Vietnam et en Inde. Au Cambodge en 2007 (107), et en Thaïlande en 1983 (180), la séroprévalence (basée sur les résultats d'IHA) augmentait avec l'âge après la perte des anticorps maternels. Au Sri Lanka, en 1988, les auteurs n'ont cependant pas observé de corrélation significative entre l'âge des animaux échantillonnés et la séroprévalence détectée par SNT (181).

Peu de données de séroprévalence ont été rapportées pour la Chine, même si le virus a été détecté chez les porcs par RT-PCR à plusieurs reprises (168,172–175). Cependant, au Tibet, trois études ont rapporté que 5 à 33% des porcs échantillonnés présentaient des anticorps IgM anti-VEJ détectés par ELISA de capture. L'infection par le VEJ a été confirmée par RT-PCR chez certains des animaux positifs, suggérant un niveau relativement élevé de l'incidence de l'infection par le VEJ chez les porcs tibétains (182).

Concernant les sangliers et les porcs sauvages, des niveaux élevés de séroprévalence du VEJ ont été trouvés au Japon (entre 44%, n=117, et 83%, n=36), en Corée du Sud (66%, n=288) et à Singapour (100%, n=68, dernière étude en 1999). En 1998, des anticorps anti-flavivirus ont été détectés par IHA chez près de 80% des porcs sauvages dans le nord du Queensland en Australie (183). Ces porcs sauvages ayant été échantillonnés dans le cadre de l'investigation d'un foyer d'EJ, il pourrait s'agir d'anticorps anti-VEJ, suggérant une éventuelle implication de ces animaux dans la circulation de l'EJ dans la zone d'étude. Dans les autres pays, la comparaison entre les taux de séroprévalence du VEJ observés chez les porcs domestiques et chez les sangliers est difficile, car, au Japon, les sangliers et les porcs domestiques ont été échantillonnés dans des îles différentes ; et en Corée du Sud, seuls les sangliers ont été échantillonnés. A Singapour cependant, les sangliers ont été échantillonnés la même année et dans la même zone que les porcs domestiques et les deux séroprévalences étaient élevées (respectivement 100%, n=28, et 94%, n=81).

*Tableau 6 : Taux de séroprévalence du VEJ chez les porcs et sangliers dans le monde.*

Région des prélèvements	Année des prélèvements	Origine des animaux prélevés (A/F pour porcs domestiques)	Age des animaux prélevés	Nombre d'animaux testés	Test sérologique	Mise en évidence d'anticorps anti-VEJ	Test de confirmation et résultat	Référence	Références plus anciennes
Australie (T.)	1995	F	NS	90	IHA	63/90	SNT +	(66)	
Australie (T.)	1998	Porcs sauvages	NS	113	IHA	90/113	/	(183)	
Cambodge	2007	A et F	~4,3m (20j-12m)	505	IHA et ELISA	65,7% et 63,5%	/	(107)	(108,109)*
Hong Kong	1968	F	NS	558	IHA	60,4%	/	(184)	
Inde	2014	F	> 3m	51	ELISA	35/51	RT-PCR +	(185)	(186-188)
Indonésie	2015	F	NS	80	ELISA	32/80	/	(189)	(190,191)
Japon (P.)	2008	Sangliers	NS	36	SNT	30/36	SNT +	(192)	(193,194)
Japon (Is.)	2010	F	NS	128	IHA	3,1%	RT-PCR -	(195)	(196,197)**
Japon (Ir.)	2010	Sangliers	NS	117	IHA	44,4%	RT-PCR -	(195)	(198,199)
Corée du sud	2011	Sangliers	NS	288	SNT	66%	SNT +	(200)	
Laos	2009	A	4-12m	727	IHA	74,7%	/	(201)	
Malaisie	2016	F	NS	90	ELISA	40/90	/	(58)	(202)
Myanmar	1999	F	NS	36	IHA	12/36	/	(203)	
Népal	2010	F	4-48m	454	ELISA	16,7%	/	(204)	(81,205)
Singapour	1999	Sangliers	NS	28	IHA	28/28	SNT +	(206)	
Sri Lanka	1988	F	1-24m	951	SNT	32,6%	SNT +	(181)	
Thaïlande	1983	A	4-12m	100	IHA	74%	ICISM +	(180)	(13)
Chine (Tibet)	2015	A	1-6m	102	ELISA	np	RT-PCR +	(182)	(207,208)
Vietnam	2010	A	4-8m	641	ELISA	60,4%	SNT +	(209)	(171,210-213)
Taiwan	1966	F	3-8m	6000	IHA	37,3%	/	(214)	

j=jours; m=mois; T.=Déroit de Torres, Australie; P.=Principale; Is.=Ishigaki; Ir.=Iriomote (îles japonaises); A= abattoir; F= ferme; NS=non spécifié; np: non pertinent car les auteurs ont recherché les IgM; /=non fait; \* études longitudinales plus récentes : pas de séroprévalence mesurée du VEJ mais infection au VEJ confirmé par RT-PCR; \*\* infection au VEJ confirmée par RT-PCR, ICISM ou SNT.

### 3.3.3. « Patterns » épidémiologiques

Les résultats de plusieurs études de terrain ont suggéré que le pic d'abondance vectorielle et l'augmentation du nombre de moustiques infectés (détection du VEJ par ICISM) coïncidaient avec le pic de séroconversion des porcs (augmentation de la proportion de porcs chez qui des anticorps anti-flavivirus étaient détectés par IHA) (176,202,215-217) ainsi qu'avec l'apparition de signes cliniques chez l'homme (89,154,181,211,218,219). Ces études soulèvent ainsi la question de la saisonnalité de la transmission du VEJ (voir la Figure 6 de Konno *et al.* (1966) revue dans Van den Hurk *et al.* (2009)) (41,218).

La saisonnalité de la circulation du VEJ chez les porcs a été mise en évidence par des enquêtes sérologiques longitudinales (suivi des mêmes animaux), ainsi que par des enquêtes

sérologiques transversales (prélèvements ponctuels) répétées dans des abattoirs ou dans des fermes. Dans les études longitudinales, selon le protocole, des porcelets de 2 à 4 mois ont été placés dans des enclos et des échantillons de sang ont été prélevés quotidiennement ou mensuellement pendant 4 mois à 2 ans. Dans les études les plus longues, les porcelets étaient remplacés lorsqu'ils présentaient une séroconversion (71,89,108,109,154,176,180,183,215,220,221). Dans des enquêtes transversales répétées, des porcs âgés de 4 à 12 mois ont été échantillonnés chaque mois dans des abattoirs, pendant 1 à 10 ans selon le protocole (153,201,202,210,212,216,218,219,222–224), et des truies reproductrices ont été échantillonnées chaque mois dans une ferme du sud du Vietnam (171). Les résultats sont présentés dans le tableau 7.

Trois grands « patterns » épidémiologiques peuvent être distingués:

(i) un « pattern » endémique avec circulation forte toute l'année, comme au Cambodge où deux enquêtes longitudinales ont montré que tous les porcelets suivis séroconvertissaient en moins de 4 mois, quelle que soit la période de l'année (108,109).

(ii) un « pattern » endémique avec saisonnalité, où la circulation du VEJ se produit également tout au long de l'année mais atteint son maximum pendant les saisons chaudes et pluvieuses, comme au nord du Vietnam (210,212), au Laos (201,222), en Malaisie (202), en Indonésie (221), en Thaïlande (sauf dans le district montagneux de Chang Mai) (89,220) et à Taiwan (154,176,214).

(iii) un « pattern » épidémique, avec des pics de transmission du VEJ séparés par des périodes de non-détection comme dans le nord de l'Australie (183), le nord de l'Inde (215), le Sri Lanka (181), le district de Chang Mai en Thaïlande (71) et le Japon (153,216,218,219,223,224). Au Japon, Konno *et al.* (1966) ont détaillé les épidémies cycliques d'EJ parmi les populations porcines et humaines, liées à l'abondance des vecteurs, ce qui a été fait l'objet d'une revue en 2009 (41,218).

Pour les deux derniers « patterns » épidémiologiques, les périodes de forte circulation de l'EJ ont été identifiées grâce à des études sérologiques longitudinales, présentées dans le tableau 7. Les taux de séroconversion des porcs, et donc l'intensité de circulation du VEJ, atteignent généralement leur maximum pendant les saisons chaudes et humides. A Bangkok et au Nord du Sri Lanka, la plus forte circulation du VEJ chez les porcs a été observée en saison sèche, mais ces régions présentent néanmoins un climat tropical chaud. Les études longitudinales ont montré que pendant les périodes de forte circulation, l'ensemble des porcelets suivis

séroconvertissaient dans des délais parfois très courts, allant d'1 semaine à Taiwan à 5,5 mois en Indonésie.

*Tableau 7 : Saisonnalité de la circulation du VEJ chez les porcs par enquêtes sérologiques.*

Pays/région	Protocole de prélèvements (étude longitudinale ou transversale (abattoir ou ferme))	Saisonnalité détectée de l'infection des porcs	Climat correspondant	Références
Cambodge	Longitudinale <sup>1</sup>	Toute l'année	so**	(108,109)
Nord Vietnam	Abattoir <sup>2</sup>	Février-Octobre* Janvier-Octobre*	Saison chaude et humide	(212) (210)
Sud Vietnam	Fermes <sup>1</sup>	Toute l'année	so**	(171)
Laos	Abattoir <sup>1</sup>	Juin-Juillet* Août*	Saison chaude et humide	(201) (222)
Malaisie	Abattoir <sup>2,3</sup>	Novembre-Janvier*	Mousson d'hiver (chaude et humide)	(202)
Indonésie	Longitudinale <sup>2,4</sup>	Octobre-Mars*	Saison chaude et humide	(221)
Thaïlande				
Bangkok	Longitudinale <sup>2,1</sup>	Février-Mai*	Saison chaude et sèche	(89,220)
Chiang Mai	Longitudinale <sup>2,3</sup>	Mai-Juillet	Saison chaude et humide	(71,225)
Taiwan	Longitudinale <sup>2,4</sup>	Mars-Octobre, pic en Août/Juillet*	Mousson d'été	(154,176,214)
	Abattoir <sup>1,5</sup>	Juillet-Novembre, pic en Août/Septembre	été : chaud et humide, automne : typhons	(223)
Japon, île principale	Abattoir <sup>2</sup>	Juin-Décembre	chaud et humide puis typhons	(153)
	Abattoir <sup>2,4</sup>	Juillet-Août	chaud et humide	(216)
	Abattoir <sup>2</sup>	Mai-Mars, pic en Août	chaud et humide puis typhons	(218)
Japon, Okinawa	Abattoir <sup>2</sup>	Août	Saison chaude et humide	(219,224)
	Abattoir <sup>2,4</sup>	Avril-Octobre		
Nord Est de l'Inde	Longitudinale <sup>2</sup>	Juin- Août	Mousson	(215)
Sri Lanka				
Centre/Nord Côte Sud-Ouest	Longitudinale <sup>3</sup>	Octobre-Novembre Mars-Avril	Saison sèche Saison chaude et humide	(181)
Nord de l'Australie	Longitudinale <sup>2,3</sup>	Février-Avril	Saison chaude et humide	(183)

\* Période pendant laquelle la circulation est la plus intense, mais circulation du VEJ toute l'année; <sup>1</sup>ELISA; <sup>2</sup>IHA; <sup>3</sup>SNT; <sup>4</sup>ICISM; \*\*sans objet car il n'y a pas de saisonnalité dans la circulation du VEJ.

Dans les années 90, au nord du Vietnam, deux études ont montré des variations périodiques de la séroprévalence du VEJ chez les porcs (circulation plus élevée pendant la saison chaude et humide), suggérant une circulation saisonnière du VEJ (210,212). Ces résultats contrastent avec

ceux obtenus dans le sud du Vietnam (delta du Mékong) où une étude récente n'a mis en évidence aucune corrélation entre la séroprévalence du VEJ chez des truies et la saison (171). En Thaïlande, la saisonnalité de l'EJ a été signalée comme étant beaucoup plus marquée dans le district de Chiang Mai (71), à 700 km au nord de Bangkok, que dans le district de Bangkok : la circulation de l'EJ chez les porcs n'a été détectée que de mars à décembre (atteignant 90% de séroconversions entre mai et juillet), alors qu'elle a été détectée toute l'année dans le district de Bangkok (154,220). À Taïwan, la circulation de l'EJ se produirait également en hiver puisque Chan *et al.* (1968) ont détecté des anticorps de l'EJ chez 15,6% des porcs de 5 mois élevés en hiver, suggérant au vu de leur âge que cette prévalence n'est pas liée aux anticorps maternels mais bien à une circulation du VEJ (214).

Outre ces schémas temporels, l'intensité de la circulation du VEJ varie également en fonction du paysage. *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus*, et *Culex quinquefasciatus*, les principaux vecteurs du VEJ, sont des espèces de moustiques ruraux principalement présents dans les agroécosystèmes comprenant les rizières des pays asiatiques, inondés par la pluie ou l'irrigation (41,86,226–233). C'est pourquoi les études de séroprévalence du VEJ ont été principalement menées sur des porcs élevés dans (ou à proximité de) ces écosystèmes. Dans de tels contextes, la séroprévalence du VEJ s'est avérée être potentiellement très élevée, avec de 40% à plus de 75% de porcs positifs par IHA ou ELISA (confirmés ou non par SNT) en Indonésie, à Hong Kong et au Laos (58,66,184,185,189,201,203,204,214). Ces niveaux de prévalence élevés ont conduit à considérer l'EJ comme une maladie essentiellement rurale, et la proximité avec les rizières et les élevages de porcs (en particulier de type basse-cour) ont été identifiés comme des facteurs de risque majeurs d'EJ chez l'homme (189).

Cependant, plusieurs études menées à Taïwan (214), en Thaïlande (89,180), à Hong Kong (184), au Japon (224) et plus récemment au Cambodge (108,109), au Vietnam (211,213) et en Malaisie (58), ont montré que le VEJ pouvait également circuler chez le porc dans les zones périurbaines, voire urbaines. Les valeurs de séroprévalence du VEJ chez les porcs variaient de 26,5% à plus de 90% de positifs IHA ou IgG ELISA dans les études transversales, et les taux de séroconversion atteignaient 100% des porcelets suivis dans les études longitudinales réalisées au Cambodge. Les vecteurs principaux étant des espèces rurales, ces observations suggèrent un changement d'habitat de ces vecteurs, ou l'implication d'autres espèces de vecteurs et/ou d'autres espèces d'hôtes ou de réservoirs permettant maintenir la transmission du VEJ dans les systèmes épidémiologiques périurbains.

#### *3.3.4. Contrôle du VEJ ciblant les porcs*

Les vaccins humains sont largement utilisés, et des programmes de vaccination chez l'homme ont été mis en place dans plusieurs pays (234,235). Au Japon, en Corée du Sud et à Taïwan, ces programmes sont durables et de grande efficacité. Au Népal, en Malaisie, en Inde, au Sri Lanka, en Thaïlande, au Vietnam, en Chine et au Cambodge, ces programmes sont plus limités ou en cours d'élaboration (25).

Chez l'animal, le développement de vaccins et la mise en œuvre de programmes de vaccination sont plus limités (151,236,237). Néanmoins des vaccins inactivés et vivants atténués dérivés de cultures cellulaires sont utilisés chez le porc. La vaccination des porcs est pratiquée au Japon, au Népal, à Taïwan et en Corée du Sud, mais de façon ciblée, afin de protéger les truies gestantes contre les troubles de la reproduction (238). En Corée du Sud cependant, un programme de vaccination des porcs avec un vaccin vivant atténué a été mis en œuvre au cours des 30 dernières années et a permis de réduire les impacts de l'infection par le VEJ (239,240).

Dans notre sélection, deux articles ont rapporté les effets de la vaccination contre le VEJ sur la fréquence des troubles de la reproduction chez les truies. L'efficacité de la vaccination a été démontrée sur le terrain pour la première fois en 1971 grâce au suivi de deux groupes de truies, vaccinées et non vaccinées. Le groupe vacciné a présenté deux fois moins de mises-bas anormales (avortements ou mort-nés), moins de porcelets malformés ou mort-nés (1% à 7% contre 31% à 54% dans le groupe non vacciné) et des portées plus grandes (2 à 3 porcelets de plus par portée) (241). Dans des conditions expérimentales, la vaccination protégerait également contre la momification fœtale (152).

Trois études suggèrent que la vaccination des porcs contre le VEJ pourrait interférer avec le cycle épidémiologique du virus et réduire l'impact de l'EJ sur la santé publique. Il a été montré expérimentalement que le vaccin vivant atténué avec adjuvant complet de Freund induisait une diminution de la virémie chez les porcelets (164,242). Quelques années plus tard, il a été confirmé que ce vaccin réduisait la virémie, et qu'il prévenait également la réinfection des porcs par des vecteurs infectés (151,241). Cependant, l'impact d'une vaccination massive des porcs sur les infections cliniques humaines n'a pas encore été démontré : en Corée du Sud, le programme de vaccination des porcs contre le VEJ, qui a duré 30 ans, n'a pas permis de prévenir l'occurrence d'épidémies chez l'homme (239).

## 4. Discussion

Cette revue de la littérature confirme que les porcs jouent un rôle central dans l'épidémiologie de l'EJ. Les porcs développent une virémie courte (qui dure de 2 à 4 jours) mais intense, attirent les vecteurs de l'EJ, et le renouvellement rapide des porcelets dans tous les types d'élevages porcins assure le maintien permanent d'une proportion élevée d'individus sensibles, qui facilite la circulation du VEJ. De plus, les élevages de porcs sont souvent situés à proximité des habitations humaines, notamment pour les élevages de type basse-cour qui sont courants en Asie : cette proximité favorise l'infection humaine.

De 1966 à 2016, la présence d'anticorps anti-VEJ a été rapportée chez des porcs dans dix-sept pays d'Asie et du Pacifique, avec des niveaux de séroprévalence allant de 3,1% à 74%. Bien que la diversité des zones, des périodes et des protocoles d'étude explique en partie ce large intervalle, les niveaux de séroprévalence rapportés sont difficilement comparables en raison de la variété des tests sérologiques utilisés et du manque de spécificité de certains de ces tests. En effet, la technique de référence pour le diagnostic sérologique des infections à flavivirus est la séroneutralisation (SNT) (41). Seules quelques enquêtes transversales sélectionnées dans cette revue ont utilisé la SNT pour confirmer que le flavivirus détecté (par IHA ou ELISA) était effectivement le VEJ (66,67,181,196,202,205,209). Dans les autres études, les auteurs n'ont utilisé que l'IHA ou l'ELISA IgG, plus économiques et rapides, et qui, même si elles ne permettent pas d'identifier précisément le flavivirus, permettent un premier *screening* des échantillons notamment dans les régions endémiques du VEJ. L'IHA exploite la capacité de la protéine d'enveloppe virale à agréger les érythrocytes en l'absence d'anticorps d'enveloppe neutralisants et est sujet à de nombreuses réactions croisées dans le sérocomplexe VEJ et avec d'autres flavivirus en raison du type d'antigène utilisé (243). De même, les tests ELISA utilisés, qui reposent sur une réaction colorimétrique pour laquelle l'intensité de la couleur est liée à la concentration d'anticorps, sont spécifiques des flavivirus mais pas exclusivement du VEJ, selon le type d'antigène utilisé (244). En outre, si toutes les études sélectionnées utilisant l'IHA utilisaient la même technique (243), de nombreux kits ELISA sont disponibles et ont été utilisés dans les enquêtes publiées.

Des flavivirus autres que le VEJ, comme le WNV et le DENV, circulent dans les pays infectés par le VEJ, notamment au Cambodge (33,245). Cette co-circulation pose un problème de diagnostic en raison de la réaction croisée des anticorps au sein des différents sérocomplexes

et entre eux (33,34,157,246–253). La confirmation par SNT des résultats positifs aux tests IHA et ELISA semble donc essentielle pour évaluer correctement la séroprévalence du VEJ (34). Il convient de noter que, bien qu'étant le test de référence, la SNT peut également être sujet à des réactions croisées même limitées au sein du sérocomplexe du VEJ. Il est donc parfois nécessaire de tester d'autres flavivirus (tels que le WNV et le DENV) en parallèle du VEJ, et de mettre en œuvre un algorithme de décision basé sur les titres du SNT afin d'identifier le flavivirus (244). Cette procédure de confirmation complexe a été utilisée dans quelques études sélectionnées, dont les études réalisées au Cambodge (66,181,209). De telles données de haute qualité sur la séroprévalence et l'incidence de l'EJ font cependant défaut dans plusieurs pays, et il existe un réel besoin d'efforts de recherche sur les méthodes virologiques et sérologiques pour le diagnostic et la surveillance de l'EJ.

Le VEJ est souvent décrit comme une cause importante des troubles de la reproduction chez les truies et les verrats. Une seule étude de notre sélection suggérait que l'infection expérimentale de truies gestantes par le VEJ entraînait des troubles de la reproduction chez celles-ci (présence de fœtus momifiés ou hydrocéphales dans 2 des 6 portées) (155). L'impact du VEJ sur la reproduction semble difficile à quantifier dans des conditions de terrain et la corrélation statistique entre l'infection par le VEJ et l'apparition des troubles de la reproduction est rarement étudiée. Dans 6 études de notre sélection, le VEJ a néanmoins été détecté par RT-PCR chez certains porcelets avortés ou mort-nés, mais un diagnostic différentiel avec d'autres pathogènes porcins provoquant des troubles de la reproduction n'a été réalisé que dans deux des 6 études (168–170,172–174). De plus, la fréquence des troubles de la reproduction semble être liée au schéma épidémiologique du VEJ. Dans les zones endémiques sans saisonnalité marquée, un contact permanent des porcs avec le virus entraîne une immunité chez la plupart des cochettes avant la maturité sexuelle : dans ce cas, l'infection par le VEJ chez les porcs a donc une importance mineure sur les performances de reproduction (171). Dans des conditions de transmission saisonnière, les truies sont plus susceptibles de présenter des troubles de la reproduction si elles sont encore sensibles lorsqu'elles atteignent la maturité sexuelle. Ces observations pourraient avoir une incidence sur les stratégies de contrôle de l'EJ chez les porcs, qui seront examinées plus loin.

Plusieurs études expérimentales ont montré que les porcs domestiques développaient une virémie élevée permettant une transmission porc-moustique-porc (56,150,158). Il a également été montré que les principaux vecteurs du VEJ, *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* et *Culex gelidus*, avaient une préférence trophique pour les vaches et les porcs, bien qu'ils soient

opportunistes (94–98). Cependant, les deux premières espèces ont souvent montré des taux plus élevés de repas sanguins sur les porcs que sur les vaches, probablement en raison de leur plasticité à la disponibilité des hôtes puisque dans les zones rurales étudiées, les porcs sont souvent plus abondants que les vaches (102). De plus, le nombre de porcs sensibles est toujours élevé en raison d'un *turnover* important dû au système d'élevage. Enfin, l'élevage des porcs en basse-cour est très fréquent en Asie, avec des porcs vivant proche des habitations humaines. Tous ces éléments confirment l'importance majeure des porcs dans le cycle de transmission du VEJ.

Cependant, des études récentes suggèrent que d'autres systèmes épidémiologiques du VEJ peuvent exister dans lesquels le porc domestique ne serait que peu voire pas impliqué. Tout d'abord, des cas humains autochtones d'EJ ont été détectés à Séoul, en Corée du Sud, alors qu'aucun porc n'est élevé dans cette ville (82). En 2013, en Chine, Teng *et al.* ont isolé le VEJ chez des moustiques, des humains et des porcs, et ont montré que la même souche était identifiée chez les moustiques et les humains, mais pas chez les porcs (173). Enfin, deux études, dont l'une très récente, ont montré que le VEJ continuait de circuler des décennies après l'interdiction de l'élevage de porcs à Singapour (53,67).

Les ardéidés comme les aigrettes et les hérons, sont souvent considérés comme étant les réservoirs sauvages du VEJ (50–52,73–75). Cependant, peu d'études récentes à ce sujet sont disponibles (47,51,76). Plusieurs enquêtes ou observations montrent que d'autres espèces aviaires, comme les oiseaux domestiques (poulet, *Gallus gallus domesticus*, et canard, *Anas platyrhynchos domesticus*), sont exposées, et suggèrent que des réservoirs secondaires pourraient être impliqués dans la circulation du VEJ. Dans les années 50, Gresser *et al.* (1958) avaient déjà discuté de l'implication potentielle des oiseaux domestiques dans le cycle du VEJ, en complément des porcs (77). Plus récemment, il a été démontré que les oiseaux domestiques étaient exposés au VEJ au Népal et au Cambodge, des anticorps ayant été détectés à la fois par ELISA et par SNT (33,81). Des anticorps anti-flavivirus ont également été détectés chez des oiseaux domestiques en Malaisie, suggérant une possible circulation du VEJ chez ces espèces (58). Des études expérimentales ont montré que les canards et les poulets inoculés avec le VEJ développaient différents niveaux de virémie, probablement suffisamment élevés pour infecter les moustiques en retour (83,254).

La question d'un réservoir sauvage non aviaire pour le VEJ n'a jamais vraiment été évaluée, alors que l'Asie du Sud-Est abrite la plus grande diversité de porcs sauvages (famille des *Suidae*) au monde (255). Comme présenté ci-dessus, il a été démontré que les sangliers étaient fortement

exposés au VEJ sur deux îles japonaises, le génome du virus isolé chez eux présentant une forte homologie avec celui précédemment isolé chez des porcs élevés sur une autre île japonaise. La détection de l'ARN du VEJ et d'anticorps IgG anti-flavivirus chez les sangliers suggère qu'ils pourraient constituer des réservoirs supplémentaires dans les zones rurales et forestières (199). Dans le nord du Queensland, en Australie, des anticorps anti-flavivirus ont été détectés chez près de 80% des porcs sauvages, lors d'une épidémie d'EJ, et les auteurs suggèrent qu'ils pourraient être devenus des hôtes amplificateurs. (183).

L'EJ a traditionnellement été considérée comme une maladie rurale. Cependant, plusieurs enquêtes ont montré que le virus pouvait être transmis dans les zones périurbaines et urbaines, suggérant la présence dans ces zones d'espèces de moustiques capables de transmettre le VEJ. Cela pourrait être le cas de *Culex quinquefasciatus*, compétent pour le VEJ et anthropophile (256,257). *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex gelidus* et *Culex quinquefasciatus* ont également été piégés dans des foyers urbains au Vietnam, qu'il y ait ou non des porcs dans la zone (258). Dans les zones périurbaines, les gens élèvent traditionnellement peu de porcs ou de volailles. Cependant, l'urbanisation croissante est susceptible d'augmenter les densités de porcs dans les fermes, ainsi que les densités de fermes proches des zones urbaines, rapprochant ainsi les populations humaines et porcines sensibles au VEJ. Il est donc nécessaire d'améliorer notre connaissance du cycle de transmission du VEJ. L'existence de réservoirs secondaires pourrait expliquer la transmission du VEJ dans des zones où la densité porcine est faible ou nulle, ce qui est le cas dans certaines zones urbaines ou périurbaines du Cambodge et du Laos, ou dans les régions montagneuses (53,110,182,208).

L'EJ est principalement une maladie à transmission vectorielle, mais des études récentes suggèrent que de la transmission directe de porcs à porcs pourrait se produire (55,167). Deux autres études *in silico* réalisées à partir de données cambodgiennes et hongkongaises ont montré que l'intégration de la transmission directe dans les modèles mathématiques permettait un meilleur ajustement aux données sérologiques observées qu'un modèle ne prenant en compte que la transmission vectorielle, suggérant ainsi qu'une transmission directe pourrait faire partie du cycle de transmission du VEJ (259,260). La réémergence de cas d'EJ d'une année à l'autre indique que le VEJ pourrait passer l'hiver localement (153). La transmission directe pourrait ainsi constituer l'une des explications à l'hivernage du VEJ dans les troupeaux de porcs des régions épidémiques ou endémiques où la transmission du VEJ et les cas humains sont saisonniers (55).

Les vaccins humains sont largement utilisés, et des programmes de vaccination ont été mis en place dans plusieurs pays (25,234,235). L'homme étant un hôte non compétent, chez qui la virémie n'est pas suffisante pour réinfecter les vecteurs, la vaccination humaine ne peut, à elle seule, arrêter la circulation du virus. En outre, les cas humains peuvent réapparaître en cas d'échec de la vaccination ou d'émergence d'une nouvelle souche contre laquelle le vaccin actuel n'est pas efficace. L'EJ est réapparue en Corée du Sud (2010-2015) après un programme de vaccination de masse qui n'aurait pas réussi à induire une immunité durable, de sorte que les groupes d'âge plus élevés sont redevenus sensibles (261). Les vaccins sont également coûteux et nécessitent plusieurs doses. Finalement, certains de ces vaccins humains peuvent ne pas être efficaces à 100%, comme l'ont démontré Tandale *et al.* (2018) (262).

La vaccination des porcs peut être utilisée comme une alternative pour contrôler la circulation du VEJ. La vaccination des porcs permettrait non seulement de les protéger contre d'éventuels troubles de la reproduction, mais aussi de rompre le cycle de transmission et de réduire ainsi l'impact sur la santé humaine. Dans le nord du Bangladesh, Khan *et al.* (2014) ont construit un modèle à compartiments pour décrire la dynamique de la transmission du VEJ dans cette région et pour évaluer l'impact potentiel de la vaccination des porcs. Ils ont montré que la vaccination de 50% de la population porcine totale chaque année entraînerait une réduction de 82% de l'incidence annuelle de l'infection par le VEJ chez les porcs (263). Les vaccins porcins sont largement utilisés au Japon, à Taïwan et en Corée du Sud, où l'incidence de la maladie chez les porcs a été réduite grâce à l'utilisation d'une souche vivante atténuée (Anyang300) dans tout le pays depuis 30 ans (239,240,264).

Dans les zones épidémiques ou endémiques présentant un caractère saisonnier, la saison de naissance des porcs a une influence sur l'âge auquel les porcs sont infectés par le VEJ, et donc sur l'existence ou non de troubles de la reproduction. Dans le nord du Vietnam, où le pic de transmission se situe entre juillet et septembre, Ruget *et al.* (2018) ont utilisé la température et les données sérologiques des porcs pour prédire l'âge de la première infection par le VEJ. Les porcs nés à la fin de l'hiver deviendraient sensibles à l'infection par le VEJ pendant la période de forte circulation, et avant d'atteindre la maturité sexuelle. Au contraire, les porcs nés pendant l'été et plus tard seraient protégés par leurs anticorps maternels pendant la saison du pic de transmission. Ils perdraient leurs anticorps maternels anti-VEJ et redeviendraient donc sensibles en hiver, lorsque l'abondance des vecteurs est très faible. Selon les auteurs, environ 20% de ces porcs ne seraient pas infectés par le VEJ avant 8 mois, et pourraient donc présenter des troubles

de la reproduction lorsqu'ils sont infectés l'été suivant. Ces animaux (nés entre juillet et septembre) devraient alors être ciblés pour la vaccination (209).

Cependant, la vaccination des porcs présente plusieurs limites. D'abord, le vaste programme de vaccination sud-coréen n'a pas empêché l'apparition de foyers dans la population humaine au cours des dernières années (239). Ensuite, quel que soit le système d'élevage et le contexte socio-économique, le renouvellement des populations porcines est toujours rapide et le coût de la vaccination est donc élevé. De plus, le VEJ pourrait encore circuler au sein des populations de porcs vaccinés (237). Les vaccins porcins sont basés sur les virus du génotype GIII, génotype prédominant en Asie. Cependant, certaines études montrent un remplacement du GIII par le GI qui pourraient modifier négativement l'efficacité des vaccins actuels (211,265,266). Le VEJ a en effet été détecté dans la population vaccinée sur des fœtus avortés et des porcelets mort-nés en Chine (172,174). Les auteurs ont averti d'un manque d'efficacité potentiel du vaccin et suggèrent que la souche SA14-14-2 appartenant au GIII, utilisée pour le développement du vaccin chez les porcs, devrait être réévaluée. De plus, les vaccins actuellement disponibles ne confèrent pas une protection complète contre la souche émergente GV du VEJ (267,268). Enfin, le fait que le cycle puisse être beaucoup plus complexe dans certaines régions (multi-hôtes, sans porcs domestiques ou avec une implication faible du porc), suggère que la vaccination des porcs n'empêcherait pas à elle seule la circulation du VEJ (269).

Des études de modélisation ont été menées pour tester des mesures de contrôle alternatives, telles que la gestion des troupeaux de porcs. En effet, l'intensité de la transmission au sein d'un troupeau dépend de la proportion d'animaux sensibles et immunisés, et donc en partie de la gestion du troupeau. Selon la taille du troupeau et les pratiques de gestion, la proportion de porcs immunisés au sein d'un troupeau peut varier et favoriser ou réduire la circulation virale entre les porcs. Par exemple, la synchronisation des naissances, courante dans les élevages industriels, induit des pics réguliers du nombre d'animaux sensibles lorsque ces porcelets perdent leurs anticorps maternels anti-VEJ. L'augmentation de la durée entre deux portées successives, qui peut être contrôlée par la synchronisation de l'insémination, permettrait alors éventuellement d'augmenter la probabilité d'interrompre la circulation du VEJ entre les naissances successives de porcelets (270).

L'EJ étant principalement une maladie à transmission vectorielle, une alternative à la vaccination reste la lutte antivectorielle. Des pulvérisations d'insecticides pour les adultes, des larvicides tels que la toxine de *Bacillus thuringiensis* pour les stades juvéniles, des extraits de *Piper retrofractum* (Piperaceae) ou des huiles essentielles pour dissuader l'oviposition sont des

techniques qui ont été utilisées (271–273). Une autre option, déjà utilisée dans certaines zones rurales cambodgiennes, consiste à couvrir les porcheries de moustiquaires. Il a finalement été démontré que l'utilisation de moustiquaires imprégnées d'insecticide réduisait le taux de séroconversion chez les humains et chez les porcs en Inde (274).

En conclusion, cette revue souligne que les « patterns » épidémiologiques du VEJ varient selon les régions. Les porcs, lorsqu'ils sont présents, jouent un rôle central, mais d'autres hôtes peuvent être impliqués, comme les oiseaux domestiques. La vaccination humaine reste le moyen le plus efficace pour protéger les populations humaines, mais elle ne permet pas d'arrêter la circulation du virus. Il est donc également nécessaire d'agir sur le cycle réservoir-moustique et d'adapter les mesures en fonction du fonctionnement de ce système multi-hôtes.

Cette revue bibliographique confirme la place centrale du porc dans la transmission du VEJ, mais soulève la question de l'existence de réservoirs secondaires. Au Cambodge, l'EJ circule fortement chez les porcs mais des volailles domestiques sont également exposées. Dans la partie suivante, nous analysons la séroprévalence anti-VEJ chez plusieurs espèces, dont les porcs, les volailles et les chiens, prélevés la même année dans la même province, afin de quantifier l'exposition relative de chacune et discuter leurs potentiels rôles dans l'épidémiologie de l'EJ.



## CHAPITRE 2 : Comparaison de la force d'infection par le virus de l'encéphalite japonaise chez les porcs, les volailles et les chiens de villages cambodgiens.

### 1. Introduction

Il est communément admis que le VEJ est transmis entre les réservoirs (oiseaux ardeidés) ou les hôtes amplificateurs (porcs) par les piqûres de moustiques du genre *Culex*, et probablement de certains *Aedes* (50,87,92). Outre l'homme et le cheval, d'autres animaux comme le chien peuvent être sensibles à l'infection par le VEJ et sont, pour l'instant, considérés comme des hôtes non compétents. En effet, des anticorps neutralisant (Acn) anti-VEJ ont été trouvés chez des chiens au Japon (61), mais des chiens infectés expérimentalement (n = 3) ont montré une très faible virémie (62).

La circulation du VEJ pourrait être la conséquence d'un système épidémiologique plus complexe que celui habituellement décrit. Bien que les porcs occupent une position centrale dans le système, de nombreuses questions subsistent quant à l'existence de réservoirs secondaires (54). En effet, le VEJ circule dans des zones où il y a peu ou pas de porcs (53). D'autre part, il est démontré que les oiseaux domestiques sont exposés au VEJ. En Inde, 10% (21/209) des canards prélevés en 2015 lors d'une enquête sérologique présentaient des anticorps neutralisant anti-VEJ, détectés par ELISA puis séroneutralisation (79). En 2016, 23.7% des poulets et 39.9% des canards prélevés lors d'une enquête sérologique au Cambodge présentaient des anticorps anti-flavivirus, détectés par inhibition de l'hémagglutination (IHA), et certains ont été confirmés comme étant spécifiquement anti-VEJ par séroneutralisation (33). Des anticorps anti-flavivirus ont également été détectés sur des oiseaux domestiques en Malaisie, suggérant une possible circulation du VEJ chez ces espèces (58). Caractériser la réponse des oiseaux domestiques à l'infection par le VEJ et la séoprévalence est une étape importante pour élucider le rôle de ces hôtes en tant que potentiels réservoirs secondaires. Des études expérimentales ont montré que des poussins et des canetons inoculés ou piqués par des vecteurs infectés développaient une virémie durant en moyenne 3 jours et d'intensité variable selon la dose et la souche inoculée mais suffisante pour réinfecter les moustiques se nourrissant sur eux (77,83,254,275–278). Ces résultats suggèrent que les volailles pourraient agir comme

réservoirs secondaires du VEJ dans les régions où la maladie est endémique mais où les densités de porcs domestiques sont faibles.

Un réservoir est défini comme une ou plusieurs populations épidémiologiquement liées dans lesquelles un agent pathogène est maintenu en permanence et à partir desquelles l'infection peut être transmise à une population cible. Cette conception d'un réservoir comme une communauté de maintenance (21,22) peut être appliquée à la circulation du VEJ, notamment au Cambodge, et est nécessaire pour comprendre le cycle épidémiologique du VEJ, qui semble basé sur des communautés de maintenance pouvant être différentes selon la zone concernée.

Au Cambodge, la plupart des études de terrain sur l'infection et la circulation du VEJ se sont concentrées sur les humains, les porcs et les moustiques, et ont confirmé que l'EJ était endémique au Cambodge. En ce qui concerne les porcs, une vaste enquête sérologique réalisée entre 2006 et 2007 dans des fermes et des abattoirs a montré que plus de 60% des porcs échantillonnés étaient infectés par le VEJ (107). Une enquête sérologique longitudinale réalisée sur des porcelets sentinelles dans des zones périurbaines et rurales a ensuite suggéré (i) une forte circulation du VEJ, la majorité des animaux ayant séroconverti dans les 4 mois, et (ii) une faible variation saisonnière de la circulation du VEJ chez les porcs, malgré l'existence d'une saison de mousson au Cambodge (la force d'infection (FOI) - la probabilité instantanée d'infection d'un hôte - journalière étant estimée, en saison des pluies, à 0,032 (sd = 0,006) et, en saison sèche, à 0,046 (sd = 0,008)) (108,109).

La quantification de l'exposition relative au VEJ de chaque espèce, en particulier celle des porcs et des oiseaux domestiques, est une première étape pour documenter et étudier un système de transmission multi-hôtes. La probabilité qu'un hôte sensible soit infecté par un agent pathogène donné par unité de temps peut être estimée à partir des données de séroprévalence et peut être exprimée grâce à la force d'infection (FOI). En 2018, nous avons mené une enquête sérologique chez les porcs, les poulets, les canards et les chiens dans la province de Kandal située à la périphérie de Phnom Penh, la capitale, pour estimer et comparer la FOI exercée sur les individus de ces quatre espèces. L'exposition humaine globale étant difficile à estimer en raison du sous-diagnostic, on peut se demander dans quelle mesure les chiens, qui vivent à proximité des humains, pourraient être un bon indicateur de l'exposition humaine. Les résultats obtenus permettent ensuite de discuter de l'importance relative de ces hôtes dans le cycle épidémiologique du VEJ, de l'existence d'un système épidémiologique complexe multi-hôtes du VEJ, ainsi que de l'utilisation potentielle des chiens comme sentinelles de la circulation du VEJ.

Cette étude a fait l'objet d'une publication dans *Pathogens* (279).

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Zone d'étude

Kandal est une grande province (3179 km<sup>2</sup>), composée de 11 districts, qui entoure Phnom Penh. La province est constituée d'une zone humide de plaine typique, dominée par des champs cultivés et une mosaïque de zones rurales et périurbaines. Le climat est chaud et humide, avec une saison des moussons entre mai et octobre. Dans cette zone, les porcs et les volailles sont élevés soit dans les basses-cours (système d'élevage traditionnel où les animaux sont élevés, souvent en faible densité, dans l'enceinte de la maison familiale), soit dans des fermes (système d'élevage dit moderne dans des installations spécifiques).

La région est caractérisée par une faible densité de porcs. Même si l'élevage de porcs au Cambodge connaît de profonds changements en raison de l'arrivée de l'agriculture industrielle, qui fait baisser le prix de la viande, l'élevage traditionnel de porcs dans les basses-cours reste prédominant. La production porcine est concentrée dans les provinces du Sud et Sud—Est du Cambodge, dont Kandal. En 2004, la FAO a estimé la densité porcine dans la province de Kandal à environ 50 animaux par km<sup>2</sup> (110,111). A titre de comparaison, la densité des porcs élevés dans la région de Bretagne, en France, est de plus de 250 par km<sup>2</sup> (112). Les districts et villages ont été sélectionnés en fonction de leur accessibilité (consentement de l'éleveur et accès aux fermes et basses-cours).

### 2.2. Prélèvements sanguins des chiens

Les sérums de chiens ont été acquis dans le cadre du projet de recherche “Man’s best friend: A cross border transdisciplinary One Health approach to rabies control in dogs in Southeast Asia” qui a débuté en mars 2018. Des visites en porte à porte ont été effectuées dans 10 villages du district de Khsach Kandal dans la province de Kandal. Chaque chien recensé a été identifié individuellement et les données relatives à l'âge, au sexe, et au fait qu'il soit attaché, gardé dans l'enceinte de la maison ou divaguant ont été enregistrées. Chaque chien a été vacciné contre la rage. Parmi les 2200 chiens enregistrés, 800 ont fait l'objet d'un prélèvement sanguin. Au total, 188 échantillons ont ainsi pu être inclus dans notre étude sur la base d'un volume de sérum suffisant pour la sérologie de la rage et du VEJ.

### 2.3. Prélèvements sanguins des porcs, des poulets et des canards domestiques

Entre octobre et décembre 2018, 122 porcs, 228 poulets et 128 canards provenant de fermes, de basses-cours et d'abattoirs de 21 villages de la province de Kandal ont été échantillonnés (Figure 5). Les animaux échantillonnés ont été choisis au hasard parmi ceux âgés de plus d'un mois pour les volailles, et de plus de deux mois pour les porcs, afin d'éviter d'interférer avec l'immunité maternelle (108,280). Notre objectif étant d'étudier les forces d'infection et sachant que la séroprévalence est élevée chez les porcs et qu'elle augmente avec l'âge, nous nous sommes concentrés sur les porcs de basses-cours et d'élevages, qui sont abattus avant l'âge de 6 à 7 mois. Les sérums ont été collectés dans 35 basses-cours, sept fermes (3 fermes pour les porcs, 2 pour les canards et 2 pour les poulets), et cinq abattoirs (4 pour les porcs et 1 pour les poulets), situés dans le district où les chiens avaient été échantillonnés (Khsach Kandal) ainsi que dans deux districts voisins (Kean Svay et Koh Thum). Cent animaux (porcs et poulets) ont dû être échantillonnés à l'abattoir, les éleveurs étant parfois réticents à donner accès à leurs animaux qui sont souvent leur seule source de revenus. Les animaux prélevés à l'abattoir venaient d'y être amenés (généralement le matin même), et leurs âges et origines géographiques étaient précisément connus des responsables de l'abattoir : le district de l'abattoir pour la plupart, hormis certains poulets qui provenaient de deux districts voisins, toujours dans la province de Kandal (Angk Snuol et S'ang, n = 35) (Figure 5).

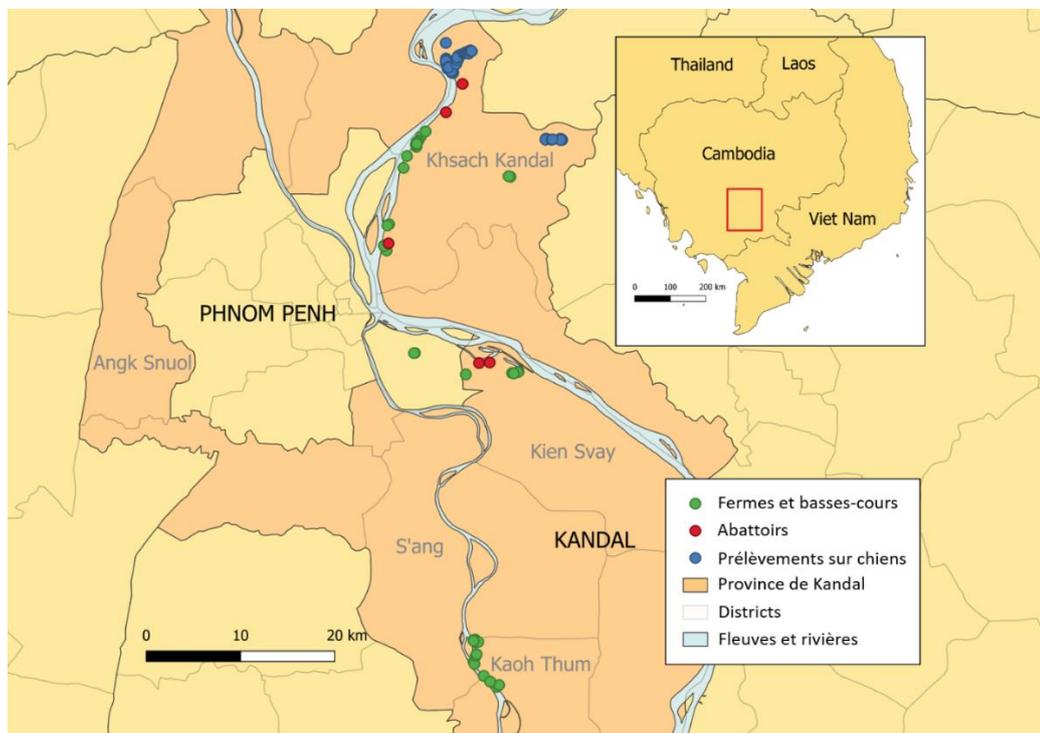


Figure 5 : Localisation des sites de prélèvements.

Les porcs étaient âgés de 2 à 6 mois, les poulets de 1 à 24 mois et les canards de 1 à 15 mois. Les échantillons de sang ont été prélevés dans la veine jugulaire chez les porcs et dans la veine cubitale ou métatarsienne chez les volailles (Figure 6). Les échantillons ont été recueillis sur des tubes de sang sec et conservés à 4°C après le prélèvement, puis transportés à l'Institut Pasteur du Cambodge (IPC), où le sérum a été immédiatement séparé par centrifugation et a été congelé à -80°C jusqu'aux analyses ultérieures.



*Figure 6 : Prélèvements sanguins sur porcs et volailles à Kandal avec les membres de l'équipe de l'Institut Pasteur du Cambodge, les vétérinaires officiels de district et de commune, et les responsables d'abattoirs (Crédit photos Hélène Ladreyt)*

#### 2.4. Déclaration d'éthique

Tous les échantillons utilisés dans cette étude ont été collectés conformément aux principes de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) sur le bien-être des animaux, inclus dans le Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE (281). Les campagnes d'échantillonnage

ont été mises en œuvre sous la supervision de la Direction générale de la production et de la santé animales du Cambodge (GDAPH) et des services vétérinaires locaux.

## 2.5. Analyse de laboratoire des prélèvements sanguins

Tous les échantillons de sang ont été analysés par l'unité de virologie de l'IPC. Ils ont d'abord été testés par inhibition de l'hémagglutination (IHA). Les échantillons positifs ont ensuite été testés pour les anticorps neutralisants (Acn) contre le VEJ et le virus de la dengue sérotype 3 (DENV-3) par le test de neutralisation par réduction des foyers (FRNT) s'il restait un volume suffisant de sérum. La stratégie consistait à tester à la fois le VEJ et le DENV. En effet, la dengue est endémique au Cambodge (282,283) et peut induire des réactions croisées avec des anticorps anti-VEJ (33,34).

### 2.5.1. Cellules et virus

Les cellules Simian Vero (ATCC CCL-81) ont été utilisées pour la détection des anticorps neutralisants par FRNT. Ces dernières ont été cultivées dans du milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM ; Sigma-Aldrich, Steinheim, Allemagne) complétée par 10 % de sérum fœtal bovin (FBS ; Gibco, Gaithersburg, MD, USA) et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine (Gibco) à 37°C et sous une atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. Tous les virus ont été cultivés dans des cellules C6/36 d'*Aedes albopictus*. Ces cellules de moustiques ont été cultivées dans du milieu Leibovitz-15 (Sigma-Aldrich) complété par 10 % de FBS, 1 % de L-glutamine (Gibco), 10 % de tryptose-phosphate (Gibco) et 100 U/ml de pénicilline-streptomycine à 28°C. Les souches VEJ Nakayama (Genbank EF571853) et Dengue 3 (DENV-3) H87 (Genbank M93130) ont été utilisées pour l'IHA et le FRNT.

### 2.5.2. Inhibition de l'hémagglutination (IHA)

La présence d'anticorps dans les échantillons de sérum a été analysée par IHA en utilisant des antigènes provenant des souches VEJ et DENV-3 mentionnées ci-dessus. Le test a suivi le protocole décrit précédemment (243), adapté aux plaques de microtitration de 96 puits.

### 2.5.3. Test de neutralisation par réduction des foyers (FRNT)

Le FRNT détermine le titre d'anticorps neutralisants et a été réalisé comme décrit dans une enquête précédente (284), modifié en utilisant des cellules Vero. Le titre d'anticorps neutralisants (Acn) était exprimé comme la dilution réciproque du sérum qui induit une

réduction de 50% de l'infection visualisée sous forme de foyers (FRNT50) par rapport aux témoins (sérum négatif au flavivirus et témoin viral), et a été calculé par analyse de régression logarithmique probit (SPSS pour Windows, version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Sur la base des hypothèses (i) d'une séroprévalence faible ou modérée pour les volailles et les chiens et (ii) du fait que les hôtes secondaires ont en général des titres d'anticorps plus faibles, nous avons utilisé le FRNT50 pour augmenter la sensibilité de notre enquête, moins strict que le FRNT80 qui demande une réduction des foyers de 80%. Les titres de FRNT50 inférieurs à 10 ont été considérés comme négatifs. Les résultats de FRNT ont été classés en quatre catégories en fonction du titre d'anticorps neutralisants anti-VEJ et anti-DENV : (i) "VEJ positif" si seuls des anticorps anti-VEJ étaient détectés ou si le titre d'anticorps anti-VEJ était quatre fois supérieur au titre d'anticorps anti-DENV ; (ii) "DENV positif" si seuls des anticorps anti-DENV étaient détectés ou si le titre d'anticorps anti-DENV était quatre fois supérieur au titre d'anticorps anti-VEJ ; (iii) "doublement positif pour le VEJ et le DENV" si les anticorps anti-VEJ et anti-DENV étaient détectés avec des titres d'anticorps similaires (moins d'un facteur 4 de différence) ; (iv) "négatif" si aucun anticorps n'était détecté. Dans ce dernier cas, la conclusion était "Flavivirus positif", car les échantillons testés en FRNT étaient tous positifs à l'IHA.

## 2.6. Analyse statistique

Les échantillons qui n'ont pas pu être testés en FRNT après un résultat positif à l'IHA (en raison d'un volume insuffisant de sérum) et ceux pour lesquels l'âge de l'animal n'était pas disponible ont été exclus de l'analyse.

Nous avons utilisé des modèles mixtes logistiques pour analyser la relation entre le risque de séropositivité et deux variables : l'espèce (porc, canard, poulet ou chien) et l'âge (en mois). L'effet d'éventuelles variations géographiques du risque de séropositivité a été contrôlé en ajoutant le district d'origine comme effet aléatoire (pour permettre la convergence du modèle, les échantillons des districts où aucun animal positif n'avait été observé ont été exclus des données utilisées). Deux modèles mixtes logistiques ont été ajustés : l'un pour les résultats d'IHA et l'autre pour les résultats de FRNT. Nous avons considéré que l'animal était séropositif au VEJ lorsque le résultat du test FRNT était "VEJ positif" ou "VEJ et DENV double-positif", puisque les deux cas indiquent une infection antérieure au VEJ chez l'animal échantillonné.

En raison de la surface relativement petite de la zone d'étude et de la faible saisonnalité de la circulation du VEJ dans la province de Kandal, la FOI a été supposée constante dans l'espace et le temps, mais variable selon l'espèce hôte (108,109). Sous cette hypothèse, la force d'infection par les flavivirus (basée sur les résultats d'IHA) et par le VEJ (basée sur les résultats de FRNT) peut être estimée en maximisant la vraisemblance conjointe des données de séroprévalence par âge. La probabilité qu'un animal d'une espèce donnée (*esp*) soit séronégatif (1) ou séropositif (2) a été exprimée respectivement comme suit :

$$P(neg|esp) = e^{-\lambda_{esp}\alpha} \quad (1)$$

$$P(pos|esp) = 1 - e^{-\lambda_{esp}\alpha} \quad (2)$$

Avec  $\alpha$  l'âge en mois, et  $\lambda_{esp}$  la FOI mensuelle qui s'exerce sur un individu de l'espèce *esp*.

La vraisemblance conjointe des données observées (c'est-à-dire le produit des probabilités ci-dessus pour l'ensemble des animaux inclus dans l'étude) a ensuite été maximisée pour obtenir l'estimation de la FOI spécifique d'une espèce hôte, et le modèle a été ajusté successivement pour chacune des quatre espèces étudiées. La matrice de variance-covariance, obtenue en inversant la matrice Hessienne, a permis de calculer les intervalles de confiance des FOI. Toutes les analyses ont été effectuées avec le logiciel R version 3.6.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienne, Autriche) (285).

A des fins de comparaison et en utilisant la même méthodologie, nous avons estimé la FOI par les flavivirus s'exerçant sur les poulets et les canards, en utilisant des données sérologiques d'une enquête sur les volailles mise en œuvre dans la même province en mars 2016 (33) (Annexe 2).

## 2.7. Calcul de la force d'infection par unité de surface corporelle

La FOI par le VEJ exercée sur un individu d'une espèce hôte donnée est liée à son exposition aux piqûres d'un vecteur compétent. Cette exposition dépend d'une combinaison de la surface corporelle de l'hôte (BSA) et de son attractivité, ainsi que de la préférence trophique du vecteur. Une estimation approximative de la FOI par unité de surface corporelle de l'hôte peut être calculée en utilisant la relation allométrique entre la masse (M) et la BSA :  $BSA \sim M^{2/3}$  (où  $\sim$

désigne la relation de proportionnalité) (286). Cette formule a été utilisée pour calculer le rapport de FOI par unité de BSA entre le porc et les trois autres espèces.

### 3. Résultats

#### 3.1. Description des échantillons et de la séroprévalence

Sur les 666 animaux échantillonnés, sept porcs et huit poulets ont été exclus parce que leur âge était inconnu, et trois porcs ont été exclus parce que le volume de sérum était insuffisant pour réaliser le FRNT. Au total, 648 sérums d'animaux ont été testés par IHA (112 porcs, 128 canards, 220 poulets et 188 chiens) et 134 échantillons (21%) étaient positifs pour les anticorps anti-flavivirus. La séroprévalence des flavivirus était de 31 % pour les porcs [23-41%]<sub>IC95%</sub>, 2% pour les poulets [1-5%]<sub>IC95%</sub>, 15% pour les canards [9-22%]<sub>IC95%</sub> et 40% pour les chiens [33-48%]<sub>IC95%</sub>. Parmi ces sérums positifs à l'IHA, 125 ont révélé des anticorps neutralisants détectables par FRNT. La séroprévalence anti-VEJ à partir des résultats de FRNT50 (c'est-à-dire la proportion d'animaux positifs au VEJ et doublement positifs au VEJ et au virus de la dengue (DENV)) était de 31% pour les porcs [23-41%]<sub>IC95%</sub>, de 1% pour les poulets [0,1-3%]<sub>IC95%</sub>, de 12% pour les canards [7-19%]<sub>IC95%</sub> et de 35% pour les chiens [28-42%]<sub>IC95%</sub> (Tableau 8).

**Tableau 8 :** Résultats des tests sérologiques pour les taux de séroprévalence anti-flavivirus (mesurés par inhibition de l'hémagglutination (IHA)) et anti-VEJ (mesurés par FRNT).

Espèce	IHA (Pos/Testé)	FRNT (Pos/Testé)			Taux de séroprévalence	
		VEJ <sup>a</sup>	DENV <sup>b</sup>	VEJ et DENV <sup>c</sup>	Flavivirus (IHA) <sup>d</sup>	VEJ (FRNT) <sup>e</sup>
<b>Porcs</b>	35/112	34/35	0/35	1/35	0,31	0,31
<b>Poulets</b>	4/220	0/4	2/4	2/4	0,02	0,01
<b>Canards</b>	19/128	2/19	2/19	13/19	0,15	0,12
<b>Chiens</b>	76/188	63/76	4/76	2/76	0,40	0,35
<b>Districts d'origine</b>						
<b>Khsach Kandal</b>	112/335	84/112	6/112	15/112	0,33	0,30
<b>Kean Svay</b>	18/110	14/18	2/18	2/18	0,16	0,15
<b>Koh Thum</b>	4/168	1/4	0/4	1/4	0,02	0,01

	<b>Angk Snuol</b>	0/30	nf	nf	nf	0	nf
	<b>S'ang</b>	0/5	nf	nf	nf	0	nf
<b>Groupes d'âge *</b>							
<b>Porcs</b>	<b>2 à 4 mois</b>	9/58	9/9	0/9	0/9	0,16	0,16
	<b>&gt; 4-5 mois</b>	12/28	11/12	0/12	1/12	0,43	0,43
	<b>&gt; 5-6 mois</b>	14/26	14/14	0/14	0/14	0,54	0,54
<b>Poulets</b>	<b>1 à 2 mois</b>	0/129	nf	nf	nf	0	nf
	<b>&gt; 2-3 mois</b>	3/59	0/3	2/3	1/3	0,05	0,02
	<b>&gt; 3-24 mois</b>	1/32	0/1	0/1	1/1	0,03	0,03
<b>Canards</b>	<b>1 à 2 mois</b>	2/65	1/2	0/2	0/2	0,03	0,02
	<b>&gt; 2-5,5 mois</b>	6/40	1/6	0/6	4/6	0,15	0,13
	<b>&gt; 5,5-15 mois</b>	11/23	0/11	2/11	9/11	0,48	0,39
<b>Chiens</b>	<b>1,5-24 mois</b>	30/103	21/30	3/30	1/30	0,29	0,21
	<b>&gt; 24-48 mois</b>	26/45	25/26	0/26	0/26	0,58	0,56
	<b>&gt; 48-108 mois</b>	20/40	17/20	1/20	1/20	0,50	0,45

pos : positifs ; VEJ : virus de l'encéphalite japonaise ; DENV : virus de la dengue (DENV-3). \* Pour toutes les espèces, les groupes d'âge ont été déterminés sur la base des quartiles de leur distribution d'âge ; <sup>a</sup> Détection uniquement d'Acn anti-VEJ ou titre d'Acn anti-VEJ quatre fois supérieur au titre d'Acn anti-DENV ; <sup>b</sup> Détection uniquement d'Acn anti-DENV ou titre d'Acn anti-DENV quatre fois supérieur au titre d'Acn anti-VEJ ; <sup>c</sup> Acn anti-VEJ et anti-DENV détectés avec un titre d'Acn similaire (moins d'un facteur quatre de différence) ; <sup>d</sup> IHA positifs/IHA testés ; <sup>e</sup> (VEJ positifs + VEJ et DENV doublement positifs)/IHA testés ; nf : non fait.

Chez les porcs, la séroprévalence anti-VEJ ne différait pas de manière significative entre les fermes et les basses-cours, avec 26% [14-40%]<sub>IC95%</sub> et 35% [24-48%]<sub>IC95%</sub>, respectivement (test de Fisher  $p = 0,3$ ). Chez les poulets, 1% [0-6%]<sub>IC95%</sub> des animaux étaient positifs au VEJ dans les fermes et 1% [0-4%]<sub>IC95%</sub> dans les basses-cours (test de Fisher  $p = 1$ ). Chez les canards, la séroprévalence anti-VEJ différait significativement entre les fermes et les basses-cours : 41% [25-59%]<sub>IC95%</sub> dans les fermes contre 1% [0-6%]<sub>IC95%</sub> dans les basses-cours (test de Fisher,  $p < 10^{-4}$ ), bien que les canards soient plus âgés dans les fermes que dans les basses-cours (âge médian de 6 et 2 mois, respectivement). La séroprévalence du VEJ augmentait significativement avec le groupe d'âge pour toutes les espèces hôtes (test de Fisher, porcs :  $p = 0,0005$  ; canards :  $p < 10^{-4}$  ; chiens :  $p < 10^{-4}$ ), sauf les poulets (test de Fisher,  $p = 0,17$ ).

### 3.2. Analyse multivariée

A partir des résultats d'IHA et de FRNT, nous avons analysé le risque d'infection par les flavivirus et par le VEJ, respectivement (Tableau 9). Les animaux des districts d'Angk Snuol et de S'ang (n = 35) ont été exclus des données car aucun échantillon positif n'a été trouvé. L'effet district a été contrôlé en ajoutant le district d'origine comme effet aléatoire. En prenant en compte l'âge des animaux, le risque de séropositivité au VEJ était significativement plus faible chez les poulets (OR [odds-ratio] = 0,03 [0,01-0,12]<sub>IC95%</sub>) et chez les chiens (OR = 0,38, [0,18-0,79]<sub>IC95%</sub>) que chez les porcs. À l'inverse, nous n'avons détecté aucune différence significative du risque de séropositivité entre les canards et les porcs. En prenant en compte l'espèce, le risque de séropositivité au VEJ augmentait avec l'âge, avec un OR de 1,14 [1,06-1,23]<sub>IC95%</sub> pour une différence de 6 mois. Des résultats similaires ont été obtenus pour le risque de séropositivité aux flavivirus, la différence entre les chiens et les porcs n'étant pas significative (Tableau 9).

**Tableau 9 :** Résultats du modèle multivarié pour la séoprévalence anti-flavivirus (mesurée par IHA) et anti-VEJ (mesurée par FRNT) chez les porcs, les volailles et les chiens de la province de Kandal, au Cambodge.

Variable	Valeur	Séroprévalence anti-flavivirus (IHA)		Séroprévalence anti-VEJ (FRNT)	
		OR (IC 95 %)	p-Value	OR (IC 95 %)	p-Value
Espèce	Porcs	référence	-	référence	-
	Poulets	0,07 (0,02–0,19)	< 0,0001	0,03 (0,01–0,12)	< 0,0001
	Canards	0,69 (0,31–1,49)	0,34	0,50 (0,22–1,11)	0,09
	Chiens	0,62 (0,31–1,25)	0,18	0,38 (0,18–0,79)	0,009
Age	quantitatif	1,12 * (1,04–1,2)	0,003	1,14 * (1,06–1,23)	0,0004

\* Les Odds Ratios (OR) correspondent à une différence d'âge de 6 mois.

### 3.3. Estimation de la force d'infection par les flavivirus et par le VEJ chez les animaux échantillonnés

Les estimations de la FOI par le VEJ étaient de 0,09 par mois pour les porcs, 0,03 par mois pour les canards, 0,01 par mois pour les chiens et 0,003 par mois pour les poulets (Tableau 10). Un porc avait donc trois fois plus de chances d'être infecté par le VEJ qu'un canard, et un canard avait dix fois plus de chances d'être infecté par le VEJ qu'un poulet. Comme les intervalles de

confiance des estimations de la FOI ne se chevauchaient pas, la probabilité d'infection par le VEJ était significativement plus élevée chez les porcs que chez les canards, plus élevée chez les canards que chez les chiens, et également plus élevée chez les chiens que chez les poulets. Les mêmes résultats ont été trouvés pour la FOI par les flavivirus. Afin d'exclure un effet "district" sur l'estimation des FOI, nous avons estimé les FOIs pour Khsach Kandal seulement, ce district étant le seul où les quatre espèces avaient été échantillonnées (Annexe 3). Les FOI estimées étaient similaires à celles estimées en utilisant l'ensemble des données, sauf pour les poulets, qui étaient tous séronégatifs à Khsach Kandal.

*Tableau 10 : Estimation des forces d'infection (FOI) mensuelles par les flavivirus et par le VEJ, par espèce.*

	FOI par les flavivirus (IHA)		FOI par le VEJ (FRNT)	
	FOI	IC 95%	FOI	IC 95%
<b>Porcs</b>	0,09	(0,07–0,11)	0,09	(0,07–0,11)
<b>Canards</b>	0,04	(0,03–0,06)	0,03	(0,02–0,04)
<b>Chiens</b>	0,02	(0,01–0,02)	0,01	(0,01–0,02)
<b>Poulets</b>	0,007	(0,003–0,014)	0,003	(0,001–0,009)

### 3.4. Force d'infection par surface corporelle (BSA)

Dans la présente étude, le poids médian était de 90 kg pour les porcs (âge médian de 4 mois), de 0,8 kg pour les poulets et canards (âge médian de 2 mois) et de 15 kg pour les chiens (âge médian de 25 mois). Les ratios de FOI par unité de surface corporelle (BSA) étaient de 0,13 entre les porcs et les canards, ce qui indique que, pour une BSA donnée, les canards étaient plus susceptibles d'être infectés par le VEJ que les porcs. En revanche, les ratios de FOI par unité de BSA étaient de 1,3 entre les porcs et les poulets, et de 1,9 entre les porcs et les chiens, ce qui suggère que les poulets et les chiens étaient moins susceptibles d'être infectés par le VEJ que les porcs pour une BSA donnée.

### 3.5. Force d'infection estimée chez les volailles en 2016

En 2016, la FOI par les flavivirus était estimée à 0,05 [0,04-0,07]<sub>IC95%</sub> par mois chez les canards et à 0,03 [0,02-0,03]<sub>IC95%</sub> par mois chez les poulets échantillonnés dans la province de Kandal (Annexe 2).

## 4. Discussion

Le VEJ circule chez les porcs dans presque tous les pays d'Asie du Sud-Est (287). L'exposition des canards au VEJ (détection d'anticorps anti-VEJ) a été démontrée au Cambodge et en Inde, de même que celle des poulets au Cambodge et à Singapour (33,67,79). Enfin, des anticorps anti-VEJ ont été détectés chez des chiens à Singapour et au Japon (61,67). Notre étude, menée chez 112 porcs, 128 canards, 220 poulets et 188 chiens de cinq districts de la province de Kandal, au Cambodge, confirme que l'encéphalite japonaise circule dans cette province et que les quatre espèces testées sont exposées au VEJ, à des degrés différents. La séroprévalence observée du VEJ était similaire pour les chiens (35%) et les porcs (31%) mais, en contrôlant d'effet de l'âge, l'analyse multivariée a montré que le risque de séropositivité était plus élevé pour les canards et les porcs, que pour les poulets et les chiens. Pour les quatre espèces, le risque de séropositivité augmentait avec l'âge.

La séroprévalence calculée à partir de nos échantillons était globalement inférieure à celle rapportée dans d'autres études, en particulier pour les poulets. Cela est probablement dû à l'âge des animaux échantillonnés. A l'exception des chiens, la plupart des animaux que nous avons échantillonnés étaient très jeunes, de sorte que la période d'exposition au VEJ était courte. Selon la région étudiée (Népal, Bali, Vietnam et Cambodge), les données publiées font état de taux de séroprévalence anti-flavivirus qui varient de 32% à 65% chez les porcs, de 24% à 37% chez les poulets et de 31% à 40% chez les canards (33,78,107,205,209). Dans une étude de la séroprévalence anti-VEJ chez les volailles, menée en 2016 à Kandal (33), un modèle statistique de séroprévalence par âge prédisait une séroprévalence de 5 à 15% chez les poulets de 3 mois. Nous avons observé une séroprévalence anti-flavivirus plus faible chez les poulets dont l'âge médian était de 3 mois (1% [0,5-4,6%]<sub>IC95%</sub>). Dans la même étude, la séroprévalence chez les canards âgés de 3 mois était estimée à 15-35%, ce qui est cohérent avec la séroprévalence anti-flavivirus que nous avons observée chez les canards (12%, [9,2-22,2%]<sub>IC95%</sub>).

La séroprévalence anti-VEJ déterminée à l'aide du FRNT n'a pas pu être directement comparée aux études transversales mentionnées ci-dessus, car les méthodes d'analyse sérologique différaient. En Inde, des sérums de canards prélevés pour l'étude et positifs en ELISA ont été testés par neutralisation virale en microtitration (micro-VNT), une variante du

FRNT, rapportant une séroprévalence anti-VEJ de 10% (79). Une étude menée à Singapour (utilisant un seuil d'interprétation plus strict, FRNT80) a montré des niveaux de séroprévalence élevés avec 60% des poulets échantillonnés ( $n = 20$ ) et 39,6% des chiens échantillonnés révélant des anticorps neutralisants anti-VEJ (67).

Comme attendu, les porcs avaient la plus forte probabilité mensuelle d'être infectés par le VEJ (FOI par le VEJ mensuelle = 0,09). Il est intéressant de noter que les canards étaient les hôtes les plus exposés après les porcs, avec une FOI par le VEJ de 0,03 par mois, suivis des chiens (FOI par le VEJ mensuelle = 0,01). Les poulets étaient les moins susceptibles d'être infectés, avec une FOI par le VEJ estimée à 0,003 par mois. Concernant la probabilité mensuelle de contracter une infection par un flavivirus, la comparaison des valeurs de FOI de notre étude (2018) avec celles estimées à partir de l'enquête menée à Kandal en 2016 (33) a révélé des probabilités mensuelles d'infection chez les canards proches en 2016 (0,05 [0,04-0,07]<sub>IC95%</sub>), et en 2018 (0,04 [0,03-0,06]<sub>IC95%</sub>). Ce dernier résultat suggère que, pour les canards, il existe peu de saisonnalité et peu de variation interannuelle de l'intensité de la transmission de l'EJ dans cette province. La FOI par les flavivirus chez les poulets était cependant plus élevée en 2016 qu'en 2018 (0,03 [0,02-0,03]<sub>IC95%</sub> par mois en 2016, 0,007 [0,003-0,01]<sub>IC95%</sub> par mois en 2018), une différence pour laquelle nous n'avons pas trouvé d'explication plausible compte tenu des données disponibles.

La FOI par le VEJ exercée sur un individu résulte de son exposition aux piqûres d'un vecteur compétent. Elle dépend de la préférence trophique du vecteur et d'une combinaison de l'attractivité de l'hôte et de sa surface corporelle (BSA). Les études sur les préférences trophiques des vecteurs du VEJ ont montré que les espèces de *Culex* sont souvent opportunistes. Ainsi, en Chine et au Sénégal, il a été démontré que *Culex tritaeniorhynchus*, vecteur majeur du VEJ, se nourrit de plusieurs hôtes, tels que les porcs, les volailles, les chiens, les bovins et les hommes, dans des proportions différentes (99,100). En Inde, certaines études ont confirmé que la disponibilité des hôtes joue un rôle important dans le comportement alimentaire de ce même vecteur (94,101). D'après nos résultats, le rapport entre la FOI par unité de surface corporelle des porcs sur la FOI par unité de surface corporelle des canards était inférieur à 1, ce qui suggère que, à surface corporelle identique, les canards avaient une probabilité plus élevée d'être infectés que les porcs. Puisque les canards développent expérimentalement une

virémie suffisamment élevée pour infecter les moustiques (83,276), des études supplémentaires devraient être mises en œuvre pour mieux comprendre leur rôle dans le cycle épidémiologique du VEJ et analyser les contributions relatives des porcs et des canards dans la circulation du VEJ. A l'inverse, les rapports de FOI par unité de BSA entre les porcs et les poulets ou les chiens étaient supérieurs à 1 : pour une surface corporelle identique, les porcs étaient plus exposés que les poulets et les chiens. Dans des conditions expérimentales, les poulets infectés semblent développer une virémie plus faible que les canards, ce qui suggère qu'ils pourraient jouer un rôle moins important dans la circulation du VEJ (83). Cependant, les estimations de densité des différentes espèces dans la zone d'étude de Kandal montrent qu'il y a environ dix fois plus de poulets que de canards (données non publiées, observation sur le terrain : environ 10 000 poulets et 900 canards dans un village moyen de la province de Kandal). En outre, les poulets sont abattus lorsqu'ils ont environ 6 mois, contrairement aux canards, qui sont élevés pour la viande jusqu'à ce qu'ils aient plus de 2 ans. Ainsi, l'abondance et le fort renouvellement de la population (et donc l'introduction fréquente d'hôtes naïfs) des poulets pourraient compenser leur faible force d'infection par le VEJ et en faire un maillon important du cycle épidémiologique du VEJ.

Notre étude confirme le rôle central des porcs dans le maintien de la transmission du VEJ. Dans les pays où les porcs sont élevés loin des habitations humaines, ou dans les pays où l'élevage porcin est peu ou pas pratiqué, cette espèce ne peut être utilisée comme sentinelle de la circulation du VEJ, mais d'autres animaux domestiques vivant à proximité de l'homme constituent des sentinelles potentielles. Des études antérieures ont montré que les chiens pouvaient être de bonnes sentinelles pour le virus West Nile (10,116), la borréliose de Lyme (117) et d'autres maladies transmises par des arthropodes (118). En outre, l'exposition de chiens au VEJ a déjà été observée à Singapour et au Japon (61,67). La présente étude est la première à proposer une quantification de l'exposition de chiens au VEJ au Cambodge. Des infections expérimentales par le VEJ chez des chiens ont montré qu'ils développaient une immunité durable mais sans signes cliniques et ne provoquant qu'une faible virémie, bien que le nombre de chiens considérés dans l'étude soit très faible ( $n=3$ ) (62). De plus, les chiens ont une valeur économique moindre par rapport aux porcs et les propriétaires pourraient mieux accepter le prélèvement de leurs animaux. Au Cambodge, les chiens sont nombreux avec un ratio chien/homme estimé à 1:3,8 dans certaines régions (115) et vivent à proximité des humains même lorsqu'ils sont en liberté. Les chiens pourraient donc être un bon indicateur de l'exposition

humaine au VEJ. Même si l'on sait que l'EJ est endémique et répandue au Cambodge, la distribution spatiale et temporelle de la maladie n'est pas bien connue, car les études se concentrent sur la capitale, Phnom Penh, et la province voisine de Kandal. Il n'existe par ailleurs pas de système de surveillance et/ou d'alerte sur le pays. Par conséquent, l'utilisation de chiens comme sentinelles permettrait d'étudier le niveau de circulation du virus et d'exposition de l'homme dans des zones plus larges, et d'identifier ainsi les principales zones à risque. Les chiens sentinelles peuvent par ailleurs être un choix pertinent pour mettre en place une surveillance dans un pays où la circulation du VEJ suit un schéma épidémique, ou même servir de système d'alerte précoce pour l'introduction du VEJ dans un pays exempt de la maladie.

Comme d'autres l'ont fait auparavant (76,82), nous remettons ainsi en question le dogme qui limite le cycle de transmission du VEJ aux porcs, vecteurs et oiseaux sauvages. Notre étude démontre la circulation du VEJ dans un système plus large et multi-hôtes, impliquant plusieurs espèces d'animaux domestiques. Haydon *et al.* (2002) ont défini une communauté de maintenance comme une ou plusieurs populations ou environnements épidémiologiquement connectés dans lesquels l'agent pathogène peut être maintenu en permanence et à partir desquels l'infection est transmise à une population cible définie (22). Dans notre cas, la diversité des hôtes peut expliquer pourquoi le VEJ circule de manière intense, même dans des systèmes épidémiologiques où la densité de son hôte principal, le porc, est relativement faible. Le maintien de l'EJ pourrait être ainsi être permis non pas par une seule espèce réservoir mais par une communauté de maintenance composée de tous les hôtes présents dans un village (porcs, canards, poulets, chiens, mais aussi bovins et humains) et des vecteurs. Roberts et Heesterbeek (2020) ont souligné que la capacité de réservoir d'une ou d'un groupe d'espèce(s) peut être soumise à des changements dans l'espace et dans le temps (21). En fonction des conditions environnementales, une espèce donnée peut être plus ou moins impliquée dans le cycle épidémiologique. L'étape suivante de ce travail a consisté à développer un modèle mathématique de la circulation du VEJ dans la province de Kandal dans ce système multi-hôtes afin d'analyser et de quantifier les rôles respectifs des différentes espèces hôtes dans la transmission du VEJ.

L'étude confirme le rôle central des porcs dans la circulation du VEJ mais démontre une exposition significative d'autres hôtes potentiellement compétents : poulets et canards seraient également impliqués dans le cycle de transmission au niveau d'un village cambodgien. Cette étude démontre également une exposition significative d'hôtes non compétents : les chiens, ce qui suggère une forte exposition de l'homme même si celle-ci n'a pas pu être mesurée. Au niveau d'un village cambodgien, le système épidémiologique devrait donc être envisagé comme un système multi-hôtes composé de vecteurs, d'hôtes compétents (porcs, canards et poulets), et d'hôtes non compétents (chiens, bovins et humains). Ce second chapitre nous a permis de réunir l'ensemble des éléments nécessaires au développement d'un modèle mathématique. Dans la partie suivante nous utilisons en effet la modélisation pour analyser comment l'abondance relative des différents hôtes influe sur la capacité du système épidémiologique à permettre une circulation pérenne du VEJ dans un village, sur l'intensité de la transmission ainsi que sur le niveau d'exposition humaine.



# CHAPITRE 3 : Modélisation de la dynamique de transmission du virus de l'encéphalite japonaise et de l'exposition humaine dans un système multi-hôtes rural cambodgien.

## 1. Introduction

L'enquête sérologique que nous avons menée dans la province de Kandal, au Cambodge, a montré que la force d'infection par le VEJ, c'est-à-dire la probabilité instantanée d'être infecté, exercée sur les canards était comparable à celle exercée sur les porcs (279).

Les moustiques *Culex spp.*, principaux vecteurs du VEJ, sont opportunistes et peuvent se nourrir sur diverses espèces d'hôtes, en fonction de l'abondance locale des hôtes et de facteurs intrinsèques propres à l'espèce vectrice (26-28). Ces hôtes peuvent être compétents, c'est-à-dire présenter une virémie suffisamment élevée pour infecter en retour un moustique piqueur, comme les porcs, les oiseaux aquatiques et les volailles (33,52–54), ou non, comme les bovins, les chiens, les hommes et les chevaux (31-34). Dans le cas d'agents infectieux à transmission vectorielle tels que le VEJ, un système multi-hôtes peut être défini comme un système composé de plusieurs populations d'hôtes, compétents ou non compétents, associés à une ou plusieurs populations de vecteurs compétents (22). Dans des conditions spécifiques, un système multi-hôtes peut constituer une communauté de maintenance. D'après les définitions de Haydon *et al.* (2002), Viana *et al.* (2014) et Roberts *et al.* (2020), une communauté de maintenance est un système multi-hôtes composé de populations, compétentes et non compétentes, liées épidémiologiquement, dans lequel la transmission d'un agent pathogène persiste (21–23). Le nombre de reproduction de base ( $R_0$ ) est l'indicateur couramment utilisé pour mesurer si un agent infectieux peut ou non circuler durablement dans une population (23,291). Un système multi-hôtes peut alors être considéré comme une communauté de maintenance lorsque le  $R_0$  du système reste supérieur à 1 pendant une période donnée (23), et les variations d'abondance des différents hôtes du système multi-hôtes peuvent affecter la valeur de  $R_0$ .

L'EJ est endémique au Cambodge, et reste la cause la plus fréquente d'encéphalite aiguë, en particulier chez les enfants et les adolescents (104,105). Le Cambodge est un pays

essentiellement rural, bien que la densité de porcs domestiques soit faible par rapport à d'autres pays où le VEJ circule, comme le Japon, la Chine ou le Vietnam (76,111,260,209). Dans la province de Kandal, une région rurale du Cambodge qui entoure la capitale Phnom Penh, la majorité du bétail est élevé dans des basses-cours, avec une grande proximité entre les porcs, les poulets, les canards, les bovins et les humains. Dans cette région, des travaux récents ont montré la présence tout au long de l'année de vecteurs du VEJ se nourrissant sur les porcs, les poulets, les hommes, les chiens et les bovins (288,292). Bien que les densités d'hôtes du VEJ soient faibles (353 poulets et 66 porcs par km<sup>2</sup> dans la province de Kandal (111,110)), ce système multi-hôtes, composé de porcs, de canards et de poulets comme hôtes compétents, d'humains et d'autres mammifères (comme les bovins et les chiens) comme hôtes non compétents, et de *Culex spp.* comme vecteurs, pourrait permettre la circulation du VEJ toute l'année, constituant ainsi une communauté de maintenance. Toute modification de ce système, qu'elle soit consécutive à l'intensification de l'élevage porcin, à des problèmes de santé animale ou à une gestion du paysage qui affecterait la densité ou la diversité des hôtes et des moustiques, pourrait modifier la dynamique de transmission du VEJ et son impact sur la santé humaine.

L'exposition globale de la population est donc probablement sous-estimée et l'incidence clinique de l'EJ au Cambodge reste difficile à évaluer, bien que cela permettrait de promouvoir les campagnes de vaccination. Un suivi à long terme des cas cliniques dans les hôpitaux, associé à des enquêtes sérologiques à grande échelle pourrait être utilisé pour évaluer l'impact du VEJ sur la santé publique, mais de telles études restent difficiles, en particulier dans les pays à revenu faible ou intermédiaire. Mesurer l'exposition des chiens pourrait être une solution alternative. En effet, l'exposition des chiens au VEJ a été démontrée à Singapour et au Japon (avec des anticorps neutralisant anti-VEJ détectés chez 17% à 39,6% des chiens échantillonnés) (61,67). Dans la province de Kandal, le ratio chien/homme a été estimé à 1:3,8 en 2017, grâce à un large recensement en porte-à-porte (115). Dans la même région, l'enquête sérologique présentée en partie 2 a montré que 35 % des chiens collectés avaient des anticorps neutralisants anti-VEJ (279), et l'analyse des repas sanguins de *Culex spp.* piégés dans cette région a confirmé que les vecteurs du VEJ pouvaient se nourrir sur des chiens (288). Comme les chiens vivent à proximité des humains, leur séroprévalence anti-VEJ pourrait être un bon indicateur de l'exposition humaine.

Les objectifs de cette étude étaient (i) de modéliser la transmission du VEJ dans un système rural multi-hôtes au Cambodge, (ii) d'analyser comment l'abondance relative de chaque espèce hôte affecte la capacité de ce système à maintenir la transmission du VEJ, et (iii)

d'évaluer et de caractériser la charge de l'infection par le VEJ sur la santé humaine. Pour atteindre ces objectifs, nous avons développé un modèle déterministe à compartiments de transmission dynamique, que nous avons calibré en utilisant des données de terrain et de la littérature. Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour prédire les variations du  $R_0$  et du niveau d'infection par le VEJ chez l'homme en fonction de la composition du système multi-hôte. Nous avons enfin utilisé notre modèle pour analyser la relation entre l'exposition humaine et la séroprévalence canine.

Ce chapitre a fait l'objet d'une soumission dans *Plos Neglected Tropical Diseases*, en cours de révision.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Zone d'étude, populations hôtes et données sérologiques

L'étude se concentre sur trois districts ruraux de la province de Kandal (Khsach Kandal, Kien Svay et Kaoh Thum), situés au nord-est, à l'est et au sud-est de Phnom Penh. C'est dans ces districts qu'a été réalisée l'étude sérologique présentée dans le chapitre 2 visant à évaluer l'exposition relative au VEJ de plusieurs espèces animales (porcs, canards, poulets et chiens) (279). Au cours de cette enquête, le nombre d'animaux et d'humains par ménage a été relevé pour chaque basse-cour où des animaux ont été échantillonnés. Pour 9 des 20 villages visités, les bureaux communaux nous ont fourni le nombre de ménages par village. Aucun recensement des animaux de ferme au niveau du village n'était disponible. Cependant, selon les autorités villageoises, en moyenne 20% des ménages élevaient des porcs et 90% des poulets. La proportion de ménages élevant des canards (30%) a été calculée sur la base de nos observations de terrain, en calculant un rapport entre les ménages élevant des canards et les ménages élevant des poulets. Nous avons ensuite calculé la taille moyenne de la population par espèce et par village dans chacun des trois districts (Tableau 11). En faisant la moyenne des trois districts, nous avons conclu qu'un village traditionnel de la province était composé, en moyenne, de 3420 personnes, 2446 porcs, 285 truies, 941 canards, 10639 poulets, 107 bovins et 1044 chiens.

Dans les trois districts de la zone d'étude, 112 porcs, 185 poulets, 128 canards et 188 chiens de 20 villages ont fait l'objet de prélèvements sanguins. Les échantillons ont été analysés par IHA et séroneutralisation. Selon le district, des anticorps neutralisants ont été trouvés chez

0 à 42% des porcs, 0 à 33% des canards, 0 à 0,02% des poulets et 35% des chiens (Tableau 11) (279).

*Tableau 11 : Tailles de populations d'hôtes calculées pour un village traditionnel de chaque district de la zone d'étude, données sérologiques observées issues de Ladreyt et al. (2020) (1), et séroprévalences prédites par le modèle développé dans ce chapitre.*

<b>District</b>	<b>Espèce</b>	<b>Taille moyenne de la population par village</b>	<b>N. de positifs / N. de testés</b>	<b>Séroprévalence observée [IC 95 %]</b>	<b>Prévision de la séroprévalence [IC 95 %]</b>
<b>(1) Kaoh Thum</b>	<b>Porcs</b>	516,4	0/5	0,00 [0,00-0,52]	0,05 [0,0001-0,16]
	<b>Canards</b>	2020	1/81	0,01 [0,00-0,07]	0,01 [0,00-0,05]
	<b>Poulets</b>	7330	1/82	0,01 [0,00-0,07]	0,004 [0,00-0,01]
	<b>Chiens</b>	232	NA	NA	NA
	<b>Bovins</b>	53,3	NA	NA	NA
	<b>Humains</b>	1630	NA	NA	NA
<b>(2) Kien Svay</b>	<b>Porcs</b>	3644	15/59	0,25 [0,15-0,38]	0,25 [0,15-0,36]
	<b>Canards</b>	509	0/5	0,00 [0,00-0,52]	0,07 [0,03-0,14]
	<b>Poulets</b>	14766	1/46	0,02 [0,00-0,12]	0,01 [0,007-0,02]
	<b>Chiens</b>	1460	NA	NA	NA
	<b>Bovins</b>	39,2	NA	NA	NA
	<b>Humains</b>	4062	NA	NA	NA
<b>(3) Khsach Kandal</b>	<b>Porcs</b>	3275	20/48	0,42 [0,28-0,57]	0,40 [0,27-0,52]
	<b>Canards</b>	683	14/42	0,33 [0,20-0,50]	0,28 [0,18-0,40]
	<b>Poulets</b>	10312	0/57	0,00 [0,00-0,06]	0,02 [0,02-0,04]
	<b>Chiens</b>	1203	65/188	0,35 [0,28-0,42]	0,32 [0,26-0,38]
	<b>Bovins</b>	156	NA	NA	NA
	<b>Humains</b>	3880	NA	NA	NA

## 2.2. Description du modèle

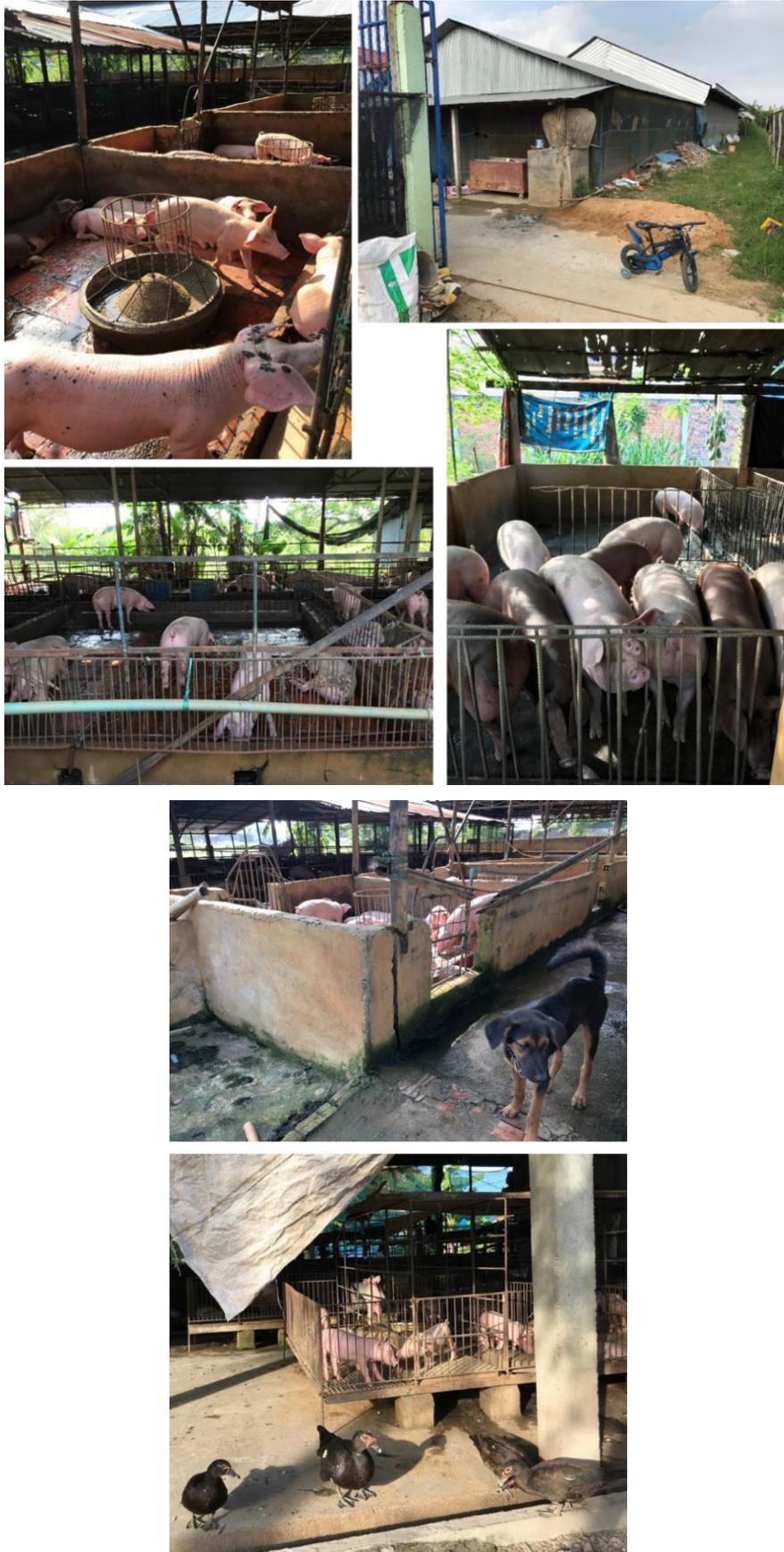
### 2.2.1. Structure du modèle

Le modèle était un modèle déterministe à compartiments, fonctionnant en temps continu. La taille des populations de vecteurs étant importante dans le système étudié (108,292), et le niveau de circulation du VEJ étant élevé (108), nous avons choisi de mettre en œuvre le modèle comme un système déterministe, en utilisant des équations différentielles ordinaires. Une description détaillée du modèle est donnée en Annexe 4. Le système épidémiologique représentait un village rural de la province de Kandal où vivent des porcs, des canards, des poulets, des bovins, des chiens et des humains. En raison de leurs espérances de vie différentes, les porcs ont été divisés en deux compartiments : les porcs d'engraissement et les truies. Selon Boyer *et al.* (2021), ces hôtes sont exposés aux piqûres de *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui* et *Culex gelidus*, les vecteurs les plus abondants de l'encéphalite japonaise dans cette région (288). Ces différentes espèces de vecteurs ont été représentées dans le modèle par une seule population de *Culex spp.*. Nous avons supposé que la transmission directe de porc à porc et la mort induite par la maladie étaient négligeables (259).

Dans notre zone d'étude, les porcs sont élevés dans des enclos ouverts, et les volailles sont souvent en liberté dans les jardins pendant la journée et enfermées dans des enclos la nuit. Les moustiquaires sont rarement utilisées dans les enclos des animaux (Figures 7 et 8). Sur la base de cette organisation de l'élevage, nous avons supposé que tous les hôtes, y compris les humains, étaient exposés de manière homogène à une seule population de vecteurs. Pour cette raison, et parce que la transmission directe a été négligée, il n'a pas été nécessaire de structurer les populations d'hôtes par ménages.



*Figure 7 : Exemples de basse-cour à Kandal. On observe la proximité entre les différentes espèces (ici porcs, volailles, hommes). Photo en haut à droite : en arrière-plan le fleuve, et sous la tôle les enclos des porcs (Crédit photo Hélène Ladreyt).*

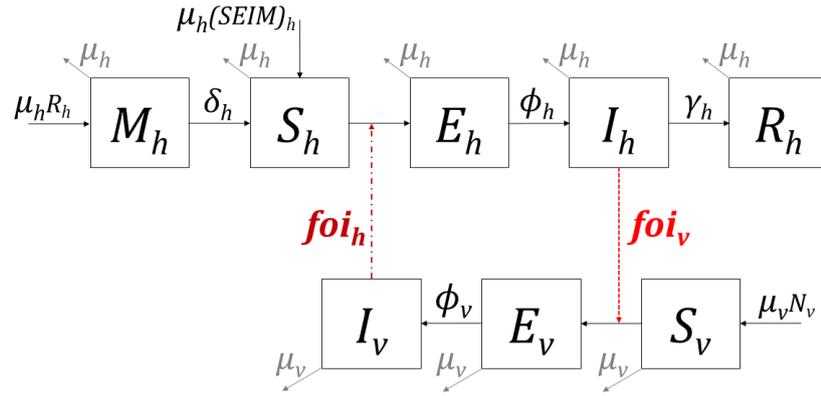


*Figure 8 : Exemple d'élevages de porcs dans la province de Kandal où l'on observe une absence de moustiquaires, une proximité entre les hôtes (ici volailles, porcs et chiens) et une proximité des habitations (Crédit photo Hélène Ladreyt)*

Nous avons supposé qu'il n'y avait que peu ou pas d'échange d'hôtes ou de vecteurs infectés entre le village modélisé et les villages voisins. Les mouvements d'animaux vivants entre les villages sont en effet extrêmement rares (110,111). Seuls les porcs peuvent parfois être transportés vers un abattoir dans un village voisin où ils sont abattus dans les deux jours. Nous avons supposé que la taille des populations d'hôtes était constante, les naissances compensant les décès ou les abattages. En raison de la surface relativement petite de la zone d'étude (3 à 4 km<sup>2</sup>), de la faible saisonnalité de la circulation du VEJ dans la province de Kandal, et de la très grande abondance des vecteurs tout au long de l'année, la taille de la population des vecteurs impliqués dans le cycle a également été supposée constante (108,109,292).

Le modèle simulait la transmission du VEJ entre les hôtes compétents (porcs, canards et poulets) et les vecteurs (*Culex spp.*), ainsi que des vecteurs aux hôtes non compétents (bovins, humains et chiens) dans le village.

La figure 9 montre le diagramme de flux du modèle. Les hôtes ont été classés en 5 états de santé : protégés par leurs anticorps maternels (*M*), sensibles (*S*), latents (*E*), *i.e.* infectés mais non infectieux, infectieux (*I*) et guéris ou résistants (*R*). Les hôtes nés de femelles guéries sont supposés être protégés par les anticorps maternels avant de devenir sensibles. Après avoir été piqués par un moustique infectieux, les hôtes ont une probabilité ( $p_h$ ) spécifique à l'espèce *h* de passer à l'état latent (*E*). Ils passent ensuite à l'état infectieux après une période d'incubation (de durée  $1/\Phi$ ). Après la période infectieuse (virémique), les hôtes deviennent immuns (*R*) et le restent jusqu'à leur mort. Bien que la transmission verticale du VEJ ait été documentée chez les *Culex spp.*, ce phénomène semble être limité (186,293). De plus, la population de vecteurs et l'intensité de la transmission du VEJ dans la zone d'étude sont telles que nous avons supposé que cette transmission verticale du VEJ était négligeable : tous les vecteurs naissent sensibles (*S*). Les vecteurs sensibles ont une probabilité donnée ( $q_h$ ) d'être infectés et de passer à l'état latent (*E*) lorsqu'ils piquent un hôte infectieux de l'espèce *h*,  $q_h$  étant nul pour les hôtes non compétents. Après la période extrinsèque d'incubation, les vecteurs deviennent infectieux (*I*) et le restent jusqu'à leur mort.



**Figure 9 :** Diagramme de flux du modèle dynamique de transmission du virus de l'encéphalite japonaise dans un système multi-hôtes. Les cases représentent les états de santé des hôtes (d'espèce  $h$ ) et des vecteurs *Culex* spp. ( $v$ ) : sous immunité maternelle ( $M$ ), sensible ( $S$ ), latent ( $E$ ), infecté ( $I$ ) et immun à la suite de l'infection naturelle ( $R$ ). Les flèches en trait plein représentent le flux entrant et sortant des compartiments, déterminé par les paramètres associés :  $\mu$  = taux de mortalité,  $\delta$  =  $1/\text{durée de l'immunité maternelle}$ ,  $\Phi$  =  $1/\text{durée de la période d'incubation}$ ,  $\gamma$  =  $1/\text{durée de la période virémique}$ .  $N_v$  est la taille de la population active de vecteurs. Les flèches en pointillés représentent les forces d'infection ( $foi$ ) exercées par un vecteur infecté sur un hôte sensible ( $foi_h$ ) et par des hôtes compétents infectieux sur un vecteur sensible ( $foi_v$ ). La  $foi$  exercée sur un vecteur par un hôte non compétent est nulle car la probabilité d'être infecté ( $q$ ) dans ce cas est de zéro.

### 2.2.2. Forces d'infection

La force d'infection des hôtes ( $foi_h$ ) est la probabilité instantanée qu'un hôte sensible de l'espèce  $i$  soit infecté. Elle représente le taux de transition entre l'état sensible ( $S$ ) et l'état latent ( $E$ ) et a été définie par :

$$foi_h = bx_h p_h \frac{I_v}{N_h} \quad (1)$$

Où :

- $b$  est le taux de piqûre du vecteur (nombre de piqûres par vecteur et par jour), qui est aussi l'inverse de la durée de son cycle gonotrophique,
- $p_h$  est la probabilité de transmission par piqûre du vecteur à un hôte de l'espèce  $h$ ,
- $I_v$  est le nombre de vecteurs infectés et  $N_h$  est le nombre d'hôtes de l'espèce  $h$ .
- $x_h$  est la probabilité qu'un vecteur choisisse un hôte de l'espèce  $h$  pour son repas sanguin, calculée en multipliant la préférence trophique  $\pi_h$  pour l'hôte  $h$  par le nombre d'hôtes de l'espèce  $h$ , divisé par la somme de toutes les préférences trophiques multipliée par la taille des populations d'hôtes :

$$x_h = \frac{\pi_h N_h}{\sum_j \pi_j N_j} \quad (2)$$

$x_h p_h$  représente alors la probabilité de transmission par piqûre d'un vecteur infectieux à un hôte de l'espèce  $h$ , c'est à dire la fraction d'événements de transmission réussis d'un vecteur infecté vers un hôte sensible de l'espèce  $h$  (294).

La force globale d'infection sur les vecteurs est la somme des forces exercées par les différentes espèces hôtes :

$$f o i_v = b \sum_h x_h q_h \frac{I_h}{N_h} \quad (3)$$

Où  $q_h$  est la probabilité qu'un moustique sensible soit infecté après un repas sanguin pris sur un hôte virémique de l'espèce  $h$ , la valeur de ce paramètre étant  $> 0$  pour les espèces hôtes compétentes (porcs, truies, canards et poulets) et nulle pour les espèces hôtes non compétentes (humains, chiens, bovins).

## 2.3. Paramétrisation

### 2.3.1. Paramètres fixés

En plus des tailles de population, nous avons utilisé les données de terrain collectées lors de l'enquête de 2018 (279) pour déterminer la durée de vie moyenne de chaque espèce hôte ( $1/\mu$ ) dans le village modélisé. Les durées respectives des périodes d'immunité maternelle ( $1/\delta$ ), d'incubation ( $1/\Phi$ ) et de guérison ( $1/\gamma$ ), ainsi que le taux de piqûre des vecteurs ( $b$ ), les paramètres de préférences trophiques des vecteurs ( $\pi$ ) et les probabilités de transmission ( $p_h, q_h$ ) ont été fixées conformément à la littérature (Tableau 12). Les estimations des paramètres de préférence trophique des vecteurs ( $\pi$ ) ont été obtenues à partir d'une étude de terrain menée dans la même province (288). L'étude sur la préférence trophique des moustiques et l'enquête sérologique ont été réalisées entre mars et décembre en 2017 et 2018, respectivement.

*Tableau 12 : Paramètres du modèle déterministe*

Paramètre	Définition	Valeur	Références
<b>Hôtes</b>			
$1/\mu_p, 1/\mu_{pl}$	Durée de vie moyenne des porcs et des poulets	6 m*	Données de terrain
$1/\mu_t$	Durée de vie moyenne des truies	3 a	Données de terrain
$1/\mu_c$	Durée de vie moyenne des canards	2 a	Données de terrain
$1/\mu_{humain}$	Durée de vie moyenne des humains	70 a	(295)
$1/\mu_b$	Durée de vie moyenne des bovins	7 a	Données de terrain

$1/\mu_{chien}$	Durée de vie moyenne des chiens	5 a	Données de terrain
$1/\delta_p$	Durée de l'immunité maternelle chez les porcs et les truies	2,5 m	(108,109)
$1/\delta_c, 1/\delta_{pl}$	Durée de l'immunité maternelle chez les canards et les poulets	1 m	(74,280)
$1/\delta_{humain}$	Durée de l'immunité maternelle chez l'homme	5 m	(296,297)
$1/\delta_b, 1/\delta_{chien}$	Durée de l'immunité maternelle chez les bovins et les chiens	3 m	(298,299)
$1/\Phi_p$	Période d'incubation chez les porcs et les truies	2 j	(56,157,158)
$1/\Phi_c$	Période d'incubation chez les canards	2 j	(83,275–277)
$1/\Phi_{pl}$	Période d'incubation chez les poulets	1,5 j	(83,300)
$1/\Phi_{humain}$	Période d'incubation chez l'homme	10 j	(260)
$1/\Phi_b, 1/\Phi_{chien}$	Période d'incubation chez les bovins et les chiens	4 j	(62,301)
$1/\gamma_p$	Période virémique chez les porcs et les truies	1,5 j	(56,157)
$1/\gamma_c, 1/\gamma_{pl}$	Période virémique chez les canards et les poulets	3 j	(83,275,276,300)
$1/\gamma_{humain}, 1/\gamma_b,$ $1/\gamma_{chien}$	Délai d'apparition des anticorps chez l'homme, le bétail et le chien	5 j	(62,301–303)
<b>Vecteurs</b>			
$1/\mu_v$	Durée de vie moyenne des <i>Culex spp.</i>	25 j	(304)
$b$	Taux de piqûre de <i>Culex spp.</i>	0,25	(305,306)
$1/\Phi_v$	Période extrinsèque d'incubation de <i>Culex spp.</i>	10 j	(276,307)
<b>Interactions vecteur/hôte</b>			
$\pi_p$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les porcs et les truies	1**	(288)
$\pi_c$	Préférence trophique relative des <i>Culex spp.</i> pour les canards**.		<b>Estimé</b>
$\pi_{pl}$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les poulets**.	0,09	(288)
$\pi_{humain}$	Préférence trophique relative des <i>Culex spp.</i> pour les humains**	0,5	(288)
$\pi_b$	Préférence trophique relative des <i>Culex spp.</i> pour les bovins**	1,7	(288)
$\pi_{chien}$	Préférence trophique relative des <i>Culex spp.</i> pour les chiens**		<b>Estimé</b>
$p_h$	Probabilité de transmission d'un vecteur ( <i>Culex spp.</i> ) à un hôte de l'espèce $h$	0,5	(276,88,308,275)
$q_{hc}$	Probabilité de transmission d'un hôte compétent à un vecteur ( <i>Culex spp.</i> )	0,5	(88,276,307–309)

$q_{hnc}$	Probabilité de transmission d'un hôte non compétent à un vecteur ( <i>Culex spp.</i> )	0	(62,301)
<b>Tailles de populations</b>			
$N_v$	Nombre de vecteurs ( <i>Culex spp.</i> ) impliqués dans la transmission du VEJ dans le village modélisé	<b>Estimé</b>	
$N_p$	Nombre de porcs dans le village modélisé	2446	Données de terrain
$N_t$	Nombre de truies dans le village modélisé	285	Données de terrain
$N_c$	Nombre de canards dans le village modélisé	941	Données de terrain
$N_{pl}$	Nombre de poulets dans le village modélisé	10639	Données de terrain
$N_{humain}$	Nombre d'humains dans le village modélisé	3420	Données de terrain
$N_b$	Nombre de bovins dans le village modélisé	107	Données de terrain
$N_{chien}$	Nombre de chiens dans le village modélisé	1044	Données de terrain

Indices:  $p$ =porcs,  $t$ =truies,  $c$ =canards,  $pl$ =poulets,  $b$ =bovins,  $h$ =hôte,  $hc$ =hôtes compétents,  $hnc$ =hôtes non compétents.

\* a=année ; m=mois ; j=jour ; \*\*Le porc est la référence.

### 2.3.2. Paramètres estimés

Nous avons estimé trois des paramètres du modèle en utilisant les données de séroprévalence collectées dans la même zone chez les porcs, les volailles et les chiens, décrites ci-dessus (Tableau 11) : le nombre de vecteurs impliqués dans la transmission du VEJ dans le village modélisé ( $N_v$ ), et les préférences trophiques des *Culex spp.* pour les canards ( $\pi_c$ ) et les chiens ( $\pi_{chien}$ ), qui n'étaient pas disponibles dans la littérature.

Le VEJ étant considéré comme endémique dans la zone d'étude, nous avons supposé que les valeurs de séroprévalence observées correspondaient à l'état d'équilibre du système épidémiologique. L'infection a été initialisée au début de chaque simulation par l'introduction de 100 moustiques infectieux, et les simulations ont été effectuées jusqu'à ce que le système ait atteint un état stable. Nous avons testé plusieurs durées de simulation jusqu'à 200 ans et avons fixé la durée de simulation étant celle à partir de laquelle les indicateurs calculés ne variaient plus : 11 000 jours (30 ans). Pour une valeur donnée du triplet ( $N_v$ ,  $\pi_c$ ,  $\pi_{chien}$ ), le modèle a ensuite été utilisé pour prédire les taux de séroprévalence anti-VEJ pour chaque population hôte à l'état d'équilibre épidémiologique. La log-vraisemblance binomiale conjointe des données de séroprévalence observées dans chaque groupe hôte et chaque district conditionnellement aux données prédites a ensuite été minimisée pour obtenir des estimations de  $N_v$ ,  $\pi_c$  et  $\pi_{chien}$ . La

matrice de variance-covariance, obtenue en inversant la matrice Hessienne, a été utilisée pour calculer les intervalles de confiance des paramètres estimés.

Deux modèles différents ont été comparés sur la base du critère d'information d'Akaike (AIC). Le premier modèle a estimé un  $N_v$  unique pour les trois districts. Le second modèle a estimé une valeur de  $N_v$  par district, en partant du principe que les conditions environnementales pouvaient varier légèrement d'un district à l'autre et donc influencer l'abondance des vecteurs.

## 2.4. Exploitation du modèle

### 2.4.1. Variables de sortie

Le nombre de reproduction de base  $R_0$  est le nombre attendu de cas secondaires générés par un cas primaire introduit dans une population entièrement sensible (291). Le  $R_0$  a été calculé comme la valeur absolue maximale des valeurs propres de la « Next generation matrix » (310). Les détails de son calcul sont fournis en Annexe 4.

A l'équilibre épidémiologique, le modèle a permis de calculer la probabilité annuelle d'exposition humaine, qui est la probabilité de recevoir au moins une piqûre infectante sur 1 an:

$$\text{Probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ} = 1 - \exp(-foi_{humain}365) \quad (4)$$

À l'équilibre épidémiologique, la force d'infection exercée sur les humains ( $foi_{humain}$ ) est constante et correspond au risque instantané d'être infecté. En supposant que les personnes vivant dans le village modélisé sont également exposées au VEJ depuis leur naissance,  $1/foi_{humain}365$  correspond à l'âge moyen de l'infection, en années. Cet indicateur a été calculé uniquement dans les situations où le  $R_0$  était supérieur à 1.

Le taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ représente la proportion de personnes infectées en un an, à l'équilibre épidémiologique :

$$\text{Taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ} = \frac{foi_{humain}S_{humain}365}{N_{humain}} \quad (5)$$

Afin de faciliter l'interprétation de ce dernier paramètre, nous avons également calculé la proportion d'hommes sensibles dans la population à l'équilibre épidémiologique.

Enfin, nous avons utilisé le modèle pour prédire la séroprévalence chez les chiens, c'est à dire la proportion de chiens immunisés par rapport au nombre total de chiens, calculée à l'état d'équilibre.

Les intervalles de confiance des indicateurs ont été calculés en tirant au sort 1000 valeurs conjointes des paramètres dans leur aire de confiance gaussienne multidimensionnelle (afin de prendre en compte la covariance entre les valeurs estimées des paramètres). Le modèle a ensuite été exécuté en utilisant ces 1000 valeurs pour calculer les variables de sortie. Les limites inférieures et supérieures des intervalles de confiance des variables de sortie correspondent aux quantiles à 2,5% et 97,5%. Le modèle a été codé sous R (version 4.0.2) (285).

#### 2.4.2. Composition du système et variations de l'abondance relative des hôtes

Afin de rendre les scénarios étudiés comparables, nous avons utilisé une taille de population vectorielle constante. Comme la taille de la population de vecteurs dépend de la surface corporelle (BSA) totale des hôtes disponibles pour les piqûres de moustiques (311), la BSA totale des hôtes a été maintenue constante au niveau du village dans tous les scénarios. Nous avons ensuite fait varier l'abondance de chaque espèce hôte en modifiant leurs proportions relatives dans la BSA totale. Pour chaque espèce hôte, la BSA d'un individu typique a été calculée à l'aide de formules allométriques développées pour plusieurs espèces et est présentée dans le tableau 13 (312–314).

*Tableau 13 : Surface corporelle (BSA) calculée pour chaque espèce hôte du modèle*

<b>Espèce</b>	<b>BSA calculée (m<sup>2</sup>)</b>
Porc (porc d'engraissement)	1,53
Porc (truie)	3,47
Canard	0,15
Poulet	0,13
Humain	1,81
Bovin	4,29
Chien	0,61

Les proportions de BSA des hôtes ont été modifiées selon trois groupes de scénarios :

- (i) Nous avons d'abord fait varier la proportion de BSA des hôtes non compétents par rapport aux hôtes compétents, de 5% à 95% par pas de 5%. Dans les deux groupes d'hôtes (compétents vs. non compétents), la répartition des BSA entre les espèces est restée constante et le modèle a été exécuté pour les 19 combinaisons résultantes.

Nous n'avons pas exploré les situations avec 0 ou 100% de chaque groupe d'hôtes, car elles ne semblaient pas réalistes.

- (ii) Pour préciser l'importance relative de chaque hôte compétent dans la transmission du VEJ, nous avons ensuite fait varier les proportions respectives de BSA de porcs, de canards et de poulets parmi les hôtes compétents (porcs, canards et poulets). La proportion de BSA de porcs parmi les hôtes compétents variait de 0 à 100% par pas de 10%, et la proportion de BSA de poulets parmi les volailles variait de 5 à 95% par pas de 10% (110 combinaisons).
- (iii) Les bovins sont des hôtes non compétents (301) mais attirent les *Culex spp.* (288,290). Par conséquent, leur abondance relative dans le système peut affecter l'intensité de la transmission. L'effet de la proportion de bovins dans le système a été étudié en modifiant les proportions relatives des BSA des bovins et des porcs. Nous nous sommes concentrés sur ces hôtes car ce sont ceux qui ont la plus grande valeur économique. La proportion de bovins dans le total des BSA bovins et porcins variait de 0 à 100% par pas de 5% (21 combinaisons).

#### 2.4.3. Relation entre l'exposition des hommes et des chiens

La proportion de chaque espèce hôte dans le système multi-hôtes (y compris le ratio homme/chien), la taille de la population de vecteurs ( $N_v$ ) et la durée de vie des chiens (liée au taux de mortalité  $\mu_{chien}$ ) sont des paramètres qui influencent à la fois la séroprévalence des chiens et la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ. Pour analyser la relation entre la séroprévalence anti-VEJ chez les chiens et la probabilité annuelle d'exposition humaine, nous avons effectué 10 000 simulations pour lesquelles ces paramètres variaient de façon aléatoire, et  $R_0$  était  $> 1$ . Nous avons tiré au sort la proportion de BSA attribuée à chaque espèce hôte entre 0,01 et 0,99. La taille de la population de vecteurs a été tirée au sort entre 1000 et 200 000 vecteurs. La durée de vie des chiens a été tirée au sort entre 2 et 11 ans, sachant que leur durée de vie moyenne observée dans la zone d'étude est de 5 ans (115).

Nous avons ensuite tracé la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ en fonction de la séroprévalence anti-VEJ chez les chiens et analysé visuellement la relation entre ces deux indicateurs.

#### 2.4.4. Analyse de sensibilité et qualité de l'ajustement du modèle

Nous avons effectué une analyse de sensibilité de  $R_0$  aux valeurs des paramètres, en utilisant la méthode de Morris (315). Il s'agit d'une méthode exploratoire permettant de trier les paramètres du modèle en fonction de leur influence sur les sorties du modèle. Les effets des paramètres du modèle peuvent être (i) négligeables, (ii) linéaires ou (iii) non linéaires ou impliqués dans des interactions avec d'autres paramètres. La méthode Morris d'analyse de sensibilité globale est un plan "one at a time" où un seul paramètre est modifié à chaque simulation. Les 51 paramètres ont été discrétisés en 6 niveaux (+/- 25% de la valeur initiale). Le plan d'expérience a consisté en un tirage aléatoire de 100 points sur une grille régulière de dimension 51 et de 6 niveaux. Il a permis de créer 100 trajectoires de 51+1 points en augmentant ou diminuant chaque composante du vecteur de paramètres d'un niveau à tour de rôle. L'indice de sensibilité  $\mu_i^*$  est la moyenne des valeurs absolues des effets élémentaires  $i$ , c'est-à-dire des variations de  $R_0$  associées au facteur d'entrée  $i$ , et mesure l'influence globale du facteur d'entrée  $i$  sur  $R_0$ ;  $\sigma_i$  est l'écart-type des effets élémentaires  $i$  et mesure les interactions et les effets non linéaires. L'analyse de sensibilité a été réalisée à l'aide de R (version 4.0.2) avec le package "sensitivity" (285).

### 3. Résultats

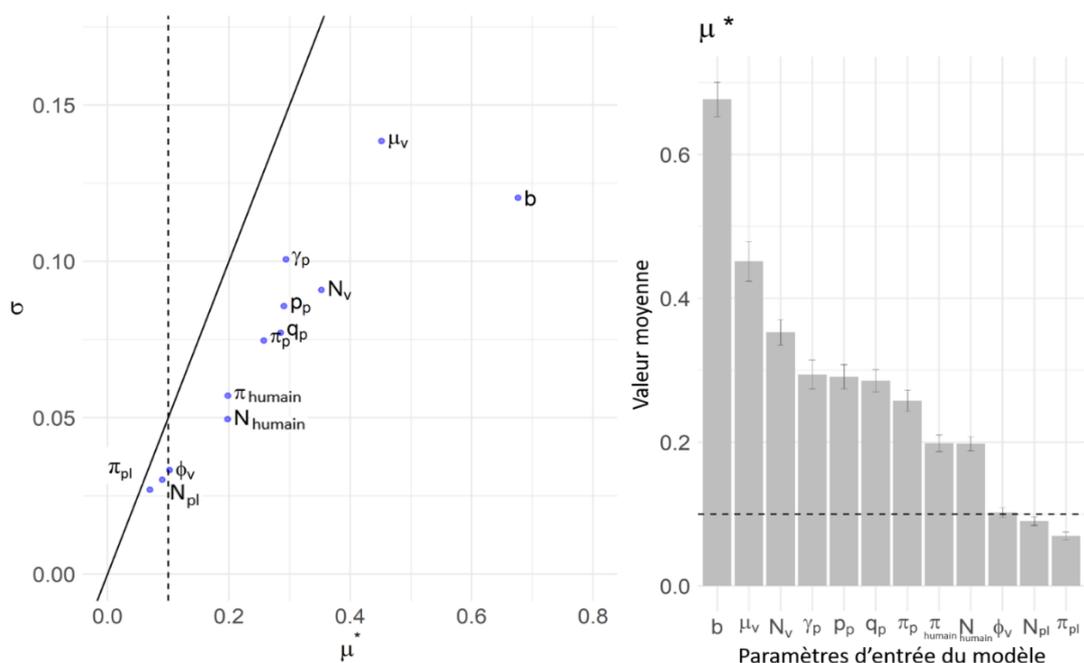
#### 3.1. Estimation des paramètres, ajustement du modèle et analyse de sensibilité

Le modèle présentant l'AIC le plus faible (459,4) était celui estimant les valeurs de  $N_v$  spécifiques au district (l'AIC du modèle alternatif étant de 467,9). En utilisant comme référence une valeur de 1 pour le porc, le paramètre estimé de préférence trophique relative de *Culex spp.* était de 0,43 [0,23-0,81]<sub>IC95%</sub> pour les canards et de 0,12 [0,08-0,20]<sub>IC95%</sub> pour les chiens, les valeurs fixées d'après la littérature étant de 0,09 [0,06-0,1]<sub>IC95%</sub> pour les poulets, 1,7 [1,1-2,4]<sub>IC95%</sub> pour les bovins et 0,5 [0,4-0,38]<sub>IC95%</sub> pour les humains (Tableau 12). La valeur estimée de  $N_v$  était de 17 853 [12 536-25 375]<sub>IC95%</sub> pour le district 1, 52 468 [44 334-62 093]<sub>IC95%</sub> pour le district 2 et 59 715 [50 389-70 767]<sub>IC95%</sub> pour le district 3.

Pour évaluer l'ajustement du modèle, nous avons calculé la séroprévalence prédite par espèce et par district. Cet ajustement du modèle était satisfaisant car tous les taux de séroprévalence observés se situaient dans l'intervalle de confiance à 95% (IC 95%) des taux de

séroprévalence prédits, à l'exception des porcs du district 1, des canards du district 2 et des poulets du district 3 pour lesquels la séroprévalence observée était nulle (Tableau 11), le nombre d'animaux testés étant cependant faible.

L'analyse de sensibilité a montré que parmi les 51 paramètres du modèle, 9 avaient une influence significative sur le  $R_0$ , avec l'indice de sensibilité  $\mu^*$  supérieur à 0,1. Il s'agissait principalement de paramètres liés aux vecteurs et aux porcs. Le taux de piqûre  $b$  était le paramètre le plus influent, car il est un facteur multiplicatif de la force d'infection pour les vecteurs et pour les hôtes. De même, les paramètres suivants les plus influents, la durée de vie moyenne des vecteurs  $\mu_v$  et la taille de la population vectorielle  $N_v$ , conditionnent fortement la force d'infection des hôtes car ils sont directement liés à la quantité de vecteurs infectés  $I_v$ . Le taux de virémie des porcs,  $\gamma_p$ , était également un paramètre influent car plus les porcs sont virémiques longtemps, plus le risque cumulé d'infection des vecteurs est élevé. La probabilité de transmission d'un porc à un vecteur  $q_p$ , d'un vecteur à un porc  $p_p$  et le paramètre de préférence trophique relative de *Culex spp.* pour les porcs  $\pi_p$  conditionnent également le taux d'infection des vecteurs. Pour ces 9 paramètres, la valeur de l'indice des interactions et des effets non-linéaires  $\sigma$  était faible, ils avaient donc des effets linéaires sur la valeur de  $R_0$ . Les valeurs de  $\sigma$  et  $\mu^*$  étaient très faibles ( $<0,05$ ) pour les 42 paramètres restants, ce qui signifie qu'ils avaient des effets négligeables sur le  $R_0$  (Figure 10).



**Figure 10 :** Graphique de Morris (gauche) et valeurs de  $\mu^*$  (droite) des 9 paramètres les plus influents sur le  $R_0$ . Les autres paramètres avaient un effet négligeable sur le  $R_0$  ( $\mu^* < 0,05$ ,  $\sigma < 0,05$ ). La ligne de pente de 0,5 sur le graphique de Morris représente la limite entre les paramètres dont les effets sont non linéaires ou comprennent une interaction avec d'autres facteurs, et les paramètres ayant un effet linéaire. La ligne pointillée représente  $\mu^* = 0,1$  (Voir le tableau 12 pour la définition des paramètres).

### 3.2. Indicateurs de transmission et d'exposition dans les conditions de terrain

La moyenne des trois  $N_v$  estimés par district, pondérée par le nombre de villages étudiés dans chaque district (2 pour les districts 1 et 2 et 5 pour le district 3), était de 48 798 [40 632-58 752]<sub>IC95%</sub>. Nous avons utilisé cette valeur dans le reste de l'analyse.

Les indicateurs de sortie ont été calculés pour la situation observée. Le  $R_0$  prédit était de 1,32 [1,25-1,43]<sub>IC95%</sub>. Le modèle prédisait par ailleurs une probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ de 0,41 [0,30-0,53]<sub>IC95%</sub>, et un taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ de 0,0138 [0,0137-0,0139]<sub>IC95%</sub>, ce qui correspond à 47,3 [46,7-47,7]<sub>IC95%</sub> infections humaines par an dans un village. L'âge moyen prédit au moment de l'infection était de 2,33 ans [1,74-3,26]<sub>IC95%</sub> (Tableau 4).

*Tableau 14 : Indicateurs calculés et intervalles de confiance à 95% pour la situation observée, i.e. dans les conditions de terrain*

	Valeur calculée	IC 95%
<b><math>R_0</math></b>	1,32	[1,25-1,43]
<b>Probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ</b>	0,41	[0,30-0,53]
<b>Taux d'incidence annuelle des infections humaines par le VEJ</b>	0,0138	[0,0137-0,0139]
<b>Incidence annuelle des infections humaines par le VEJ</b>	47,3	[46,7-47,7]
<b>Prévision de la séroprévalence du VEJ chez les chiens</b>	0,40	[0,33-0,47]
<b>Âge moyen de l'infection chez l'homme (années)</b>	2,33	[1,74-3,26]

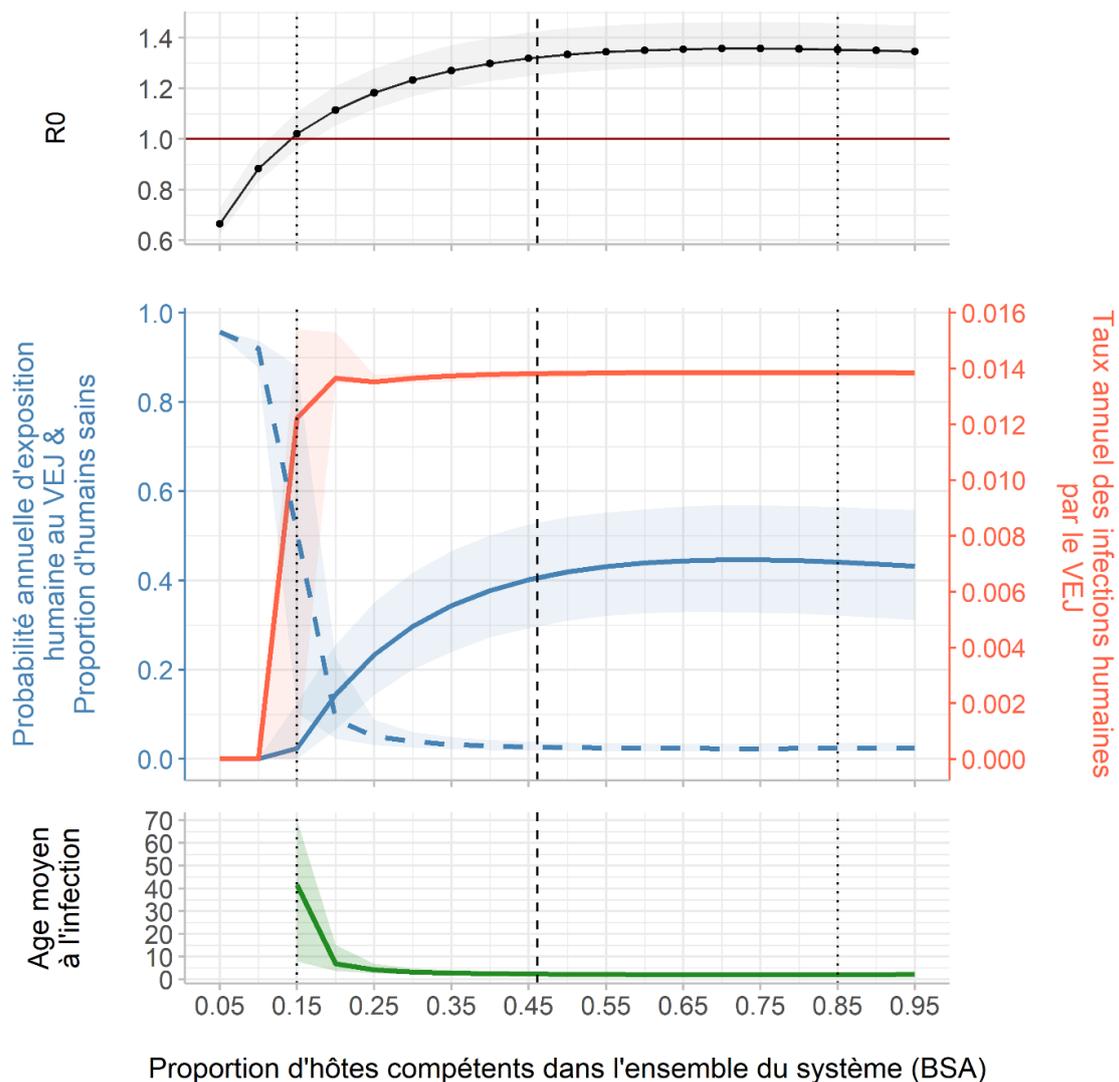
### 3.3. Impact des proportions relatives de BSA d'hôtes compétents et non compétents sur les indicateurs de transmission et d'exposition

Dans les conditions observées, les hôtes compétents représentaient 46,1% de la BSA totale du village (ligne pointillée, Figure 11). La figure 11 montre que le  $R_0$  devenait supérieur à 1 lorsque la proportion de BSA d'hôtes compétents atteignait 15%. Le  $R_0$  augmentait ensuite avec la proportion d'hôtes compétents et se stabilisait à environ 1,35.

Lorsque le  $R_0$  était  $> 1$ , la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ à l'équilibre variait de 0,024 à 0,45 et le taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ variait de 0,012 à 0,014.

Nous avons analysé deux scénarios contrastés, mis en évidence par des lignes pointillées sur la figure 11 : le scénario A représentant un village avec 15% de BSA d'hôtes compétents, et le scénario B un village avec 85% de BSA d'hôtes compétents. Dans le scénario A, un individu avait une probabilité annuelle d'exposition au VEJ de 0,02, avec un taux d'incidence annuel d'infections humaines prédit de 0,0122, correspondant à 72,4 infections parmi 5939 personnes. Dans le scénario B, le taux d'incidence annuel des infections humaines était similaire, avec une prédiction de 0,0139, bien que le nombre prédit d'infections ait été inférieur (13 infections) en raison de la taille plus faible de la population (952 personnes). Inversement, la probabilité annuelle d'exposition était beaucoup plus élevée dans le scénario B que dans le scénario A, à savoir 0,44.

Il est intéressant de noter que le taux d'incidence annuel des infections humaines était assez stable bien que la probabilité d'exposition augmentait avec la proportion d'hôtes compétents dans le système. En supposant une exposition homogène des humains au VEJ de tous les groupes d'âge, l'âge moyen prédit au moment de l'infection était de 40 ans dans le scénario A où la probabilité d'exposition était faible. Dans le scénario B, où la probabilité d'exposition était élevée, l'âge moyen prédit au moment de l'infection était de 2 ans. Dans le scénario A, l'incidence annuelle des infections était donc répartie entre tous les groupes d'âge, tandis que dans le scénario B, les infections étaient concentrées sur les groupes d'âge les plus jeunes.



**Figure 11** :  $R_0$ , probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ (ligne bleue continue), proportion d'humains sensibles (ligne bleue en pointillés), taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ (ligne rouge) et âge moyen à l'infection, à l'équilibre épidémiologique, en fonction de la proportion d'hôtes compétents dans l'ensemble du système (BSA). Les tirets verticaux correspondent à la situation observée. Les deux lignes pointillées verticales correspondent aux scénarios A (à gauche) et B (à droite).

### 3.4. Impact des proportions relatives de BSA de porcs, de canards et de poulets parmi les hôtes compétents sur les indicateurs de transmission et d'exposition

Dans les conditions de terrain, la BSA des porcs représentait 35% de la BSA de l'ensemble du village et 76% de la BSA des hôtes compétents. La BSA des poulets représentait 91% de la BSA des volailles (poulets et canards). Nous avons fixé la proportion de poulets

parmi les BSA des volailles à 5% (scénario A), 55% (scénario B) et 95% (scénario C) et fait varier la proportion de porcs parmi la BSA des hôtes compétents (porcs, poulets et canards) (Figure 12).

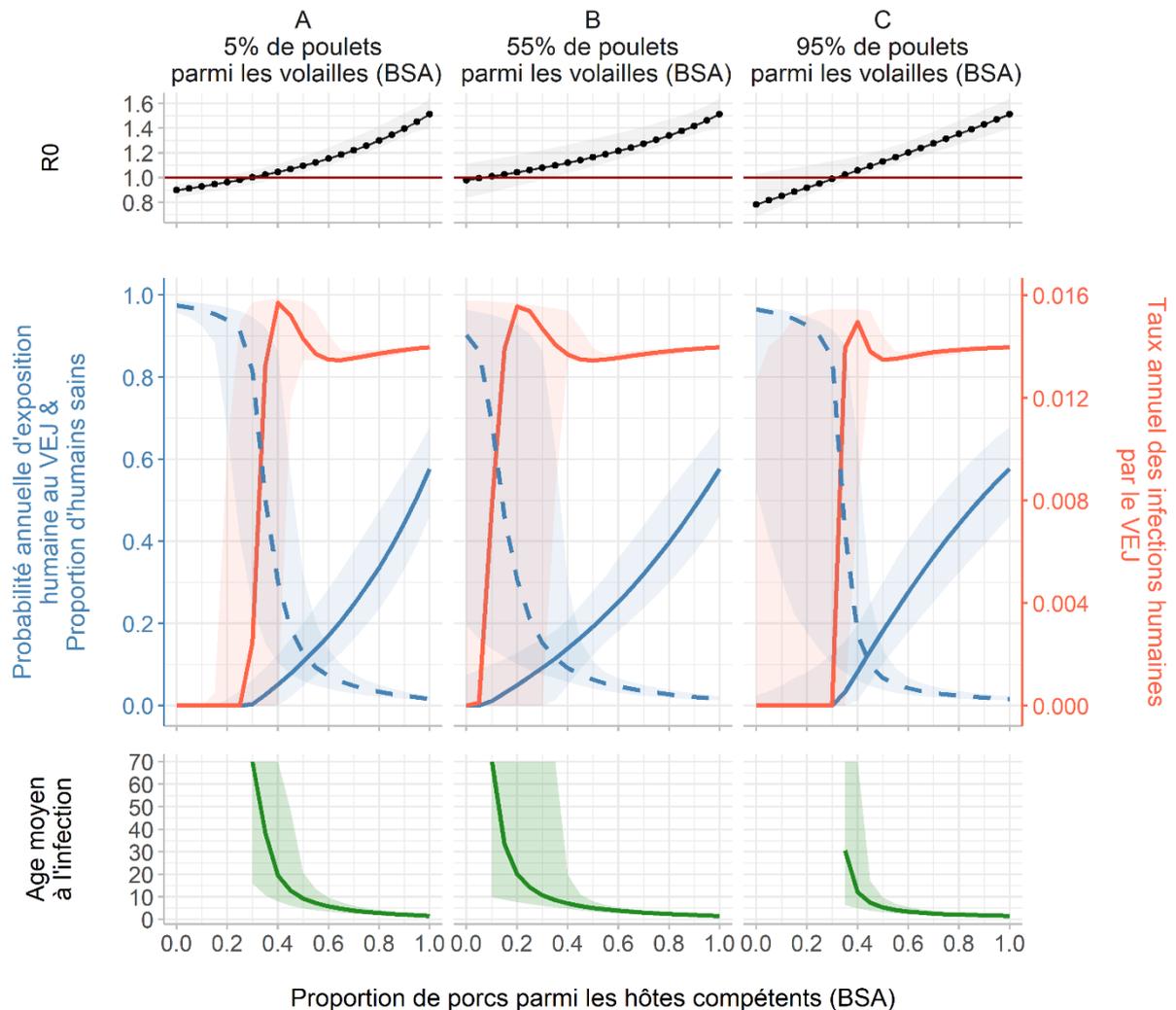
Le  $R_0$  était principalement influencé par la proportion de BSA des porcs, car il augmentait de manière presque linéaire, quelle que soit la proportion de poulets dans la BSA des volailles. Dans le scénario A, le  $R_0$  était  $> 1$  lorsqu'il y avait plus de 30% de porcs dans la BSA des hôtes compétents. Dans le scénario B, le  $R_0$  était  $> 1$  avec seulement 10% de porcs dans la BSA des hôtes compétents. Dans un premier temps, le  $R_0$  augmentait légèrement avec la proportion de poulets dans la BSA des volailles car leur durée de vie (6 mois) est plus courte que celle des canards (2 ans), ce qui assure un renouvellement plus rapide des animaux sensibles dans le système. Cependant, dans le scénario C, le système avait besoin de plus de BSA de porcs pour que le  $R_0$  soit  $> 1$  (au moins 35% parmi la BSA des hôtes compétents). Cela est dû à la préférence trophique des moustiques pour les poulets, qui est la plus faible parmi les six espèces étudiées ( $\pi_{pl} = 0,09$ ). Selon le modèle, lorsqu'il n'y avait presque que des poulets parmi les hôtes compétents, les vecteurs piquaient préférentiellement les hôtes non compétents, ce qui entraînait une diminution de l'intensité de la transmission.

Avec 55% de poulets dans la BSA de la volaille (scénario B), et aucun porc, le  $R_0$  était proche de 1 et son intervalle de confiance à 95% englobait 1. Une analyse supplémentaire a montré que l'intervalle de confiance à 95% du  $R_0$  englobait 1 à partir de 25% de poulets dans la BSA des volailles (Annexe 5).

Lorsque le  $R_0$  était  $> 1$ , la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ à l'équilibre variait de 0,004 à 0,58 et le taux d'incidence annuel des infections humaines au VEJ variait de 0,003 à 0,015. Dans le scénario B, 20% de porcs dans la BSA des hôtes compétents conduisaient à une probabilité annuelle d'exposition prédite de 0,05 et à un taux d'incidence annuel prédit de 0,0155 (correspondant à 53,2 infections par an et par village). Dans le même scénario, mais avec 80 % de porcs dans la BSA des hôtes compétents, la probabilité annuelle d'exposition atteignait 0,40, et le taux d'incidence annuel était similaire : 0,0138 (correspondant à 47,2 infections par an et par village).

Là encore, le taux d'incidence annuel des infections variait légèrement alors que la probabilité annuelle d'exposition augmentait avec la proportion de porcs dans la BSA des hôtes compétents. À mesure que cette dernière augmentait, l'âge moyen au moment de l'infection diminuait et les infections étaient plus probablement concentrées dans les groupes d'âge plus

jeunes. Dans le scénario B, l'âge moyen au moment de l'infection était de plus de 70 ans (les ordonnées des graphiques ont été tronquées à cette valeur), de plus de 20 ans et de moins de 5 ans avec respectivement 10 %, 20 % et plus de 50 % de porcs dans la BSA des hôtes compétents.

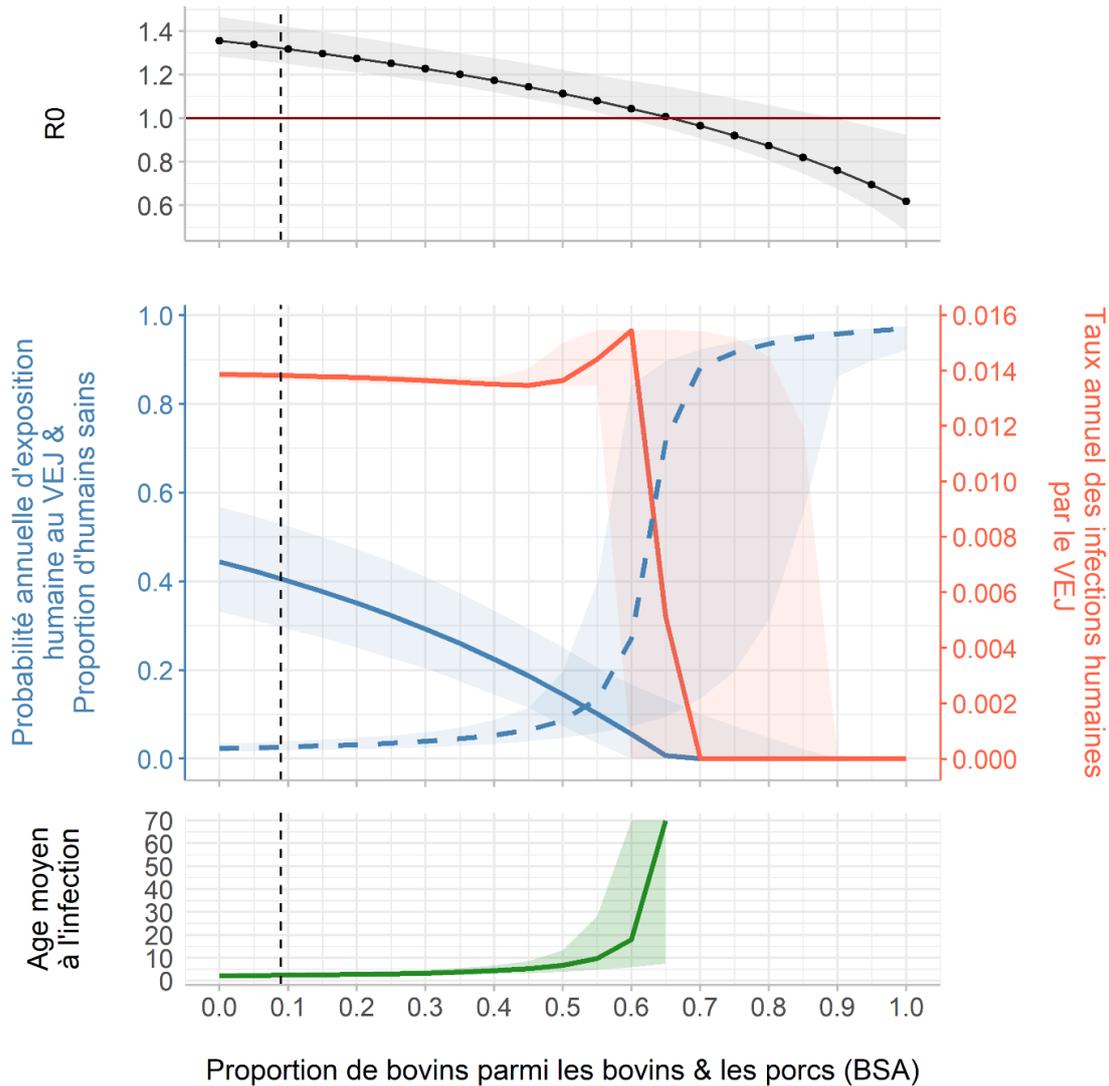


**Figure 12 :**  $R_0$ , probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ (ligne bleue continue), proportion d'humains sensibles (ligne bleue pointillée), taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ (ligne rouge), et âge moyen à l'infection, à l'équilibre épidémiologique, en fonction de la proportion de porcs parmi les hôtes compétents (BSA), pour trois proportions fixes de poulets parmi les volailles (BSA).

### 3.5. Impact des proportions relatives de BSA des bovins et des porcs sur les indicateurs de transmission et d'exposition

Dans la situation observée, la BSA des bovins représentait 8,9% de la BSA totale des bovins et des porcs. La figure 13 montre que selon le modèle, à partir de 65% des bovins parmi la BSA totale des bovins et des porcs, le  $R_0$  était inférieur à 1.

Il est intéressant de noter que le taux d'incidence annuel était maximal lorsqu'il y avait 60% de bovins dans la BSA des bovins et des porcs (ce qui correspond à 23% de bovins et 15% de porcs dans la BSA de l'ensemble du système), avec un taux de 0,015, correspondant à 51,3 infections par an dans le village (3420 personnes). Pour cette composition du système, la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ était de 0,06 et l'âge moyen au moment de l'infection était d'environ 18 ans.



**Figure 13 :**  $R_0$ , probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ (ligne bleue continue), proportion d'humains sensibles (ligne bleue en pointillés), taux d'incidence annuel des infections humaines par le VEJ (ligne rouge) et âge moyen à l'infection, à l'équilibre épidémiologique, en fonction de la proportion de bovins parmi les bovins et les porcs (BSA). Les tirets verticaux correspondent à la situation observée.

### 3.6. Relation entre la séroprévalence anti-VEJ canine et la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ

La figure 14 représente la probabilité prédite d'exposition annuelle de l'homme en fonction de la séroprévalence anti-VEJ prédite chez le chien, pour 10 000 simulations dans lesquelles les proportions relatives des espèces hôtes, la durée de vie moyenne des chiens et la taille de la population de vecteurs variaient aléatoirement, et pour lesquelles le  $R_0$  était  $>1$ . La relation entre les deux variables est apparue globalement linéaire, la pente des courbes n'étant influencée que par la durée de vie moyenne des chiens (Annexe 6). Il est intéressant de noter que, pour la durée de vie moyenne des chiens observée sur le terrain (5 ans), la pente de la courbe était proche de 1, la valeur de la probabilité annuelle d'exposition de l'homme à des piqûres infectantes étant alors approximativement égale à celle de la séroprévalence chez le chien. Ce résultat suggère que, dans notre contexte, la séroprévalence anti-VEJ canine serait un bon proxy de la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ.

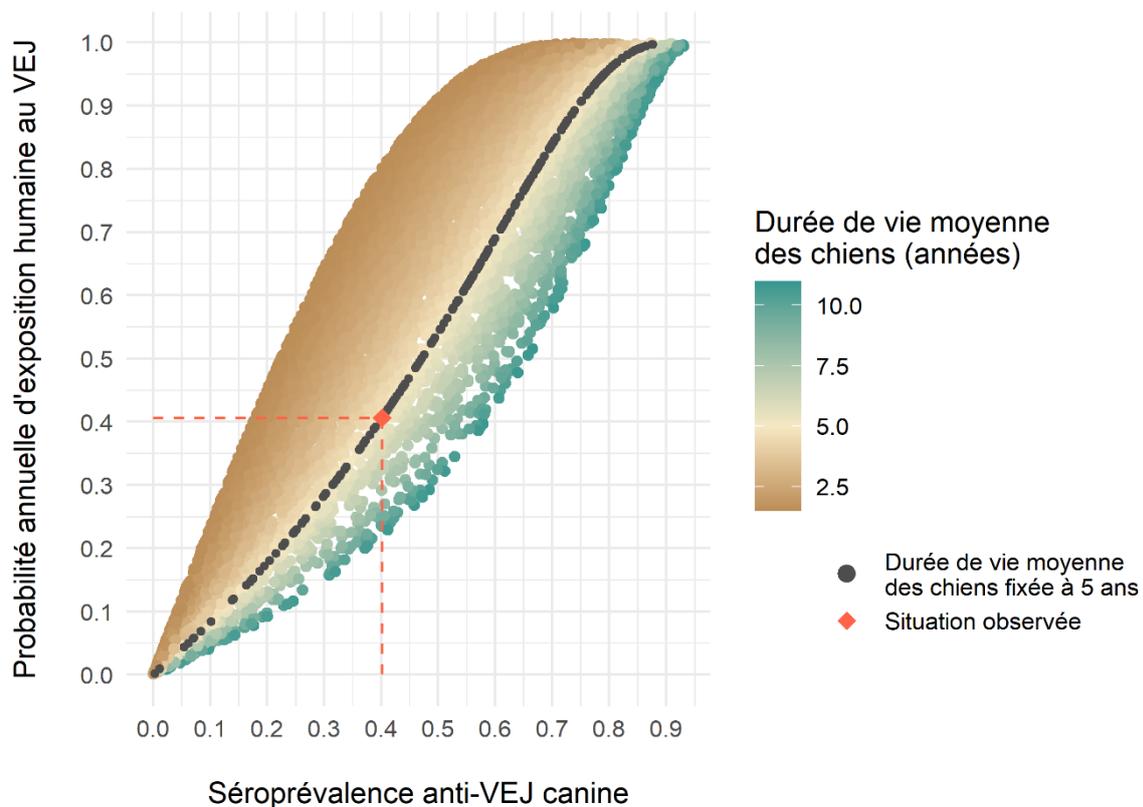


Figure 14 : Probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ en fonction de la séroprévalence anti-VEJ canine.

## 4. Discussion

Nous avons défini un modèle dynamique à compartiments de transmission du VEJ dans un système multi-hôtes représentant un village rural cambodgien, afin de proposer une quantification du niveau d'exposition des hommes au VEJ et d'analyser comment les variations de l'abondance relative des espèces hôtes affectaient cette exposition humaine et la valeur du  $R_0$ . Un objectif secondaire était d'évaluer si la séroprévalence anti-VEJ des chiens pouvait être un bon indicateur de l'exposition humaine au VEJ.

Dans les conditions observées, le modèle prédit un  $R_0$  de 1,32 [1,25-1,43]<sub>IC95%</sub>. L'impact sur la santé humaine a été caractérisé par une probabilité annuelle prédite d'exposition humaine de 0,41 [0,30-0,53]<sub>IC95%</sub> et un taux d'incidence annuel des infections humaines de 0,0138 [0,0137-0,0139]<sub>IC95%</sub> correspondant à 47,3 infections par an dans le village modélisé [46,7-47,7]<sub>IC95%</sub>. L'âge moyen prédit au moment de l'infection était faible (2,33 ans, [1,74-3,26]<sub>IC95%</sub>).

Les données disponibles sur l'incidence clinique du VEJ sont rares et proviennent principalement d'études hospitalières des cas de syndromes d'encéphalite aiguë (103–105,316–318). L'incidence clinique du VEJ au niveau populationnel est donc probablement sous-estimée. Dans ces conditions et puisque le VEJ est endémique au Cambodge, Tarantola *et al.* (2014) ont estimé que 1/250 à 1/500 des infections donnent lieu à des cas symptomatiques (319). Sur la base de ces ratios et de l'incidence annuelle des infections humaines par le VEJ prédite par notre modèle (47,3 infections par an dans un village de 3420 personnes), on peut s'attendre à un nombre de cas cliniques par an et par village situé entre 0,1 (si le taux est de 1/500) et 0,2 (si le taux est de 1/250). Bien qu'il ne s'agisse que d'une estimation approximative, cela correspondrait à une incidence clinique de 2,9 à 5,9/100 000 cas de VEJ par an. À titre de comparaison, Mao *et al.* (2020), et Tian *et al.* (2015), ont estimé l'incidence annuelle moyenne des cas de VEJ dans les provinces du Yunnan et de Changsha, en Chine, à 0,16/100 000 (en 2017, après 10 ans de programme de vaccination) et 0,15/100 000 respectivement, en recueillant des données hospitalières pendant 6 à 10 ans (320,321). Après 19 ans de suivi, Montini *et al.* (2020) ont estimé une incidence de 0,16/100 000 cas par an en Malaisie (322). Au Bhoutan, 0,3/100 000 et 0,8/100 000 cas par an ont été estimés en 2020 pour les adultes et les enfants respectivement, sur la base des données de 5 hôpitaux sentinelles (323). Enfin, Campbell *et al.* (2011) ont extrapolé les données hospitalières de 12 pays d'Asie du Sud-Est et ont estimé une incidence mondiale de 1,8/100 000 et 5,4/100 000 cas par an pour les adultes et les enfants

respectivement, dans l'ensemble des 24 pays où le VEJ circule (25). Cependant, ces valeurs sous-estiment très probablement l'incidence de la maladie, car elles sont basées sur les cas signalés par les hôpitaux, et parfois dans des zones où les structures d'accès aux soins et les capacités d'identification des cas cliniques sont limitées.

L'âge moyen prédit à l'infection dans notre village modélisé était très bas (2,3 ans). Les jeunes enfants sont plus susceptibles de développer des formes sévères après une infection par le VEJ, ainsi que des séquelles graves (27,104,320,322,323). La proportion de cas sévères survenant dans la province de Kandal reste inconnue. Cependant, nos résultats et les connaissances actuelles sur la circulation du VEJ dans le pays justifieraient d'intensifier la vaccination des jeunes enfants.

Notre modèle ne structure pas la population humaine par groupes d'âge et suppose qu'un enfant est aussi exposé à l'infection qu'un adulte. Dans les conditions réelles, les enfants seraient probablement moins exposés au VEJ que les adultes parce que leur BSA est plus faible et parce qu'ils pourraient être protégés des piqûres de moustiques, par des moustiquaires par exemple, dans leurs premiers mois de vie. Nos prédictions peuvent donc légèrement surestimer l'exposition des enfants aux infections par le VEJ, en sous-estimant l'âge moyen à l'infection.

Le modèle prédit différents schémas d'impact du VEJ sur la santé humaine (représentés par différents âges moyens à l'infection) selon l'abondance relative des 6 espèces d'hôtes : bien que le taux d'incidence des infections humaines soit resté à peu près constant dans les différentes compositions de systèmes multi-hôtes où le  $R_0$  était supérieur à 1, l'âge moyen à l'infection variait beaucoup. D'une part, dans les situations intermédiaires avec par exemple 15% à 17% d'hôtes compétents dans la BSA de l'ensemble du village (Figure 11) et 10% à 20% de porcs dans la BSA des hôtes compétents (Figure 12, scénario B), le taux d'incidence annuel était élevé (0,014-0,016), mais la probabilité annuelle d'exposition était faible ( $<0,1$ ), et l'âge moyen à l'infection était élevé ( $>20$  ans). Cela pourrait correspondre à la situation prévalant dans les zones péri-urbaines. D'autre part, à partir d'environ 25% d'hôtes compétents dans la BSA de l'ensemble du village et 50% de porcs dans la BSA des hôtes compétents, le taux d'incidence annuel était également élevé, mais la probabilité annuelle d'exposition était élevée ( $>0,2$ ), et l'âge moyen au moment de l'infection était très bas ( $<2$  ans). Cela pourrait correspondre à la situation épidémiologique des zones rurales. Dans les zones péri-urbaines, les infections pourraient donc être réparties dans toutes les classes d'âge (notamment les adultes), alors que dans les zones rurales, les infections pourraient être concentrées dans les groupes d'âge plus jeunes, ce qui entraînerait un nombre plus élevé de cas graves. Le village rural étudié appartenait

à cette dernière catégorie où l'âge moyen prédit de l'infection était très bas alors que le taux d'incidence était élevé.

Les résultats des simulations ont confirmé le rôle majeur joué par les porcs dans la circulation du VEJ. Les valeurs prédites du  $R_0$  (Figure 12) étaient en effet principalement influencées par la proportion de BSA des porcs dans la BSA totale des hôtes compétents. Cependant, il est apparu que dans un système sans porcs, la limite supérieure de l'intervalle de confiance du  $R_0$  restait  $> 1$  lorsqu'il y avait plus de 25 % de poulets dans la BSA des volailles. Ceci suggère que, dans un système sans porcs, les poulets et les canards pourraient agir comme réservoir secondaire et assurer la transmission endémique du VEJ. Dans le système d'élevage de la province de Kandal, les canards sont moins nombreux et vivent plus vieux que les porcs et les poulets (2 ans contre 6 mois en moyenne). Bien que la préférence trophique relative (*i.e.* par référence au porc) de *Culex spp.* pour les canards ( $\pi_c = 0,43$ ) soit plus élevée que pour les poulets ( $\pi_{pt} = 0,09$ ), de nombreux canards du système sont déjà immunisés. Les poulets, plus nombreux et abattus plus jeunes, pourraient donc jouer un rôle plus important que les canards dans la circulation du VEJ, en raison du renouvellement plus rapide de leur population. A l'inverse, lorsque les poulets représentaient la quasi-totalité du BSA des hôtes compétents, leur faible attractivité pour les *Culex spp.* a conduit à une légère diminution de l'intensité de la transmission, les vecteurs se nourrissant préférentiellement d'hôtes non compétents.

Comme Lord *et al.* (2015) et Bae *et al.* (2018) l'ont déjà souligné, l'épidémiologie du VEJ doit être repensée, car la circulation du VEJ pourrait être maintenue, ou non, au sein de systèmes épidémiologiques complexes et variables selon la région (76,82). Dans la province de Kandal, la circulation endémique du VEJ semble être maintenue par un système multi-hôtes complexe où les porcs domestiques sont essentiels à la persistance mais où des populations d'autres espèces telles que la volaille, les chiens, les bovins et les humains influencent également la transmission du VEJ.

Les systèmes épidémiologiques sont toutefois voués à évoluer, et cela pour des raisons politiques, économiques, culturelles ou sanitaires. L'élevage traditionnel de porcs était répandu au Cambodge jusqu'au début des années 1950. La période des Khmers rouges a constitué une rupture dans l'histoire du pays, et l'élevage porcin n'a repris qu'à partir des années 1980 (110,111). Depuis, l'élevage porcin traditionnel est confronté à des crises sanitaires telles que la peste porcine classique et, récemment, la peste porcine africaine (PPA) (324), qui pourraient réduire drastiquement la densité de porcs. De plus, l'industrialisation du secteur et la concurrence des productions intensives, notamment thaïlandaises, font baisser le prix de la

viande et découragent progressivement les petits éleveurs pour lesquels l'élevage traditionnel de porcs n'est plus rentable (National Animal Health and Production Research Institute, communication personnelle). D'autre part, l'aménagement du paysage, par le drainage ou la réduction des rizières en raison de l'industrialisation, ainsi que le changement climatique et les aléas climatiques pourraient également transformer le système épidémiologique en affectant directement les populations d'hôtes et de vecteurs, et donc le schéma de transmission du VEJ. Les scénarios que nous avons envisagés sont donc susceptibles de se produire et le contexte sanitaire actuel lié à la circulation de la PPA en Asie est un exemple concret de ces changements. En 2019, la production porcine chinoise a chuté de plus de 25 % en raison de l'épidémie actuelle de peste porcine africaine. Au Vietnam, plus de 21 % du cheptel porcine total a été décimé en 2020. En parallèle, la réduction du nombre total de porcs en raison de la PPA a entraîné une croissance rapide d'autres productions animales telles que les bovins (+5% en un an) (325).

La modification de l'abondance relative des bovins parmi la BSA des bovins et porcs dans notre modèle a confirmé que dans les systèmes où la proportion de bovins était plus importante, la transmission du VEJ pourrait être moins intense. Dans le village modélisé, le  $R_0$  passait en effet en dessous de 1 à partir de 65% de bovins parmi la BSA totale des bovins et des porcs. Cet effet de type zooprophyllactique s'explique par le fait que les vaches sont des hôtes non compétents sur lesquels les vecteurs du VEJ se nourrissent (288,290). Cela peut également donner une indication de l'intensité de la transmission du VEJ dans les régions où il circule mais où il y a beaucoup plus de vaches que de porcs, comme en Inde où le ratio porcs/bovins est d'environ 0,6 alors qu'il est d'environ 25 dans notre zone d'étude (246,326), bien que le contexte écologique et probablement épidémiologique soient différents.

Dans notre zone d'étude, il a été démontré que les chiens, qui sont nombreux et vivent à proximité de l'homme, sont largement exposés à l'infection par le VEJ (279). Selon notre modèle, dans une zone endémique où les chiens vivent en moyenne 5 ans, la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ était similaire à la valeur de la séroprévalence anti-VEJ chez les chiens (Figure 14). Les simulations ont indiqué que la relation entre ces deux indicateurs pouvait être généralisable, car elle était approximativement linéaire quelle que soit l'abondance relative des espèces d'hôtes et quelle que soit la taille de la population de vecteurs (Figure 14). Dans le contexte particulier de la province de Kandal, la séroprévalence chez les chiens pourrait donc être un bon indicateur de la probabilité annuelle d'exposition humaine, et un outil pour estimer l'impact du VEJ sur la santé publique. Cependant, des enquêtes

approfondies dans diverses conditions environnementales devraient être menées pour valider l'existence de ce lien.

Quelques modèles de transmission du VEJ ont été publiés et s'intéressaient principalement au système porcs-vecteurs ou porcs-vecteurs-humains. Aucun n'a encore représenté la transmission du VEJ au sein d'un système multi-hôtes réaliste représentant la diversité des hôtes présents. Le modèle que nous avons développé est le premier à représenter la transmission du VEJ au sein d'un système multi-hôtes en étant calibré grâce à des données sérologiques anti-VEJ collectées dans une même zone sur plusieurs de ces hôtes. Trois études antérieures ont proposé des modèles théoriques (non basés sur des données de terrain) à compartiments de transmission du VEJ entre 2 populations (vecteurs et réservoirs) ou 3 populations (vecteurs, réservoirs, hommes), dans lesquels les tailles de populations vectorielles et humaines variaient, et ont recherché des valeurs seuils (en terme de tailles de populations) à partir desquelles la maladie pouvait s'éteindre ou aboutir à un équilibre endémique (par calculs de  $R_0$ ) (327–329). Quatre autres études ont utilisé des données de terrain pour calibrer leurs modèles. Khan *et al.* (2014) ont étudié la dynamique de transmission du VEJ chez les porcs au Bangladesh via un modèle à compartiments calibré cette fois-ci sur des données de séroprévalences porcines. Une seule population était considérée (les porcs), et le modèle permettait de tester l'efficacité de la vaccination des porcs sur l'incidence de leurs infections (calculs de  $R_0$ ) (263). Zhao *et al.* (2018) ont proposé un modèle à compartiments également calibré sur des données terrain (tailles de populations porcines et vectorielles, et incidence des cas cliniques humains), pour investiguer les raisons de la résurgence des cas humains d'EJ à Hong Kong. Le modèle simulait la transmission du VEJ au sein de 3 populations : porcs, vecteurs et humains. Contrairement à notre modèle, celui-ci introduisait la transmission directe porc-porc. Celle-ci, bien que pouvant augmenter la taille de l'épidémie, ne permettait pas la circulation du VEJ sans vecteurs (260). De la même manière, Diallo *et al.* (2018) ont développé un modèle à compartiment de la transmission du VEJ dans les élevages de porcs au Cambodge qui incluait la transmission directe. Ce modèle, simulant la circulation du VEJ entre deux populations : les porcs et les vecteurs, était cette fois-ci calibré sur des données de séroprévalence anti-VEJ porcines (259). Finalement, Zahid *et al.* (2021) ont investigué la dynamique conjointe de l'EJ et de la leptospirose en présence de bovins, ceux-ci étant source d'infection humaine par les leptospires notamment en Inde, grâce à un modèle à compartiments et le calcul de  $R_0$ . L'exploitation de ce modèle, dans lequel les tailles de populations de porcs,

d'hommes et de vecteurs ont été fixées à partir de la littérature, suggérant l'effet protecteur des bovins sur la circulation du VEJ (330).

Certains modèles de transmission d'autres arboviroses incluent l'impact de l'humidité et de la température sur certains paramètres comme le taux de piqûre ou la probabilité de transmission du pathogène d'un vecteur à un hôte (294,331). Les données concernant la relation entre la température et la compétence des *Culex spp.* dans la transmission du VEJ sont rares. Cependant, une étude a montré que le taux de transmission du VEJ était plus important au-dessus de 28°C, et que le taux d'infection était plus faible quand la température descendait sous les 26°C (332). En effet, le cycle de développement des moustiques s'accélère avec la température et la période extrinsèque d'incubation diminue avec la température (321). Lin et al (2017) ont également montré que le nombre de cas humains d'EJ était significativement associé à l'augmentation de la température et de l'humidité à Taiwan (333). La saisonnalité de la circulation du VEJ au Cambodge étant faiblement marquée, avec une circulation intense dans la province de Kandal tout au long de l'année (108), et les températures étant élevées toute l'année, nous avons négligé l'influence de la température sur les paramètres de transmission du VEJ.

En revanche, l'abondance vectorielle, bien qu'importante tout au long de l'année à Kandal, peut varier en fonction de la saison, avec des pics de captures en mai, juillet et décembre (108,109,292). Une perspective de notre étude serait ainsi de tester l'impact de la saisonnalité de l'abondance vectorielle sur les indicateurs de sortie du modèle ( $R_0$  et indicateurs d'exposition humaine au VEJ) en évaluant l'impact d'une variation de par exemple +/-20% de la taille de la population de vecteurs estimées ( $N_v$ ) sur l'ensemble des indicateurs de sorties. Cependant Cappelle *et al.* (2016) ont déjà montré que l'intensité de transmission du VEJ dans un élevage de porcs de la province de Kandal n'était pas significativement différente d'une saison à l'autre, l'une des hypothèses étant que l'abondance vectorielle est telle qu'elle permet une transmission intense toute l'année, malgré une saisonnalité (108).

Notre approche théorique a montré que les variations de la composition du système multi-hôtes identifié au Cambodge peuvent avoir un impact sur l'intensité de la transmission du VEJ, et donc sur l'impact de la maladie chez l'homme, en particulier chez les jeunes enfants. Outre la vaccination des enfants dans les zones d'endémie du VEJ, il est nécessaire d'évaluer correctement l'impact sur la santé humaine et de poursuivre les recherches sur l'utilisation

potentielle des chiens comme indicateurs de risque pour cibler les actions de prévention et réduire l'impact du VEJ sur la santé humaine au Cambodge.

Les nombreux échanges commerciaux et humains dans l'Océan Indien et notamment entre l'Asie du Sud Est et La Réunion font craindre une introduction du VEJ sur l'île (133,134). De plus, les vecteurs potentiels et les hôtes (compétents et non compétents) du VEJ sont présents à La Réunion (139), et pourraient constituer un système multi-hôtes permettant la circulation du virus s'il venait à y être introduit. A partir du modèle développé au Cambodge où l'EJ est endémique, nous avons souhaité investiguer si le contexte réunionnais permettrait une circulation du VEJ en cas d'introduction.



## CHAPITRE 4 : Risque de circulation du virus de l'encéphalite japonaise suite à son introduction à l'île de La Réunion.

### 1. Introduction

L'île de La Réunion (2 500 km<sup>2</sup>, 859 959 habitants en 2020) est un département français d'outre-mer situé dans l'océan Indien, à 700 km à l'Est de Madagascar. Le climat est tropical avec des étés chauds et pluvieux (novembre-avril) et des hivers chauds et secs (mai-octobre). Avec un sommet à 3 074 mètres et un relief accidenté, la température ainsi que les densités de population diminuent progressivement de la côte vers les montagnes centrales.

Douze espèces de moustiques (appartenant à quatre genres : *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* et *Orthopodomyia*) sont actuellement connues sur l'île mais *Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus* sont les moustiques les plus abondants et se retrouvent communément sur toute l'île dans les zones urbaines, périurbaines et rurales, jusque parfois 1200-1400 m d'altitude (139). D'origine asiatique, *Culex tritaeniorhynchus* est largement présent en région afro-tropicale. A La Réunion, il est présent sur l'ensemble du littoral mais est généralement peu abondant, et concentré aux abords des étangs et de certaines zones humides. Ses gîtes larvaires préférentiels sont souvent des gîtes naturels et très ensoleillés (trous de rochers, prairies inondées). C'est une espèce opportuniste, piquant préférentiellement les bovins et les porcs mais également les humains lorsque ses hôtes de prédilection font défaut (288). Abondant dans tous les milieux urbains de l'île jusqu'à 1 400 m d'altitude, *Culex quinquefasciatus* est la deuxième espèce la plus abondante sur l'île après *Aedes albopictus*. Ses gîtes larvaires sont variés, et se retrouvent en milieu urbain et rural, dans toutes les eaux riches en matières organiques ou polluées, mais aussi dans les eaux claires. Les femelles sont opportunistes, piquant les hommes, les mammifères domestiques ainsi que les oiseaux (139).

Les différents hôtes compétents pour le VEJ (porcs et volailles) sont également présents. La filière avicole est la principale production animale à La Réunion, assurant plus de la moitié de la production de viande de l'île. La production de volailles de chair de la Réunion est une production de diversification qui se caractérise par la taille réduite de ses exploitations (ferme de référence à 600 m<sup>2</sup>) et le nombre élevé de petits exploitants. En 2018, la filière organisée

regroupe 154 producteurs au sein de deux coopératives (334). L'élevage porcin représente la deuxième production animale à La Réunion, avec environ 200 élevages recensés en 2018. La grande majorité (environ 87%) de la production locale est assurée par les éleveurs du secteur coopératif qui possèdent pour la plupart des élevages de type naisseur-engraisseur à caractère familial de dimension restreinte (30 truies en moyenne). Le reste de la production locale est assuré par des éleveurs dits « indépendants », s'agissant pour la plupart de petites unités d'engraisseurs, ou naisseurs-engraisseurs (335).

Le nombre de reproduction de base  $R_0$  est le plus souvent défini comme le nombre moyen de cas secondaires causés par un individu infectieux placé dans une population d'individus sensibles ou plus généralement comme le nombre attendu de cas secondaires par cas primaire dans une population naïve (291). C'est l'indicateur couramment utilisé pour mesurer si un agent infectieux peut ( $R_0 > 1$ ) ou non ( $R_0 < 1$ ) circuler durablement dans une population (23,291). Dans le cas des arboviroses comme l'EJ, et comme les vecteurs de l'EJ sont opportunistes (288–290), le  $R_0$  est influencé par le taux de piqûre des vecteurs aux différents hôtes, ainsi que par la compétence de ces différents hôtes. Ces hôtes peuvent en effet être compétents - ayant une virémie suffisamment élevée pour infecter en retour un moustique piqueur, comme les porcs et les volailles (33,52–54), ou non compétents, comme les bovins, les chiens et les humains (60,61,64,104).

L'objectif de cette étude était d'analyser la capacité de systèmes multi-hôtes présents à La Réunion, définis sur la base d'une proximité aux élevages de porcs, à maintenir la transmission du VEJ dans l'hypothèse d'une introduction. Ces systèmes multi-hôtes sont comparables à celui étudié au Cambodge, bien que les densités d'hôtes et de vecteurs soient différentes. Ils incluent les porcs et volailles comme hôtes compétents et les bovins, humains et chiens, abondants à la Réunion, comme hôtes non compétents ainsi que les moustiques du genre *Culex* (*Culex spp.*) comme vecteurs potentiels du VEJ. Nous avons adapté le modèle déterministe à compartiments de transmission du VEJ, développé et validé au Cambodge et présenté dans le chapitre précédent (336). Nous avons ensuite utilisé ce modèle pour estimer les valeurs du  $R_0$  dans les systèmes épidémiologiques centrés sur chacun des élevages de porcs réunionnais.

## 2. Matériel et méthode

### 2.1. Système épidémiologique

Les porcs étant les principaux hôtes amplificateurs du VEJ, nous nous sommes placés dans la situation la plus défavorable correspondant à l'introduction d'un vecteur infecté dans ou à proximité d'un élevage de porcs. L'hypothèse sous-jacente est que chaque élevage de porc possède au moins un gîte larvaire de *Culex spp.*. En effet, les larves du *Culex* le plus abondant à La Réunion, *Culex quinquefasciatus*, pullulent dans toutes les eaux urbaines riches en matières organiques ou polluées par des détergents, ainsi qu'en milieu rural dans les eaux polluées de rejets agroalimentaires, les réserves d'eau à usage domestique, et les fosses à lisier (139).

Les systèmes épidémiologiques étudiés correspondaient à des zones tampon de 1 km de rayon autour de chaque élevage de porcs, 1 km correspondant à la distance de vol moyenne des *Culex* (304).

*Culex quinquefasciatus* et *Culex tritaeniorhynchus* ont été montré expérimentalement compétents pour le VEJ, ont un comportement trophique opportuniste, et sont présents à La Réunion (139,288). Ces deux espèces de vecteurs ont été représentées dans le modèle par une seule population de *Culex spp.*. *Culex neavei* est également présent et, bien qu'il ait été montré potentiel vecteur du WNV et du virus USUTU (337,338), aucun n'étude n'a encore été publiée quant à sa potentielle compétence pour VEJ.

A La Réunion, les élevages de porcs sont de type familial, de taille restreinte et en bâtiments ouverts sur l'extérieur donc non étanches aux vecteurs. Il existe également quelques élevages plein-air (335,339). L'élevage de volaille en plein air est très répandu, avec de nombreux élevages familiaux de type « basse-cour ». Au sein de la filière organisée (coopératives Avipole et Fermiers du Sud), 20% des adhérents élèvent leurs volailles en plein air. De plus, les services vétérinaires estiment qu'environ 5 à 10% de la production locale de viande de volaille est assurée par des élevages non déclarés, qui sont alors des élevages de type basse-cour. Les élevages plus industriels sont de taille très variable, allant de 600 à environ 28 000 places en bâtiments. Néanmoins, ces bâtiments sont ouverts sur l'extérieur, notamment par les systèmes d'aération (334,339).

Les élevages de porcs étant globalement situés à des altitudes comparables, et compte tenu de la petite surface de l'île, nous avons fait l'hypothèse que les conditions environnementales et climatiques pouvant jouer sur l'abondance vectorielle ne variaient que légèrement d'un élevage à l'autre. De plus, chaque zone tampon ayant été tracée autour d'un élevage de porcs, nous avons fait l'hypothèse que les gîtes larvaires étaient inféodés aux activités d'élevage (fosse à lisier par exemple) et que la taille de la population de vecteurs d'une zone tampon à l'autre pouvait être considérée constante.

## 2.2. Données

### 2.2.1. *Données relatives aux hôtes*

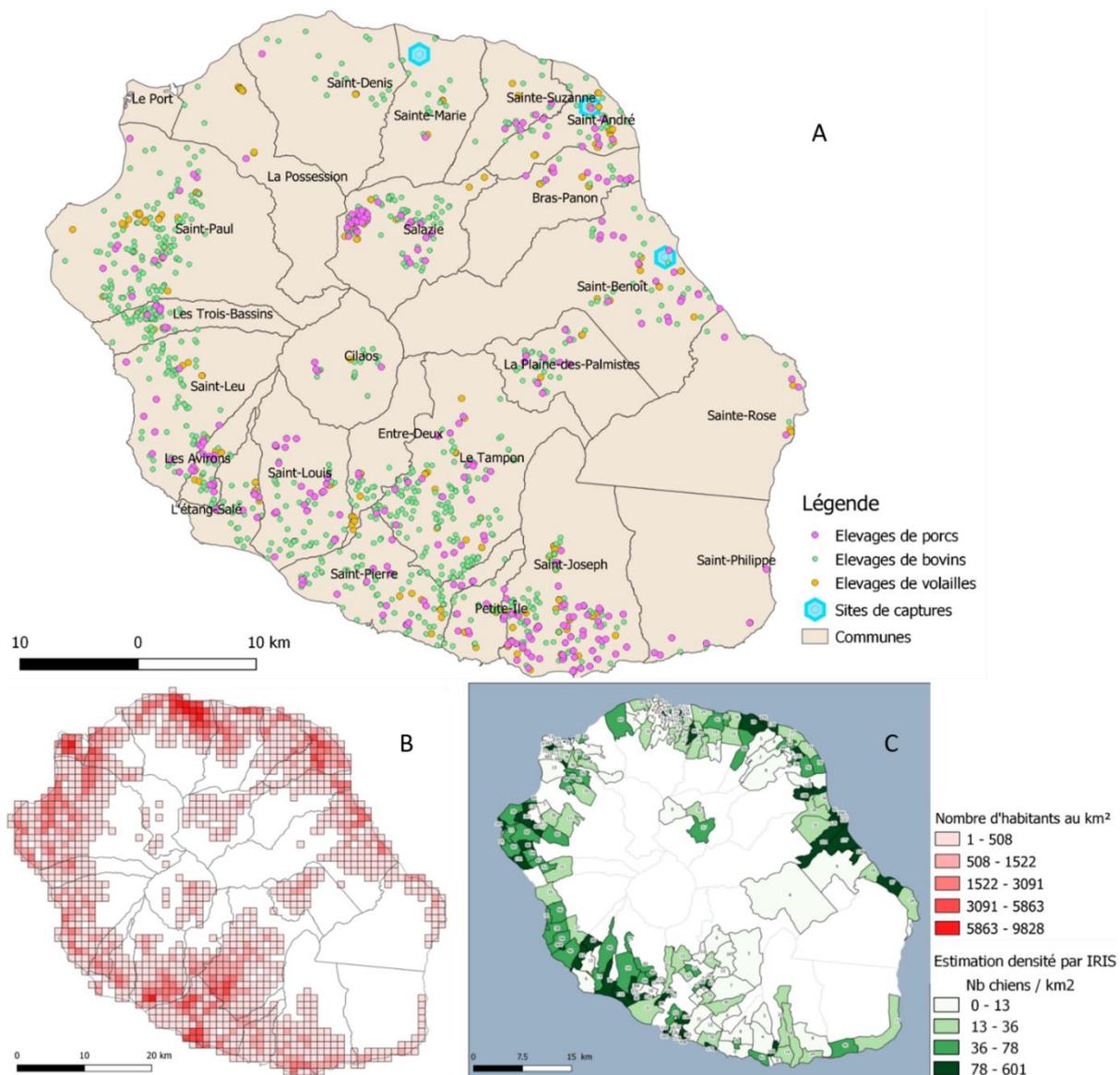
Les tailles et localisations des élevages de porcs, de volailles et de bovins ont été obtenues grâce à un travail de récolte de données auprès du GDS Réunion, de la coopérative d'élevage aviaire Avipole, du CIRAD et de la DAAF Réunion (base de données SIGAL). Le traitement des données brutes communiquées et un travail de géoréférencement des élevages pour lesquels la localisation exacte était inconnue a permis d'obtenir les points GPS ainsi que le nombre d'animaux pour chaque élevage connu et déclaré (Figure 15, A). Les déclarations d'installation classées disponibles publiquement sur le site internet de la DAAF de La Réunion ont permis de compléter les informations en termes de quantité d'animaux lorsque celles-ci étaient manquantes. L'ensemble des données a été anonymisé.

De 2017 à 2018, l'EPLEFPA-CFPPA de Saint-Paul a réalisé une étude sur l'errance des carnivores domestiques visant à analyser les mécanismes liés à la persistance de ce phénomène à La Réunion (340). Cette étude nous a été communiquée par la DAAF de La Réunion et les données brutes par la chargée de mission de l'EPLEFPA de Saint-Paul. Une estimation de la taille de l'ensemble de la population canine, domestique (chiens confinés et divagants) et errante, a été obtenue grâce à, d'une part, une enquête d'opinion auprès de 942 ménages réunionnais concernant les animaux de compagnie et errants et, d'autre part, au recensement du nombre et des caractéristiques des chiens présents dans l'espace public à l'aide d'une méthode d'observation et de comptage. L'enquête a permis d'estimer un ratio hommes/chiens domestiques (confinés et divagants) de 1:3,8. Les comptages sur le terrain ont permis d'estimer une densité de chiens errants par zone IRIS (découpage territorial INSEE) prospectée (n=230), les zones IRIS inhabitées et inaccessibles ayant été exclues de l'échantillonnage (n=114). Nous avons donc obtenu une estimation du nombre de chiens errants par zone IRIS prospectée et le

contour de celles-ci (couche SIG) (Figure 15, C). Les zones prospectées ayant été sélectionnées selon la probabilité estimée de la présence de chiens errants, le nombre de chiens errants dans les zones IRIS non prospectées a été ramené à 0.

Pour la population humaine, nous avons utilisé les données INSEE publiques de la densité de population au km<sup>2</sup> (341) (Figure 15, B). Le nombre de chiens domestiques au km<sup>2</sup> a été calculé en appliquant le ratio hommes/chien de l'enquête présentée ci-dessus (3,8 (340)) à la densité de population humaine.

Les tracés des zones tampon ont été réalisés avec les packages « sp », « rgdal », « maptools », « rgeos », « crop », « raster » du logiciel R, version 4.0.2 (285).



**Figure 15** : A) Localisation des élevages de porcs, de volailles et de bovins recensés et sites de captures de moustiques (Source GDS Réunion, DAAF, Avipôle); B) Carte de densité humaine carroyée au km<sup>2</sup> à La Réunion (Source : INSEE (341)). Les densités de chiens domestiques au km<sup>2</sup> correspondent à ces densités humaines divisées par le ratio chien/hommes de 3,8 ; C) Carte de densité des chiens errants estimés dans l'enquête sur l'errance des carnivores domestiques à La Réunion (Sources : (340), EPLEFPA, CFPPA, DAAF de La Réunion)

### 2.2.2. Données relatives aux vecteurs

Afin d'estimer une population de vecteurs potentiellement actifs dans la transmission du VEJ à La Réunion, nous avons besoin de données comparables entre le Cambodge et La Réunion afin de calculer un ratio à appliquer à la taille de population vectorielle estimée par le modèle Cambodgien. Ces données comparables étaient donc des données de captures produites au Cambodge et à La Réunion selon les mêmes protocoles.

#### 2.2.2.1. Données de captures au Cambodge

Trois jeux de données de captures produites au Cambodge ont été utilisées. En 2014-2015, Cappelle *et al.* (2016) ont placé un piège lumineux CDC (CDC *light trap* (342)) dans un bâtiment ouvert d'un élevage de porcs familial, au sein d'une basse-cour, dans la province de Kandal. Les captures ont été réalisées 3 nuits par mois d'avril à juillet 2014 et de septembre 2014 à janvier 2015 (108). En 2015, Di Francesco *et al.* (2018) ont placé un piège CDC, dans deux élevages familiaux de porcs, l'un en zone rural et l'autre en zone péri-urbaine, pendant trois nuits consécutives chaque mois de juillet à octobre 2015 (109). En 2019-2020, l'unité d'entomologie de l'Institut Pasteur du Cambodge a initié un suivi de la dynamique des populations de moustiques dans 5 provinces du Cambodge, dans des paysages identifiés différents, allant du centre-ville des villages à la forêt la plus proche (données non publiées, enquête en cours, communication personnelle Sébastien Boyer). Un piège CDC et un piège Biogents sentinel à leurre (BG-leurre) (343) ont été placés par zone, pendant 3 nuits consécutives chaque mois. L'enquête a dû être interrompue en raison de la crise Covid-19.

#### 2.2.2.2. Suivi d'abondance des vecteurs à La Réunion

Il n'existait pas de suivi d'abondance des vecteurs potentiels du VEJ à La Réunion. Nous avons mis en place ce suivi d'un an en collaboration avec le Cirad, l'ARS et l'IRD et y avons participé pour produire des données nous permettant d'estimer l'abondance des vecteurs potentiellement impliqués dans la transmission du VEJ à La Réunion, en cas d'introduction. Les sites de captures ont été sélectionnés en collaboration avec l'IRD et l'ARS selon plusieurs critères : présence connue de *Culex*, s'apparentant le plus à une basse-cour cambodgienne, et variabilité du paysage. Ainsi, les captures ont été réalisées dans 3 sites (Figure 16) :

- une friche en zone urbaine,
- un élevage de porcs et volailles en zone urbaine,

- une ferme pédagogique en zone rurale où sont exposées plusieurs espèces dont des porcs, des volailles, des petits ruminants, un âne et un bovin (et un dromadaire).

Tous les mois, un piège CDC et un piège BG-leurre ont été placés pendant 3 nuits consécutives (en période de nouvelle lune pour limiter toute source lumineuse) dans chaque site. Le piège CDC a été utilisé sans addition de CO<sub>2</sub>, comme dans les études réalisées au Cambodge, pour rendre les données de captures comparables d'une région à l'autre. A La Réunion, les BG-leurre ont initialement été ajoutés pour augmenter les chances de capturer des moustiques. Dans l'élevage de porcs et volailles, les deux pièges ont été placés près des porcs, à l'entrée des salles de fin de gestation et maternité, ouvertes sur l'extérieur. *Culex quinquefasciatus* établissant ses gîtes larvaires préférentiellement dans des zones humides et polluées par de la matière organique, un piège BG-leurre additionnel a été placé au niveau de la fosse à lisier de l'élevage. Ainsi, 3 pièges CDC et 4 BG-leurre ont été placés sur l'ensemble des 3 sites, 3 nuits consécutives par mois pendant 1 an, du 1<sup>er</sup> Juillet 2019 au 24 juin 2020.

Les moustiques capturés ont été comptés identifiées à l'aide des clés d'identification morphologique de l'Ile de La Réunion (344).



Pièges BG-leurre et CDC dans la friche



Piège CDC dans l'élevage de porcs et volailles



Piège BG-leurre dans la ferme pédagogique

**Figure 16 :** Quatre des sept pièges utilisés pour les captures de moustiques à La Réunion (Crédit photo Héléna Ladreyt, Guillaume Dupuy (ARS), Anaïs Etheves (CIRAD))

### 2.3. Description du modèle

Le modèle est un modèle déterministe à compartiments de type SEIR, fonctionnant en temps continu, développé initialement pour simuler la transmission du VEJ au sein d'un système multi-hôtes correspondant à un village rural de la province de Kandal (336). Une description détaillée du modèle est donnée dans Ladreyt *et al.* (soumis), faisant l'objet du chapitre 3.

Le modèle simule en été puis en hiver la transmission du VEJ entre les hôtes compétents (porcs, canards et poulets) et les vecteurs (*Culex spp.*), et des vecteurs aux hôtes non compétents (bovins, humains et chiens) dans chaque zone tampon.

### 2.3.1. Paramètres relatifs aux hôtes

La taille des populations de chaque espèce hôte (porcs charcutiers, truies, poulets, canards, bovins, chiens, humains) a été calculée dans chaque zone tampon par intersection entre les tracés des zones tampons et les couches SIG de localisations et tailles d'élevages pour les animaux de production et les couches SIG de densités de populations pour les hommes et chiens (fonction « intersect » du package « raster »). Les espérances de vie moyennes des animaux, dépendant des systèmes de production, et humains ( $1/\mu$ ) ont été adaptées par rapport au modèle cambodgien, et ont été issues de la littérature. En moyenne, les porcs sont abattus à 6,5 mois à La Réunion (6 mois au Cambodge), les poulets à environ 56 jours (6 mois au Cambodge), les canards à 85 jours (2 ans au Cambodge), et les bovins à environ 6 ans (7 ans au Cambodge). La durée de vie moyenne des hommes est plus longue à La Réunion (80,5 ans) qu'au Cambodge (70 ans), et les chiens vivent en moyenne légèrement plus longtemps (6 ans contre 5 ans au Cambodge). L'ensemble des autres paramètres relatifs aux hôtes (durée de l'immunité maternelle ( $1/\delta$ ), périodes d'incubation ( $1/\Phi$ ) et de guérison ( $1/\gamma$ )), n'a pas été modifié par rapport au modèle Cambodge. Nous avons ainsi fait l'hypothèse que ces paramètres ne variaient pas d'une région de l'île à l'autre. L'ensemble des paramètres est présenté dans le tableau 15.

**Tableau 15 :** Paramètres du modèle déterministe adapté à La Réunion (les paramètres en gras sont ceux dont la valeur a été modifiée par rapport au modèle Cambodge).

Paramètre	Définition	Valeur	Références
<b>Hôtes</b>			
$1/\mu_p$	<b>Durée de vie moyenne des porcs</b>	<b>6,5 m*</b>	(345)
$1/\mu_t$	Durée de vie moyenne des truies	3 a	(345)
$1/\mu_c$	<b>Durée de vie moyenne des canards</b>	<b>85 j</b>	(346)
$1/\mu_{pl}$	<b>Durée de vie moyenne des poulets</b>	<b>55,6 j</b>	(346)
$1/\mu_{humain}$	<b>Durée de vie moyenne des humains</b>	<b>80,5 a</b>	(347)
$1/\mu_b$	<b>Durée de vie moyenne des bovins</b>	<b>5,7 a</b>	(348,349)
$1/\mu_{chien}$	<b>Durée de vie moyenne des chiens</b>	<b>5,9 a</b>	(340)
$1/\delta_p$	Durée de l'immunité maternelle chez les porcs	2,5 m	(108,109)
$1/\delta_c, 1/\delta_{pl}$	Durée de l'immunité maternelle chez les volailles	1 m	(74,280)

$1/\delta_{humain}$	Durée de l'immunité maternelle chez les humains	5 m	(296,297)
$1/\delta_b, 1/\delta_{chien}$	Durée de l'immunité maternelle chez les bovins et les chiens	3 m	(298,299)
$1/\Phi_p$	Période d'incubation chez les porcs	2 j	(56,157,158)
$1/\Phi_c$	Période d'incubation chez les canards	2 j	(83,275–277)
$1/\Phi_{pl}$	Période d'incubation chez les poulets	1,5 j	(83,300)
$1/\Phi_{humain}$	Période d'incubation chez les humains	10 j	(260)
$1/\Phi_b, 1/\Phi_{chien}$	Période d'incubation chez les bovins et les chiens	4 j	(62,301)
$1/\gamma_p$	Période virémique chez les porcs	1,5 j	(56,157)
$1/\gamma_d, 1/\gamma_{pl}$	Période virémique chez les volailles	3 j	(83,275,276,300)
$1/\gamma_{humain}, 1/\gamma_b, 1/\gamma_{chien}$	Délai d'apparition des anticorps chez l'homme, le bétail et le chien	5 j	(62,301–303)
<b>Vecteurs</b>			
$1/\mu_v$	Durée de vie moyenne de <i>Culex spp.</i>	25 j	(304)
$b$	Taux de piqûre de <i>Culex spp.</i>	0,25	(305,306)
$1/\Phi_v$	Période extrinsèque d'incubation de <i>Culex spp.</i>	10 j	(276,307)
<b>Interactions vecteurs/hôtes</b>			
$\pi_p$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les porcs et truies	1**	(288)
$\pi_c$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les canards**	0,43	(336)
$\pi_{pl}$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les poulets**	0,09	(288)
$\pi_{humain}$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les humains**	0,5	(288)
$\pi_b$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les bovins**	1,7	(288)
$\pi_{chien}$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour les chiens**	0,12	(336)
$p_h$	Probabilité de transmission d'un vecteur ( <i>Culex spp.</i> ) à un hôte de l'espèce $h$	0,5	(276,88,308,275)
$q_{hc}$	Probabilité de transmission d'un hôte compétent à un vecteur ( <i>Culex spp.</i> )	0,5	(88,276,307–309)
$q_{hnc}$	Probabilité de transmission d'un hôte non compétent à un vecteur ( <i>Culex spp.</i> )	0	(62,301)

Indices:  $p$ =porcs,  $t$ =truies,  $c$ =canards,  $pl$ =poulets,  $b$ =bovins,  $h$ =hôte,  $hc$ =hôtes compétents,  $hnc$ =hôtes non compétents.

\* a=année ; m=mois ; j=jour ; \*\*Le porc est la référence.

### 2.3.2. Paramètres relatifs aux vecteurs

Les densités de vecteurs d'une zone d'étude à l'autre étant probablement différentes, il convenait d'adapter la population de vecteurs estimée au Cambodge pour le modèle réunionnais, afin d'obtenir une estimation de la population de vecteurs active dans une zone tampon ( $N_V$  Réunion). Comme la surface d'une zone tampon tracée à La Réunion autour d'un élevage de porcs est comparable à celle du village étudié au Cambodge (environ 3 à 4 km<sup>2</sup>), nous avons fait l'hypothèse que la population de vecteurs dans une zone tampon à La Réunion ( $N_V$  Réunion) correspondait à la population de vecteurs dans un village au Cambodge ( $N_V$  Cambodge) multipliée par un ratio d'abondance. Pour pouvoir calculer ce ratio à partir des données disponibles, nous avons fait l'hypothèse qu'avec un même type de piège, la probabilité de capturer un *Culex spp.*, i.e. la capturabilité des *Culex spp.*, était identique au Cambodge et à La Réunion. Ce ratio d'abondance Réunion/Cambodge correspond alors au rapport entre le nombre moyen de *Culex spp.* capturés par piège par nuit à La Réunion et le nombre moyen de *Culex spp.* capturés par piège par nuit au Cambodge, issu des données de capture des deux régions présentées ci-dessus.

La saisonnalité étant marquée à La Réunion, nous avons estimé une taille de population de vecteurs par saison (été, hiver). En effet, au Cambodge, la saison des pluies, chaude et humide, s'étend généralement de mai à octobre, et la saison sèche de novembre à avril. A La Réunion, l'hiver austral (sec et frais) s'étend de mai à octobre et l'été (chaud et humide), de novembre à avril. Comme deux types de pièges ont été utilisés, nous avons pu calculer 4 types de ratios : par saison (été, hiver) et par type de piège (CDC, BG), en utilisant 8 jeux de données de captures : « Réunion BG été », « Réunion BG hiver », « Réunion CDC été », « Réunion CDC hiver », « Cambodge BG été », « Cambodge BG hiver », « Cambodge CDC été », « Cambodge CDC hiver ».

Les valeurs des autres paramètres relatifs aux vecteurs ou aux interactions hôtes-vecteurs (taux de piqure ( $b$ ), préférences trophiques ( $\pi$ ), probabilités de transmission ( $p$ ,  $q$ )) étaient identiques à celles utilisées dans le modèle Cambodge (Tableau 15).

## 2.4. Exploitation du modèle

Le modèle a été utilisé dans les zones tampon tracées autour de chacun des élevages de porcs réunionnais pour calculer un  $R_0$  moyen ainsi que ses intervalles de confiance.

Afin de prendre en compte la variabilité des données dans le calcul des ratios d'abondance, 1000 valeurs par jeu de données de captures ont été tirées au sort avec remise. Pour une saison et pour un type de piège donnés, 1000 ratios ont été calculés en divisant les 1000 valeurs tirées au sort dans le jeu de données correspondant de La Réunion par les 1000 valeurs tirées au sort dans le jeu de données correspondant du Cambodge (ex : 1000 valeurs du jeu « Réunion BG été » divisées par 1000 valeurs du jeu « Cambodge BG été »). Nous avons donc obtenu 1000 ratios par catégorie (*i.e.* par couple « type de piège-saison ») : ratios « CDC été », ratios « CDC hiver », ratios « BG été », ratios « BG hiver ».

Mille triplets de valeurs des trois paramètres estimées par le modèle Cambodge (préférence trophique relative des *Culex spp.* pour les chiens  $\pi_{chien}$  et pour les canards  $\pi_{canard}$ , et taille de population des vecteurs  $Nv_{Cambodge}$ ) ont ensuite été tirés au sort dans l'intervalle de confiance gaussien tridimensionnel, estimé dans l'étude Cambodge. Quatre scénarios ont été étudiés, pour chaque catégorie de ratio d'abondance utilisée pour le calcul de la taille de population des vecteurs, dépendant du type de piège la saison :

- i) Dans le scénario 1, la population de vecteurs actifs estimée par zone tampon ( $Nv_{Réunion}$ ) a été calculée en multipliant la population estimée au Cambodge ( $Nv_{Cambodge}$ ) par le ratio « CDC été » ;
- ii) Dans le scénario 2,  $Nv_{Réunion}$  a été calculé en multipliant  $Nv_{Cambodge}$  par le ratio « CDC hiver » ;
- iii) Dans le scénario 3,  $Nv_{Réunion}$  correspond à  $Nv_{Cambodge}$  multiplié par le ratio « BG été » ;
- iv) Dans le scénario 4,  $Nv_{Réunion}$  correspond à  $Nv_{Cambodge}$  multiplié par le ratio « BG hiver ».

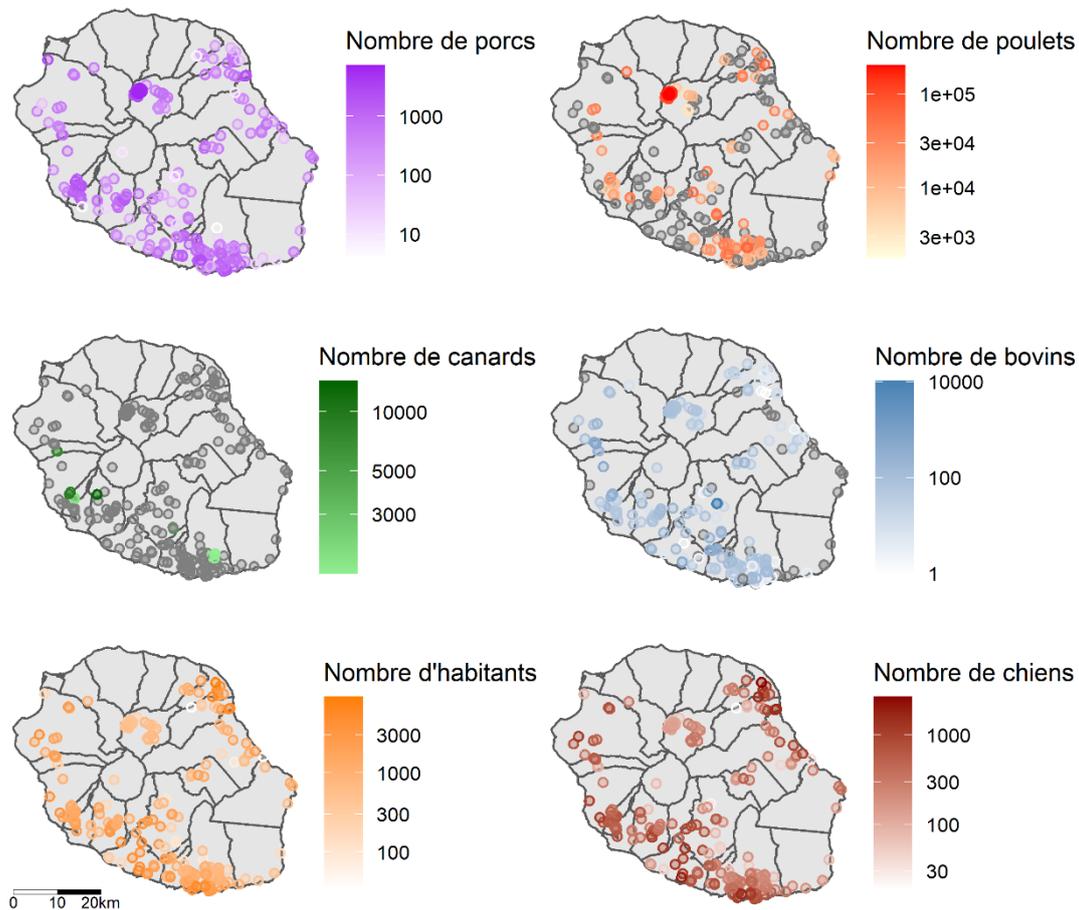
Pour chaque scénario, 1000 valeurs de  $Nv_{Réunion}$  ont été obtenues en multipliant l'une des 1000 valeurs de  $Nv_{Cambodge}$  par l'une des 1000 valeurs de ratio. Ces 1000 jeux de paramètres ont ensuite permis, pour chaque scénario, de calculer, pour chaque zone tampon, 1000 valeurs de  $R_0$ . La moyenne des 1000  $R_0$  a été conservée ainsi que les quartiles à 2,5 et 97,5% pour les intervalles de confiance.

### 3. Résultats

#### 3.1. Populations d'hôtes et de vecteurs

##### 3.1.1. Tailles de populations d'hôtes par zone tampon

Les tailles de population par espèce par zone tampons sont présentées dans la figure 17. Les élevages considérés (porcs, volailles et bovins) se situent dans des zones urbaines ou péri-urbaines, où la densité humaine peut atteindre plus de 3000 habitants au km<sup>2</sup> (Figure 15). En effet, le territoire accessible et habitable à La Réunion étant restreint du fait du paysage, les élevages sont concentrés en zone littorale et intermédiaire, jusqu'à environ 900 mètres d'altitude, correspondant à la zone où les densités de population humaine sont les plus élevées. Les chiens, domestiques ou errants, vivent également à proximité de l'homme.



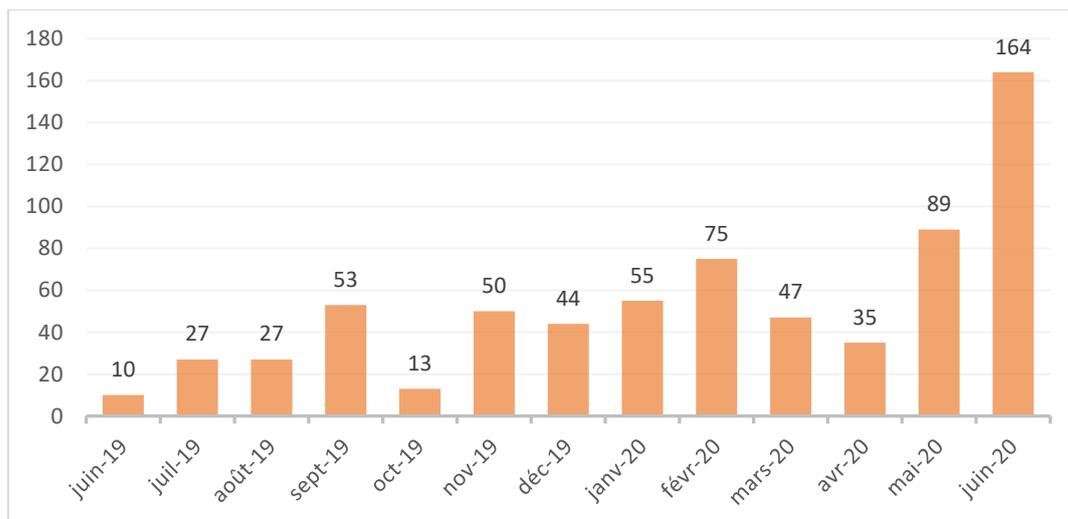
**Figure 17 :** Tailles de populations d'hôtes par zone tampon. Les zones grises correspondent aux zones tampons dans lesquelles l'espèce en question était absente.

### 3.1.2. Suivi d'abondance des vecteurs à La Réunion

1332 moustiques ont été capturés entre le 1<sup>er</sup> juillet 2019 et le 24 juin 2020, dont 743 *Culex quinquefasciatus* et 559 *Aedes albopictus*. Une seule femelle *Culex tritaeniorhynchus* a été capturée. Les sites de captures sont en effet plus proches des gîtes larvaires de prédilection de *Culex quinquefasciatus* que ceux de *Culex tritaeniorhynchus*. Le détail des captures par espèce et par sexe est présenté dans le tableau 16 et le nombre de *Culex spp.* capturés par mois est présenté dans la figure 18. Le détail des captures de *Culex spp.* (*Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus* et *Culex neavei* confondus) par sexe, par saison, par site de capture et par type de piège utilisé est présenté en Annexe 7.

**Tableau 16 :** Bilan des espèces capturées à La Réunion avec les 3 pièges CDC et 4 pièges BG, du 1er juillet 2019 au 24 juin 2020

Espèce	Femelles	Mâles	Total
<i>Culex quinquefasciatus</i>	549	194	743
<i>Culex tritaeniorhynchus</i>	1	0	1
<i>Culex neavei</i>	4	0	4
<i>Aedes albopictus</i>	314	245	559
<i>Aedes fowler</i>	2	0	2
<i>Anopheles arabiensis</i>	6	2	8
<i>Anopheles coustani</i>	13	0	13
<i>Lutzia trigrupes</i>	1	0	1
<i>Orthopodomyia reunionensis</i>	1	0	1



**Figure 18 :** *Culex spp.* mâles et femelles capturés par mois à La Réunion, tous sites et tous pièges confondus (3 CDC et 4 BG)

Le nombre de *Culex spp.* capturés par mois montre une légère augmentation en été, de novembre 2019 à avril 2020 par rapport à de juin à octobre 2019. Cependant, les captures de *Culex spp.* ont été maximales en mai et juin 2020, mois d’hiver, engendrant une contradiction apparente plus forte abondance en hiver qu’en été. De fortes pluies ont eu lieu en mai et juin 2020 avant les captures, qui peuvent expliquer l’augmentation importante des quantités capturées.

### 3.2. Calculs des $R_0$ et rangs des zones tampons

Les valeurs des ratios d’abondance et des tailles de population de vecteurs par zone tampon ( $N_v$  Réunion) par scénario sont présentées dans le Tableau 17.

**Tableau 17 :** Moyennes des ratios et des populations de vecteurs estimées pour le système réunion.

Scénario	Ratios d’abondance	Population moyenne de vecteurs actifs
	Réunion/Cambodge (quantiles à 2,5% et 97,5%)	pour une zone tampon à La Réunion ( $N_v$ Réunion) (quantiles à 2,5% et 97,5%)
1	0,0012 (0,0009-0,0015)	60,4 (42,4-74,5)
2	0,0012 (0,0008-0,0015)	60,6 (40,6-72,7)
3	0,048 (0,039-0,061)	2542 (1905-2977)
4	0,023 (0,017-0,027)	1126 (1078-1321)

La figure 19 représente, pour les 4 scénarios, les valeurs de  $R_0$  calculés par zone tampon et classées selon trois catégories, valeur moyenne supérieure à 1, valeur moyenne inférieure à 1 mais borne supérieure de l'intervalle de confiance (IC95%) supérieure à 1 et borne supérieure de l'IC95% inférieure à 1.

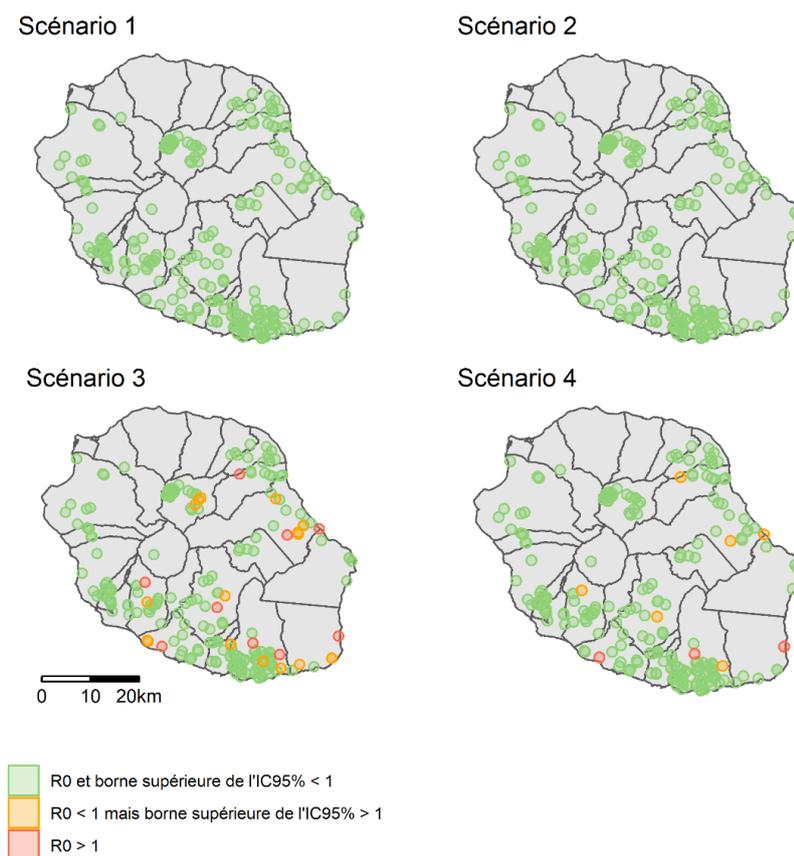


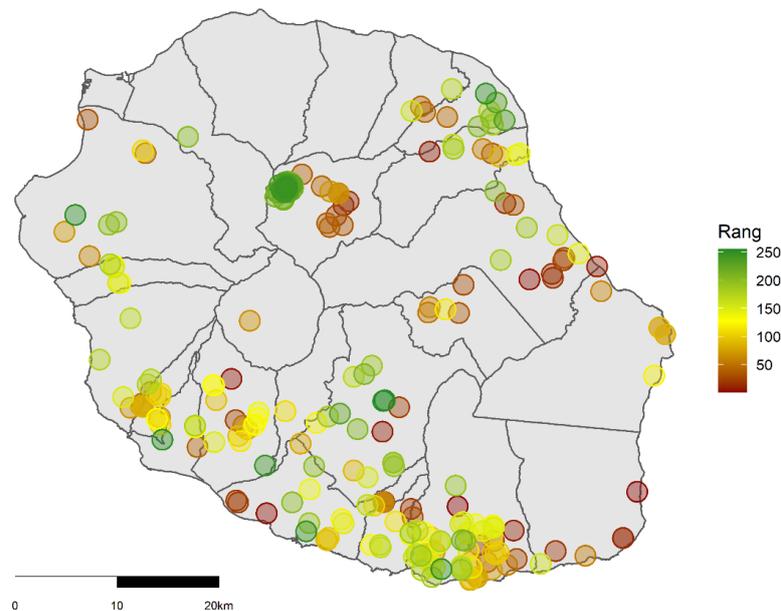
Figure 19 : Zones tampons classées dans 3 catégories selon la valeur du  $R_0$  calculé.

Dans les scénarios 1 et 2, aucune zone tampon ne présentait de  $R_0$  supérieur à 1 ou un IC95% englobant 1 (Figure 19). En effet, les moyennes des ratios (CDC été et CDC hiver) étant très faible (0,0012 (Tableau 17)), les moyennes des populations de vecteurs ( $N_V$  Réunion) utilisées pour le calcul des  $R_0$  dans ces deux scénarios étaient également très faibles (60,4 et 60,6 moustiques, Tableau 17).

Dans les scénarios 3 et 4, les populations de vecteurs par zone tampon ( $N_V$  Réunion) étaient plus importantes (2542 et 1126 vecteurs en moyenne respectivement) et 28 et 9 zones tampons respectivement étaient à risque, avec des  $R_0$  calculés allant de 0,7 [0,6-1,0]<sub>IC95%</sub> à 2,1 [1,6-2,9]<sub>IC95%</sub>. Dans le scénario 3, 9 zones présentaient un  $R_0 > 1$  et 17 un  $R_0 < 1$  mais dont l'IC95%

englobait 1. Dans le scénario 4, 3 zones présentaient un  $R_0 > 1$  et 6 un  $R_0 < 1$  mais dont l'IC95% englobait 1 (Figure 19).

Nous avons ensuite classé les zones tampon selon la valeur du  $R_0$  calculé. Même si les valeurs de  $R_0$  variaient, le rang de chaque zone en termes de valeur de  $R_0$  ne changeait pas avec le scénario. Ce résultat, plus général, permet de synthétiser les résultats et d'identifier dans un premier temps les zones tampons les plus à risque d'une circulation du VEJ en cas d'introduction (Figure 20).



*Figure 20 : Rang des zones tampons (de 1 km de rayon autour des élevages de porcs), classées selon la valeur du  $R_0$  calculé.*

Ces zones les plus à risque représentent les systèmes multi-hôtes pouvant potentiellement assurer la circulation du VEJ s'il venait à y être introduit. Le détail des tailles de populations d'hôtes dans les 9 zones où le  $R_0$  était supérieur à 1 dans les scénarios 3 et 4 est présenté dans le tableau 18.

**Tableau 18 :** Taille des populations d'hôtes pour les 9 zones tampons identifiées comme les plus à risque, et valeur moyenne et intervalles de confiance des  $R_0$  pour les résultats issus des scénarios 3 (ratios BG été) et 4 (ratios BG hiver).

Rang	Scénario 3	Scénario 4	Tailles de populations						
	( $Nv_{Réunion} = 2542$ )	( $Nv_{Réunion} = 1126$ )	Porcs	Truies	Canards	Poulets	Bovins	Humains	Chiens
1	2,1 [1,6-2,9]	1,4 [1,0-1,9]	0	20	0	0	0	87	53
2	1,7 [1,3-2,4]	1,2 [0,9-1,6]	126	16	0	0	0	147	75
3	1,6 [1,2-2,2]	1,1 [0,8-1,4]	80	0	0	0	5	175	47
4	1,5 [1,1-2,0]	< 1	375	33	0	0	0	70	45
5	1,4 [1,1-1,9]	< 1	300	25	0	0	0	171	65
6	1,4 [1,1-1,9]	< 1	180	0	0	0	8	218	79
7	1,4 [1,0-1,8]	< 1	496	32	0	0	0	37	34
8	1,2 [0,9-1,7]	< 1	600	49	0	0	0	34	19
9	1,2 [0,9-1,6]	< 1	412	62	0	0	2	251	69

Ces zones identifiées comme les plus à risque se caractérisent par la présence de porcs, associée à l'absence de volaille et une densité humaine relativement faible. Les zones avec de fortes densités de volailles étaient souvent associées à une forte densité humaine (Figures 15 et 17). Ces résultats suggèrent que dans les zones de forte densité de volailles, la densité d'hôtes non compétent (humains, chiens et bovins) est telle que les volailles, bien qu'hôtes compétents, ne permettraient pas ou peu la circulation du VEJ. De plus, la préférence trophique des *Culex spp.* pour les poulets, estimée au Cambodge, est la plus faible de tous les hôtes (288) : les vecteurs préfèrent prendre leur repas sanguin sur les autres hôtes présents, qui sont pour la plupart des hôtes non compétents.

## 4. Discussion

Certaines maladies vectorielles ont déjà été introduites à La Réunion et ont posé ou posent de sérieux problèmes de santé publique comme le chikungunya entre 2005 et 2006 et la dengue qui provoque des épidémies chaque année (350–352). Le terrain semble favorable aux

émergences de nouvelles arboviroses et les échanges commerciaux et humains nombreux dans l'Océan Indien font craindre une introduction du VEJ à La Réunion.

Les calculs de  $R_0$  dans des zones tampon tracées autour de chacun des élevages de porcs recensés à La Réunion ont permis d'identifier des zones plus ou moins à risque de maintenir une transmission du VEJ en cas d'introduction. Nous avons étudié 4 scénarios selon le type de piège et la saison des données utilisées pour calculer la taille de population des vecteurs par zone tampon ( $N_V$  Réunion). Les  $R_0$  calculés étaient faibles quel que soit le scénario, mais dans les scénarios 3 et 4 (ratios BG), 12 zones présentaient un  $R_0 > 1$  : 9 en été et 3 en hiver. Quel que soit le scénario, les rangs des zones classées selon la valeur du  $R_0$  ne changeaient pas, *i.e.* les zones les plus à risque étaient les mêmes, caractérisées, pour les trois premières, par un système multi-hôtes avec de 20 à 142 porcs (porcs charcutiers et truies), 0 volailles, de 0 à 5 bovins, de 87 à 175 humains et de 47 à 75 chiens.

Ces résultats suggèrent que certaines compositions des systèmes multi-hôtes identifiés (zones tampons centrées sur les élevages de porcs), pourraient permettre dans certains cas la transmission du VEJ.

Plus particulièrement, on remarque que l'une des zones les plus à risque (en termes de rang), se situe à quelques kilomètres de la zone portuaire de La Réunion (commune du Port, au Nord-Ouest de l'île, Figure 20). Or, de nombreuses lignes commerciales relient Le Port à l'Asie du Sud-Est (Thaïlande, Inde) où l'EJ est endémique (132–134). De plus, les durées des transports de marchandises par cargo varient de 18 à 30 jours, et pourraient permettre la survie de vecteurs infectés, la durée de vie moyenne des *Culex spp.* étant de 25 jours (304). Cette zone du Port pourrait donc être une porte d'entrée du VEJ, par introduction de vecteurs infectés. Même si le  $R_0$  calculé dans cette zone était inférieur à 1, la proximité du port et le rang élevé de la zone tampon en question, témoignant d'un système multi-hôtes à risque de permettre la circulation du VEJ en cas d'introduction, sont des arguments qui nous amènent à recommander une mise en place des mesures de surveillance et de contrôle au niveau de l'élevage de porcs concerné. Des mesures de lutte antivectorielle pourraient y être appliquées (moustiquaires, destruction gîtes larvaires) afin d'éviter que des vecteurs infectés arrivant du Port ne piquent les porcs de cet élevage. Une surveillance sérologique pourrait également être mise en place, sur les porcs mais aussi sur les autres hôtes du système (volailles, chiens, bovins), ainsi que sur les hommes, afin de détecter d'éventuelles séroconversions témoignant d'une circulation du VEJ. Finalement, ces mesures devraient être associées à un renforcement de la communication

sur la protection des personnes contre les piqûres de moustiques, déjà mise en place pour lutter contre les épidémies de dengue.

Pour définir la taille de la population de vecteurs dans le modèle réunionnais, nous disposons de nos données de capture produites à La Réunion ainsi que de la taille de la population de vecteurs estimée par le modèle au Cambodge grâce à des données sérologiques. Une estimation réaliste de la densité de la population vectorielle et de sa dynamique temporelle est un élément essentiel à prendre en compte lors de la conception de modèles d'arboviroses, mais c'est aussi l'un des paramètres les plus difficiles à estimer.

Le calcul de la taille de la population de vecteurs dans le système épidémiologique réunionnais était basé sur l'hypothèse d'une capturabilité identique au Cambodge et à La Réunion, c'est-à-dire qu'à protocoles de capture égaux, on suppose que la probabilité qu'un *Culex spp.* soit attiré dans un piège est la même au Cambodge et à La Réunion. Sous cette hypothèse, nos résultats indiquent une différence d'abondance vectorielle importante entre les captures au Cambodge et à La Réunion. Cependant, le fait qu'on observe une différence de ratio entre les pièges BG et CDC, mais aussi une différence de ratio selon la saison pour le piège BG (0,023 en été et 0,048 en hiver) mais pas pour le piège CDC (0,012 en été et 0,012 en hiver), suggère que la capturabilité dans les deux zones d'étude n'est pas identique (Tableau 17). En effet, si la probabilité qu'un *Culex* se laisse capturer par un piège donné était la même au Cambodge et à La Réunion, on aurait observé le même type de variations des ratios selon la saison pour les deux pièges. Utiliser des données de capture produites en utilisant deux types de piège nous a donc permis d'infirmer cette hypothèse.

Cette différence observée de capturabilité pourrait avoir plusieurs explications. En premier lieu, l'utilisation d'outils induit l'existence d'une variabilité entre chaque appareil utilisé. Par exemple, la lumière des pièges CDC peut être plus ou moins intense et donc attirer plus ou moins les vecteurs, et les leurres des pièges BG, réutilisés pendant plusieurs mois, peuvent perdre légèrement leur potentiel attractif. Les résultats de captures peuvent également être soumis à un effet opérateur, mais l'utilisation de protocoles standardisés limite cet effet. Des études rapportent qu'à La Réunion, certains pièges classiques seraient moins efficaces que dans d'autres régions du monde. Ainsi, dans un contexte d'épidémies récurrentes de dengue, où la plupart des études ciblent *Aedes albopictus*, bien que des études suggèrent que les pièges classiques BG-leurre sont efficaces pour collecter *Aedes albopictus* dans d'autres régions dont l'Asie (353,354), les taux de capture utilisant ces mêmes pièges sur l'île de la Réunion sont

étonnamment relativement faibles, alors que les abondances vectorielles peuvent être très élevées (355,356). De ce fait, les entomologistes sont amenés à développer des pièges améliorés, en ajoutant du CO<sub>2</sub> où en les appâtant avec des souris (357). Finalement, des variabilités intra-espèce peuvent survenir, impliquant des comportements différents de vecteurs de la même espèce mais de régions différentes. C'est l'une des hypothèses soulevées pour expliquer la faible efficacité des pièges classiques BG-leurre avec *Aedes albopictus* évoquée ci-dessus.

Notre méthode de calcul des ratios d'abondance supposait également que les saisons pendant lesquelles les captures avaient eu lieu, au Cambodge et à La Réunion, étaient comparables. Nous avons supposé que les deux saisons (été humide, hiver sec) étaient simplement inversées, alors que la saisonnalité peut être soumise à des changements ou à des décalages d'une année sur l'autre. En effet, le pic de pluies à La Réunion observé en mai et juin 2020 a par exemple induit un pic de captures dans une saison où l'abondance vectorielle est habituellement moindre, affectant directement le ratio.

Même si la variabilité des données de piégeage a été prise en compte dans les calculs des  $R_0$ , les résultats semblent indiquer une sous-estimation des ratios d'abondance, et donc de la valeur des  $R_0$ . Pour cette raison, nous nous sommes intéressés au classement des zones selon leur rang de classement par valeur décroissante de  $R_0$ , lequel était indépendant du ratio d'abondance utilisé dans le calcul de la taille de la population de vecteurs.

Afin d'améliorer l'estimation de la population de vecteurs potentiellement actifs dans la transmission du VEJ à La Réunion, une perspective de cette étude serait d'utiliser un modèle mécanistique prédisant dans le temps et l'espace le nombre de *Culex spp.*, notamment *Culex quinquefasciatus* en fonction données météo et densité des gîtes larvaires comme cela a été réalisé pour *Aedes albopictus* à La Réunion, grâce à l'outil AlboRUN développé au Cirad (358). Il conviendrait alors d'adapter ce modèle mécanistique à la zone d'étude au Cambodge, afin de disposer de données de populations au Cambodge et à La Réunion. En effet, cela permettrait de calculer un ratio à appliquer à la population de vecteurs estimé par le modèle Cambodgien pour pouvoir calculer une population de vecteur à utiliser dans le modèle réunionnais. Finalement, le nombre réel de vecteurs d'une espèce donnée par unité de surface peut être estimé par des expériences de marquage-relâcher-recapture, qui consistent à relâcher des insectes produits en masse (généralement marqués avec des colorants fluorescents) et à extrapoler la densité de population à partir des données de recapture quotidiennes. La taille de la population sauvage

est estimée par le degré de dilution d'un nombre connu de moustiques marqués dans la population sauvage non marquée, dont le nombre est inconnu, et la mesure ultérieure du facteur de dilution par les captures (359,360).

Au-delà de la taille de la population de vecteurs, l'importance de la transmission enzootique dépend du comportement trophique du moustique pour les différentes espèces hôtes, de la disponibilité de ces espèces et de la capacité de réplication du virus chez ces espèces. Ces paramètres peuvent cependant varier d'une région à l'autre au sein d'une même espèce (d'hôtes ou de vecteurs) et, en plus d'influer sur la capturabilité des vecteurs (pour les paramètres vectoriels), peuvent impacter directement la dynamique de transmission des virus (différence de compétence vectorielle, préférences trophiques différentes d'une région à l'autre).

Dans un premier temps, car la taille de la population de vecteur estimée pour La Réunion n'impacte pas les rangs des zones, il conviendrait d'évaluer la compétence de *Culex quinquefasciatus* réunionnais pour le VEJ. La préférence trophique d'une espèce vectrice, pouvant varier selon les colonies de moustiques et donc selon les régions, est un élément essentiel dans la dynamique de transmission du VEJ au sein du système multi-hôte. Les valeurs de ces paramètres dans le modèle Réunion provenaient de l'enquête réalisée à Kandal (288). Il conviendrait ainsi d'investiguer les préférences trophiques de *Culex quinquefasciatus* à La Réunion, comme cela a déjà été réalisé pour *Aedes albopictus* (361).

Finalement, des études expérimentales ont montré que la température pouvait avoir un impact sur la compétence des vecteurs du VEJ (sur les paramètres de transmission ou le taux de piqûre par exemple), et qu'à des températures modérées, en dessous de 20°C, la dissémination du VEJ de l'intestin des vecteurs aux glandes salivaires était limitée (321,332,362). Nous n'avons pas pris en compte l'effet de la température sur la compétence vectorielle dans le modèle Cambodge car les faibles variations de température d'une saison à l'autre nous permettaient de négliger cet aspect. Pour La Réunion, et comme nous avons souhaité utiliser le même modèle, nous avons représenté l'impact de la saisonnalité, et donc de la température, sur l'abondance vectorielle (en calculant une population de vecteurs par saison) et non sur la compétence vectorielle, faisant ainsi la même hypothèse que pour le modèle Cambodge. Le fait que les élevages de porcs à La Réunion soient situés à des altitudes comparables laisse supposer des écarts de températures faibles entre les élevages. Il est toutefois possible que nous surestimions les  $R_0$  en hiver, saison pendant laquelle la compétence des

vecteurs du VEJ pourrait diminuer, mais cela n'affecterait pas les rangs des zones tampons car les élevages seraient alors à peu près tous impactés de la même manière.

D'après l'organisation du cheptel et des différentes populations d'hôtes, nous avons supposé que dans chaque zone tampon, tous les hôtes, y compris les hommes, étaient exposés de manière homogène à une seule population de vecteurs. Pour cette raison, et parce que la transmission directe entre les porcs a été négligée, il n'a pas été nécessaire de structurer la population hôte par ménages. On peut cependant supposer que les habitants, vivant à l'intérieur, seraient moins exposés que les animaux d'élevage ou les chiens. De plus, depuis le début des épidémies de dengue, des campagnes de communication visant à inciter les habitants à se protéger contre les piqûres de moustiques sont mises en place à La Réunion, ce qui pourrait également permettre de limiter l'impact du VEJ sur la santé humaine en cas d'introduction du virus (351,363). A l'inverse, les vecteurs piquant également les humains, des habitants moins exposés que les autres espèces d'hôtes, dont certains hôtes compétents, pourrait entraîner une légère augmentation de l'intensité de transmission et donc du  $R_0$  calculé.

La taille des élevages et leur localisation sont issues d'un travail de récolte de données partagées entre plusieurs organismes (GDS, Cirad, DAAF de La Réunion, coopératives). Il nous a cependant été communiqué que de nombreux élevages notamment des basse-cours de volailles n'étaient pas déclarés et donc pas recensés, sans pouvoir estimer précisément leur quantité. Les volailles étant considérées comme des hôtes compétents dans le modèle, une augmentation de leur densité pourrait augmenter l'intensité de transmission. A l'inverse, comme, selon une étude réalisée au Cambodge, la préférence trophique des *Culex spp.* pour les poulets est la plus faible de toutes les espèces d'hôtes considérées dans le modèle, une surreprésentation des volailles associée à une faible densité de porcs mais une forte densité d'hôtes non compétents pourrait diminuer l'intensité de transmission.

La Réunion possède un paysage escarpé avec un sommet central culminant à 3 074 m. On peut s'attendre à ce que l'abondance vectorielle, liée à la température, diminue avec l'altitude. Notre zone d'étude ne dépassait pas les 1000 m d'altitude et nous n'avons pas pris ce facteur en compte dans le modèle. Néanmoins, les gîtes larvaires préférentiels de *Culex quinquefasciatus*, espèce de *Culex* la plus abondante dans nos captures, sont les eaux polluées et avec présence de matières organiques et se retrouvent dans les élevages ou dans les zones de forte densité humaine. Nous avons fait l'hypothèse que la présence de gîtes larvaires dans les élevages de porcs était le principal facteur influençant la présence de *Culex spp.*

Nous avons tracé des zones tampons autour des élevages de porcs selon la distance moyenne de vol de *Culex quinquefasciatus* (304). De plus, les tailles de population par zone tampon à La Réunion ont été calculées à partir de la taille de la population de vecteurs estimées pour un village cambodgien faisant en moyenne 3 à 4 km<sup>2</sup>. Or, la distance de vol est une moyenne et peut varier. Nous avons répété l'ensemble de l'étude avec des zones tampon de 2 km de rayon. La taille de la population active de vecteur étant la même que pour les zones de 1 km de rayon, l'intensité de transmission a diminué dans l'ensemble des nouvelles zones, mais sans modifier le rang de chaque zone (Annexe 8). Cependant, des zones tampon plus grandes impliquent qu'un plus grand nombre d'entre elles se superposent, créant alors de nouveaux systèmes multi-hôtes. La transmission du VEJ pourrait alors s'effectuer d'une zone à l'autre par l'intermédiaire des vecteurs partagés entre ces zones, et s'endémiser sur un territoire plus large que ces zones tampon.

Cette étude est un travail préliminaire et nous avons dans un premier temps supposé qu'il n'y avait pas d'échange d'hôtes ou de vecteurs entre les zones tampons. A défaut d'inclure ces échanges, le modèle calcule un  $R_0$  par zone tampon considérée fermée. Pour un calcul de  $R_0$  concernant une population indemne, prendre en compte les échanges d'hôtes et de vecteurs reviendrait à remplacer des hôtes et des vecteurs infectés par des sains. Une prochaine étape serait de spatialiser ce modèle afin de modéliser la diffusion de l'EJ à partir d'un point d'introduction de vecteurs infectieux. Cette diffusion serait assurée d'une part par les vecteurs par vol actif, et d'autre part par les mouvements d'animaux compétents (porcs, volailles) infectieux. De plus, la dispersion par le vent a été observée à plusieurs reprises chez les *Culex spp.* et pourrait être un facteur de diffusion du VEJ (364–366).

Notre approche a permis de produire des résultats qualitatifs informatifs du risque d'endémisation ou d'épidémie de l'EJ à l'île de La Réunion. Modéliser la transmission d'un virus dans une région indemne mais où le risque d'introduction existe est une phase préliminaire visant à identifier si la zone d'étude est d'intérêt pour approfondir les recherches nécessaires pour et mettre en place des mesures de prévention et de contrôle, ce qui est le cas pour l'île de La Réunion.



# DISCUSSION GÉNÉRALE

## 1. Bilan

Les objectifs de cette thèse étaient, d'une part, d'améliorer la compréhension de l'épidémiologie de l'encéphalite japonaise et de ses mécanismes de transmission dans un village Cambodgien typique ainsi que l'exposition de ses habitants au VEJ, et, d'autre part d'analyser l'effet des variations du système multi-hôtes (en termes d'abondances relatives des espèces ou groupes d'espèces d'hôtes du système) sur l'intensité de transmission du virus et sur l'exposition humaine au VEJ.

Dans un contexte d'émergence et de diffusion des maladies infectieuses, notamment des arboviroses zoonotiques, l'objectif secondaire de cette thèse était d'évaluer si le VEJ pourrait circuler à l'Île de La Réunion s'il y était introduit.

Nous avons étudié l'EJ de manière holistique en modélisant la transmission du VEJ au sein d'un système multi-hôtes typique de la zone d'étude. La diversité et la composition des systèmes épidémiologiques façonnent la dynamique de transmission des pathogènes, notamment de ceux ayant un large spectre d'hôtes comme le VEJ mais également le WNV ou le virus de la FVR (7,331,367). De plus, les compositions des systèmes varient dans l'espace et dans le temps et l'étude globale de ces communautés de maintenance est nécessaires pour mieux comprendre les dynamiques de transmission et proposer des mesures de surveillance et/ou de contrôle adaptées (76). L'EJ est un bon modèle d'étude pour ces questions.

L'enquête sérologique réalisée en 2018 dans la province de Kandal nous a permis d'identifier un système multi-hôte, dans lequel le VEJ est transmis par des vecteurs du genre *Culex*, composé de porcs et de volailles comme hôtes compétents, et de chiens, de bovins et d'hommes comme hôtes non compétents. Les sérums de chiens prélevés lors d'une précédente enquête dans la même province ont en effet été également testés par l'unité de virologie de l'Institut Pasteur du Cambodge et ont permis la première mise en évidence d'une exposition des chiens au VEJ au Cambodge.

Les taux de séroprévalence des quatre espèces prélevées lors de l'enquête de terrain ainsi que les données démographiques issues de cette enquête nous ont permis de calibrer un modèle dynamique de la transmission du VEJ au sein d'un village de la province de Kandal. Ce modèle simule la transmission du VEJ dans le système multi-hôtes identifié, des hôtes compétents aux vecteurs et des vecteurs aux hôtes compétents et non compétents. Le  $R_0$  est calculé, et le modèle permet d'estimer des indicateurs de l'exposition humaine au VEJ : la probabilité annuelle d'exposition, le taux annuel d'incidence des infections ainsi que l'âge moyen à l'infection.

Dans le village modélisé, le  $R_0$  estimé était supérieur à 1 (1.35 en moyenne) et le taux d'incidence annuelle prédit était d'en moyenne 14 infections pour 1000 habitants par an. Les enfants s'infectaient très jeunes, à l'âge de 2,3 ans en moyenne. Or, les données cliniques issues du Cambodge et d'autres pays d'Asie du Sud Est montrent que les enfants sont plus sujets aux formes graves d'infection par le VEJ (27,104,320,322,323) : le modèle suggère que dans des villages cambodgiens similaires à celui étudié, l'EJ aurait un fort impact clinique. Ces estimations viennent compléter les connaissances sur l'exposition humaine, essentiellement issues de données d'incidence de cas cliniques d'EJ diagnostiqués à l'hôpital, et permettent pour la première fois de proposer une quantification de l'exposition humaine au VEJ dans un village typique de la province de Kandal où le virus circule fortement.

Les résultats de ce modèle suggèrent également que la séroprévalence canine pourrait être un bon proxy de la probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ, les chiens étant nombreux au Cambodge et vivant à proximité de l'homme.

Modifier les proportions relatives de chaque espèce ou groupe d'espèces d'hôte au sein du système épidémiologique nous a permis d'identifier des situations seuil - composition du système à partir de laquelle le  $R_0$  calculé passait en dessus ou en dessous de 1, permettant ou non la circulation du virus. Les systèmes épidémiologiques sont voués à changer, notamment pour des raisons sanitaires telles que les épidémies actuelles de peste porcine africaine en Asie qui modifient les densités de porc, ou économiques comme l'industrialisation du secteur porcin au Cambodge qui engendre une progressive disparition des petits élevages familiaux au profit des élevages industriels. Les résultats obtenus grâce à notre modèle permettent d'anticiper l'effet qu'auraient des changements du système multi-hôtes sur la transmission du VEJ.

Finalement, l'adaptation du modèle au contexte réunionnais suggère que, suite à une introduction, le VEJ pourrait s'établir et circuler dans certaines zones de l'Île de La Réunion.

## 2. Limites et perspectives

Les données disponibles ne nous permettaient pas de valider pleinement les résultats du modèle développé au Cambodge. Concernant l'impact de la composition du système épidémiologique sur l'intensité de transmission et l'exposition humaine, il conviendrait de réaliser des enquêtes sérologiques auprès des différentes espèces d'hôtes (compétents et non compétents) dans des systèmes épidémiologiques de compositions différentes de celle observée dans notre zone d'étude (par exemple avec une plus grande proportion de bovins, ou une plus faible proportion de porcs parmi les hôtes compétents), et d'observer si ces nouvelles séroprévalences correspondent aux prédictions du modèle. Un suivi de l'abondance vectorielle serait également nécessaire pour adapter le paramètre fixant la taille de la population de vecteurs (qui peut varier d'une zone à l'autre) ainsi que pour tester la validité de l'hypothèse de relation entre la taille de la population de vecteurs et la surface corporelle totale des hôtes présents dans le système. Si cette dernière hypothèse s'avérait vérifiée, cette relation pourrait par ailleurs être prise en compte dans le modèle Réunion. Concernant la possibilité d'utiliser la séroprévalence anti-VEJ canine comme proxy de la probabilité annuelle d'exposition humaine, des enquêtes approfondies dans diverses conditions environnementales devraient être menées pour confirmer ce lien et en déduire l'intérêt d'utiliser les chiens comme sentinelles de l'EJ à l'avenir. Une première étape a déjà été initiée par l'Institut Pasteur du Cambodge et le Cirad, qui organisent actuellement une enquête sérologique sur des chiens de Kandal et leurs propriétaires, visant à quantifier les prévalences d'anticorps contre trois arbovirus circulant dans la région : le virus de la dengue, le virus West-Nile et celui de l'encéphalite japonaise. L'objectif est d'explorer l'exposition à ces trois flavivirus (par mesure de la séroprévalence) et de reconstruire la probabilité annuelle d'exposition (par modélisation) chez les humains et leurs chiens vivant dans les mêmes foyers. Pour le VEJ, le protocole prévoit d'échantillonner des enfants, l'âge moyen à l'infection prédit par le modèle étant très bas (2,3 ans). Ces estimations de probabilités annuelles d'exposition permettront de confirmer, d'une part, les niveaux élevés d'exposition humaine à cette zoonose grave et, d'autre part, que la séroprévalence canine est un bon indicateur de la probabilité annuelle d'exposition humaine dans cette région. Si tel est le cas, les chiens pourraient être de bonnes sentinelles pour la surveillance de l'infection par le VEJ chez l'homme et les résultats d'enquêtes sérologiques chez le chien pourraient informer sur le niveau d'exposition des hommes, ce qui apporterait des arguments pour la mise en place de la vaccination.

Les paramètres de compétence des hôtes, dont fait partie la probabilité de transmission d'un hôte de l'espèce  $i$  à un vecteur ( $p_i$ ), provenaient d'études expérimentales réalisées dans différentes régions et impliquant souvent de faibles quantités d'animaux de laboratoire. Ces paramètres sont donc mal connus et des études de laboratoire supplémentaires de la probabilité de transmission du VEJ aux vecteurs par des animaux virémiques (suidés et oiseaux domestiques ou sauvages) permettraient d'affiner le modèle, notamment pour ce qui concerne l'avifaune sauvage, pour laquelle les études sont peu nombreuses (300) mais seraient d'intérêt dans les régions où les oiseaux sauvages sont nombreux (et où ils pourraient jouer un rôle important dans la circulation du VEJ (82)), ainsi que pour les suidés sauvages chez qui des anticorps anti-VEJ ont été détectés et qui pourraient, au même titre que l'avifaune sauvage, jouer un rôle dans la circulation de l'EJ dans les zones où leur densité est forte (368). De la même manière, peu d'études ont investigué si d'autres espèces pouvaient être compétentes pour le VEJ comme les chiens (62).

Les paramètres de compétence des vecteurs sont également mal connus et les données que nous avons utilisées dans le modèle étaient issues d'études expérimentales réalisées dans des régions différentes (88,275,276,307–309). Or, les espèces de vecteurs présentes et la compétence des vecteurs des populations correspondantes peut varier selon la région (369), et cela de manière probablement plus importante que la compétence des hôtes, notamment domestiques, qu'on peut supposer proche d'une région à l'autre puisque ces animaux sont sélectionnés et ont une diversité génétique faible. Il serait donc intéressant de tester la compétence vectorielle pour le VEJ des moustiques locaux afin d'utiliser des données spécifiques à la zone d'étude.

De la même manière, les comportements alimentaires et donc les paramètres de préférences trophiques des moustiques peuvent varier d'une région à l'autre (100,288,290,370), d'où l'importance de l'utilisation de données locales pour l'élaboration des modèles. Il conviendrait ainsi de tester les préférences trophiques dans la zone d'étude, comme l'ont fait Boyer *et al.* (2021) pour *Culex spp* au Cambodge (288) ainsi que Delatte *et al.* (2018) pour *Aedes albopictus* (361).

Des données complémentaires sur la compétence vectorielle, les préférences trophiques, ainsi que sur l'abondance des différentes espèces de vecteur du VEJ, permettraient également d'évaluer dans quelle mesure l'hypothèse simplificatrice que nous avons faite en ne considérant qu'une seule population de vecteurs (*Culex spp*) est valide, ou bien s'il serait au contraire nécessaire de prendre en compte une population pour chaque espèce de vecteurs (comme par

exemple *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex quinquefasciatus* et *Culex vishnui* au Cambodge). De plus, *Aedes albopictus*, vecteur principal de la dengue à La Réunion, a été montré expérimentalement compétent au VEJ (92,369,371). Une perspective de l'étude serait donc d'introduire cette nouvelle population de vecteurs dans le modèle.

Finalement, la variabilité des souches virales peut également affecter la compétence vectorielle, ces aspects étant probablement impliqués dans le remplacement progressif du génotype III par le génotype I, en Asie et en Australie, depuis les années 90 (372,373). En effet, des études utilisant plusieurs souches de VEJ ont montré que les virus de souches appartenant au génotype I présentaient des taux d'infection, de dissémination et de transmission plus élevés chez *Culex quinquefasciatus* (souches originaires des Etats-Unis) que les virus du génotype III, et que la période extrinsèque d'incubation était plus courte chez ces mêmes *Culex quinquefasciatus* ainsi que chez *Culex tritaeniorhynchus* (souches originaires de Chine) infectés avec des souches virales du génotype I (91,276,374). Il serait donc pertinent de prendre en compte dans le modèle le type de souche circulant localement.

Ces derniers points soulèvent la question des limites rencontrées de l'adaptation d'un modèle à une nouvelle zone d'étude indemne dans l'Océan Indien, identifiée comme étant à risque d'une introduction du VEJ.

L'abondance des vecteurs pouvant différer grandement d'une zone d'étude à une autre, il est en premier lieu nécessaire de modifier la valeur du paramètre correspondant dans le modèle, pour qu'elle soit spécifique à la nouvelle zone d'étude. Nous nous sommes basés sur des données de piégeages au Cambodge et à La Réunion, produites suivant des protocoles identiques, pour calculer un ratio à appliquer à la population de vecteurs estimée au Cambodge et d'en déduire la population de vecteurs actifs dans la transmission du VEJ à La Réunion. L'hypothèse sous-jacente était que pour un même type de piège et dans des contextes éco-climatiques comparables, la probabilité qu'un vecteur soit attiré dans le piège, *i.e.* la capturabilité des vecteurs, était la même au Cambodge et à La Réunion. Afin de tester cette hypothèse, nous avons utilisé des données de suivi annuel par piégeage produites avec deux types de pièges, au Cambodge et à La Réunion. Cependant, les calculs de ratios d'abondance ont mis en évidence que les résultats de piégeages d'une zone à l'autre n'étaient pas comparables, car la valeur des ratios, et notamment la manière dont ils variaient d'une saison

à l'autre, variait selon le type de piège considéré. Ainsi, il semble qu'à La Réunion, les systèmes de capture traditionnels présentent une efficacité moindre que dans d'autres régions comme l'Asie (357), et que la capturabilité des vecteurs peut différer d'une région à l'autre, à cause probablement de différences biologiques ou comportementales intra-espèces. L'hypothèse de capturabilité identique d'une région à l'autre n'étant pas vérifiée, les valeurs de  $R_0$  calculées par zones tampons ne sont pas directement informatives. Cependant, les rangs des zones tampons selon leur valeur de  $R_0$  ne sont pas impactés par la taille de population des vecteurs et permettent de produire des résultats qualitatifs informatifs sur les variations géographiques du risque d'endémisation ou d'épidémie de l'EJ à l'île de La Réunion.

Afin d'améliorer l'estimation de la population de vecteur dans une nouvelle zone d'étude, des données comparables entre les deux zones sont nécessaires. Des études de marquage-lâcher-recapture effectuées à protocole identique dans chaque région permettraient d'estimer une taille de population de vecteurs dans les deux régions (Cambodge et Réunion par exemple), et donc des données comparables (375,376). Dans ce cas, l'estimation de la taille de population de vecteurs ne dépendrait pas de la différence éventuelle de capturabilité des vecteurs entre les deux zones d'étude. Le rapport entre les deux tailles de populations obtenues constituerait ainsi le ratio à appliquer à la taille de population de vecteurs estimée par le modèle initial (ici, le modèle Cambodge) pour fixer la taille de la population de vecteurs à utiliser dans la nouvelle zone d'étude.

### 3. Retombées pratiques et recommandations

Les transports aériens et maritimes sont jugés en grande partie responsables de la diffusion de maladies à transmission vectorielle comme la dengue en Asie et dans l'Océan Indien, la fièvre West Nile aux Etats-Unis, Zika ou le Chikungunya à La Réunion puis en Inde (125–128,130,377). L'introduction du VEJ dans une région indemne pourrait ainsi résulter d'une introduction de vecteurs infectés (et survivant à des vols longs courriers ou à des trajets maritimes en ferrys ou cargos (129)) et/ou d'hôtes compétents infectés, même si, pour le cas de La Réunion, cette deuxième hypothèse semble moins probable car l'importation d'animaux d'élevage (porcs et volailles) vivants est interdite à La Réunion (378). Pour d'autres zones indemnes de l'océan indien, il convient néanmoins de considérer cette voie d'introduction.

Les échanges humains sont nombreux au sein de l'océan indien, et les flux commerciaux ne cessent de s'intensifier (133), et à La Réunion, les conditions semblent réunies pour justifier la crainte d'une introduction du VEJ, d'autant que d'autres arbovirus y ont déjà été introduits et ont circulé comme le virus du Chikungunya (de 2005 à 2006 (352)) ou circulent encore comme le virus de la Dengue (350) et dans une moindre mesure le virus West Nile, dont les anticorps ont été détectés chez le cheval (138). De nombreuses lignes commerciales existent entre Le Port (La Réunion), le Japon, Hong-Kong, l'Inde et l'ensemble de l'Asie du Sud Est, et assurent les importations de légumes (Chine, Inde), riz (Inde), ciment (Thaïlande) et textile (Chine) par cargo en 18 à 30 jours (132,133). Ces durées de voyage se rapprochent de la durée de vie moyenne des *Culex spp* (25 jours, (304)). En effet, une introduction du VEJ depuis une région endémique par des vecteurs infectés résulterait principalement d'une introduction de moustiques adultes, car, contrairement au virus de la dengue, la transmission transovarienne du VEJ chez ses vecteurs ne se produit que rarement (293,379,380). De plus, l'Afrique du Sud et le Kenya sont les deux principaux fournisseurs de charbon, d'hydrocarbures, et de ciment de La Réunion, et le cas autochtone détecté fortuitement en Angola soulève la question d'une possible circulation de l'EJ en Afrique (43). Finalement, l'introduction de vecteurs infectés dans une nouvelle région indemne peut également se faire par vol passif des vecteurs, transportés par le vent, qui est considéré comme l'une des causes de l'introduction du VEJ au Nord de l'Australie (vol passif de vecteurs infectés depuis la Papouasie Nouvelle Guinée (150 km)) (381). Concernant La Réunion, cette hypothèse est moins probable qu'une introduction

par les transports mais pourrait être à considérer si le virus était introduit à l'Île Maurice (à environ 200 km) voire à Madagascar (à environ 800 km).

Dans un deuxième temps, si certaines conditions sont rassemblées au point d'arrivée des vecteurs ou hôtes infectés (densités d'hôtes et de vecteurs, taux de contacts suffisants), le VEJ pourrait s'endémiser et/ou provoquer des épidémies (124,382). Les résultats de notre étude suggèrent qu'en cas d'introduction, le VEJ pourrait circuler au moins autour de certains élevages de porcs de La Réunion. Ces risques d'introduction et de circulation le cas échéant, posent le problème d'une surveillance de l'EJ à La Réunion.

De manière générale, il convient de surveiller les zones les plus à risque de permettre l'introduction du virus dans la région indemne d'une part (grands ports, aéroports), et sa circulation et sa transmission à l'homme d'autre part (cartes de  $R_0$ ). Superposer des cartes de  $R_0$  établies par exemple avec la méthode que nous avons utilisée dans cette étude avec les zones connues à risque d'introduction, les hubs aériens ou maritimes, permettrait d'identifier les zones (ou les élevages de porcs si ces zones sont établies comme dans notre étude), à surveiller en priorité. Ces études pourraient ainsi être d'intérêt pour les pouvoirs publics dont l'une des missions est de gérer le risque structurel lié à la composition des systèmes épidémiologiques afin de prévenir ou à terme contrôler les épidémies. Les cartes de  $R_0$  pourraient ainsi être utilisées comme un outil pour qualifier ce risque structurel, et mettre en place des mesures de surveillance et de contrôle ciblées. Par exemple, dans notre étude, une des zones les plus à risque de permettre une circulation du VEJ en cas d'introduction était située à quelques kilomètres du grand port maritime de La Réunion, où la densité humaine est également importante (commune du Port). Il serait probablement pertinent de mettre en place un contrôle préventif autour de cet élevage de porcs comme la destruction des gîtes larvaires au sein et autour de l'élevage pour diminuer l'abondance vectorielle, et l'installation de moustiquaires autour des enclos, voire, dans un second temps, la vaccination des porcs pour empêcher la mise en place d'un cycle de transmission. Ces mesures seraient associées à une sensibilisation des habitants à se protéger contre les piqûres de moustique, mesure déjà mise en place actuellement pour la dengue. D'autre part, une surveillance sérologique des porcs de cet élevage (tous les 6 mois par exemple), mais aussi des autres espèces présentes dans un rayon d'un ou deux kilomètres (distance de vol des vecteurs) pourrait permettre de détecter une circulation du VEJ.

Outre le risque d'introduction aux alentours des ports et des aéroports, il existe un risque de diffusion plus diffus sur l'ensemble du territoire de l'île, lié par exemple à l'importation et au transport des conteneurs, dont les destinations finales sont multiples. A La Réunion, ce risque supplémentaire justifierait d'une surveillance à plus grande échelle. Une surveillance sérologique régulière (tous les ans ou tous les 6 mois) pourrait être mise en place sur les hommes, les chiens (sentinelles potentielles) ainsi que sur les animaux d'élevages (porcs et volailles) selon les ressources disponibles afin de surveiller une éventuelle émergence du VEJ sur l'Île et, le cas échéant et dans un premier temps, mettre en place la vaccination en urgence des enfants.

L'EJ devrait également être intégrée dans le diagnostic différentiel des encéphalites humaines, ainsi que des infections à flavivirus chez l'homme comme chez l'animal.

Afin d'aller plus loin, le modèle développé pourra être utilisé pour tester des mesures de contrôle de l'EJ telles que la vaccination des porcs, celle des humains et la lutte antivectorielle (moustiquaires, destruction des gîtes larvaires), voire pour étudier le ratio coût-efficacité de ces différentes mesures. Pour cela, il conviendra de transformer ce modèle déterministe en modèle stochastique afin de permettre la représentation des phénomènes d'extinction pouvant être générés par les mesures de contrôle. Ce nouveau modèle devra également intégrer les mouvements d'animaux vivants (notamment des hôtes compétents, porcs et volailles) ainsi que la dispersion active (vol) ou passive (vent, transports) des vecteurs, pour permettre une représentation spatialisée de la circulation du VEJ. Finalement, il conviendra de préciser les systèmes d'élevage représentés dans le modèle, en introduisant par exemple la conduite en bande dans les élevages de porcs et de volailles, puisqu'elle influence la dynamique de transmission en rythmant le renouvellement des hôtes sensibles dans le système.

## 4. Conclusion

Le modèle que nous avons développé au Cambodge est à notre connaissance le premier modèle calibré sur des données de terrain représentant la transmission du VEJ dans un système multi-hôte, ainsi que proposant une quantification de l'exposition humaine au VEJ au Cambodge et suggérant que la séroprévalence anti-VEJ canine serait un bon proxy de la probabilité d'exposition humaine. Ces résultats doivent être utilisés pour intensifier la vaccination des enfants au Cambodge. Dans un second temps, la méthode suivie et développée d'adaptation du modèle à une nouvelle zone indemne a permis de mettre en évidence un risque de circulation du VEJ à La Réunion en cas d'introduction, où des mesures de surveillance et de contrôle devraient être mises en place.

Cette thèse s'insère dans une approche plus globale visant à évaluer le risque de diffusion et d'émergence des arboviroses, notamment entre l'Océan Indien et l'Asie du Sud-Est, la distribution géographique et l'impact sanitaire des zoonoses vectorielles émergentes ne cessant de croître. La méthode développée pourrait être adaptée à d'autres régions indemnes de VEJ, où un risque d'introduction associé à un risque de circulation en cas d'introduction serait identifié, mais également à d'autres arboviroses zoonotiques. Les risques de diffusion des arboviroses zoonotiques sont omniprésents comme en témoignent les événements récents (fièvre de la Vallée du Rift à Mayotte, fièvre West Nile aux Etats Unis (130,136)), et la globalisation, le réchauffement climatique ainsi que la fragmentation et la destruction des habitats sauvages engendrent la création de nouveaux systèmes multi-hôtes participant à l'émergence de nouvelles arboviroses (2,119–121,383).

## BIBLIOGRAPHIE

1. Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL, et al. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*. 2008 Feb;451(7181):990–3.
2. Smith KF, Guégan J-F. Changing Geographic Distributions of Human Pathogens. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 2010;41(1):231–50.
3. Taylor LH, Latham SM, Woolhouse ME. Risk factors for human disease emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 Jul 29;356(1411):983–9.
4. Woolhouse MEJ, Gowtage-Sequeria S. Host Range and Emerging and Reemerging Pathogens. *Emerg Infect Dis*. 2005 Dec;11(12):1842–7.
5. Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. Emerging Infectious Diseases of Wildlife-- Threats to Biodiversity and Human Health. *Science*. 2000 Jan 21;287(5452):443–9.
6. Cleaveland S, Laurenson MK, Taylor LH. Diseases of humans and their domestic mammals: pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2001 Jul 29;356(1411):991–9.
7. Roche B, Guégan J-F. Ecosystem dynamics, biological diversity and emerging infectious diseases. *C R Biol*. 2011 May;334(5):385–92.
8. Hill CA, Kafatos FC, Stansfield SK, Collins FH. Arthropod-borne diseases: vector control in the genomics era. *Nat Rev Microbiol*. 2005 Mar;3(3):262–8.
9. Lloyd-Smith JO, George D, Pepin KM, Pitzer VE, Pulliam JRC, Dobson AP, et al. Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interface. *Science*. 2009 Dec 4;326(5958):1362–7.
10. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachiery N, Beck C, Lecollinet S. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology & Infection*. 2016 Jul;144(9):1857–64.
11. Chevalier V, Reynaud P, Lefrançois T, Durand B, Baillon F, Balança G, et al. Predicting West Nile Virus Seroprevalence in Wild Birds in Senegal. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2009 Dec 1;9(6):589–96.
12. Fall AG, Diaité A, Seck MT, Bouyer J, Lefrançois T, Vachiéry N, et al. West Nile Virus Transmission in Sentinel Chickens and Potential Mosquito Vectors, Senegal River Delta, 2008–2009. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. 2013 Oct;10(10):4718–27.
13. Pepin M, Bouloy M, Bird BH, Kemp A, Paweska J. Rift Valley fever virus (Bunyaviridae: Phlebovirus): an update on pathogenesis, molecular epidemiology, vectors, diagnostics and prevention. *Vet Res*. 2010;41(6):61.
14. Rochlin I, Faraji A, Healy K, Andreadis TG. West Nile Virus Mosquito Vectors in North America. *Journal of Medical Entomology*. 2019 Oct 28;56(6):1475–90.
15. Tantely LM, Boyer S, Fontenille D. A Review of Mosquitoes Associated with Rift Valley Fever Virus in Madagascar. *Am J Trop Med Hyg*. 2015 Apr 1;92(4):722–9.
16. Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol*. 2015 Dec;15:112–8.
17. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 2015 Jul;7(7):3741–67.

18. Rückert C, Ebel GD. How Do Virus–Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? *Trends in Parasitology*. 2018 Apr 1;34(4):310–21.
19. Weger-Lucarelli J, Rückert C, Chotiwan N, Nguyen C, Garcia Luna SM, Fauver JR, et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2016;10(10).
20. Gervasi SS, Civitello DJ, Kilvitis HJ, Martin LB. The context of host competence: a role for plasticity in host-parasite dynamics. *Trends Parasitol*. 2015 Sep;31(9):419–25.
21. Roberts MG, Heesterbeek J a. P. Characterizing reservoirs of infection and the maintenance of pathogens in ecosystems. *J R Soc Interface*. 2020 Jan;17(162):20190540.
22. Haydon DT, Cleaveland S, Taylor LH, Laurenson MK. Identifying reservoirs of infection: a conceptual and practical challenge. *Emerging Infect Dis*. 2002 Dec;8(12):1468–73.
23. Viana M, Mancy R, Biek R, Cleaveland S, Cross PC, Lloyd-Smith JO, et al. Assembling evidence for identifying reservoirs of infection. *Trends Ecol Evol*. 2014 May;29(5):270–9.
24. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nat Rev Microbiol*. 2004 Oct;2(10):789–801.
25. Campbell GL, Hills SL, Fischer M, Jacobson JA, Hoke CH, Hombach JM, et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review. *Bull World Health Organ*. 2011 Oct 1;89(10):766–74, 774A-774E.
26. Fischer M, Hills S, Staples E, Johnson B, Yaich M, Solomon T. Japanese Encephalitis Prevention and Control: Advances, Challenges, and New Initiatives. *Emerging Infections* 8. 2008 Jan 1;93–124.
27. Mayxay M, Douangdala P, Vilayhong C, Phommasone K, Chansamouth V, Vongsouvath M, et al. Outcome of Japanese Encephalitis Virus (JEV) Infection in Pediatric and Adult Patients at Mahosot Hospital, Vientiane, Lao PDR. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Dec 21;
28. Ooi MH, Lewthwaite P, Lai BF, Mohan A, Clear D, Lim L, et al. The Epidemiology, Clinical Features, and Long-Term Prognosis of Japanese Encephalitis in Central Sarawak, Malaysia, 1997–2005. *Clinical Infectious Diseases*. 2008 Aug 15;47(4):458–68.
29. Ding D, Hong Z, Zhao S, Clemens JD, Zhou B, Wang B, et al. Long-Term Disability from Acute Childhood Japanese Encephalitis in Shanghai, China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2007 Sep 1;77(3):528–33.
30. Yin Z, Wang X, Li L, Li H, Zhang X, Li J, et al. Neurological Sequelae of Hospitalized Japanese Encephalitis Cases in Gansu Province, China. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2015 Jun 3;92(6):1125–9.
31. Solomon T, Dung NM, Kneen R, Gainsborough M, Vaughn DW, Khanh VT. Japanese encephalitis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*. 2000 Apr 1;68(4):405–15.
32. Chow C, Dehority W. Long-Term Outcomes in Children Surviving Tropical Arboviral Encephalitis: A Systematic Review. *J Trop Pediatr*. 2021 May 17;67(2).
33. Auerswald H, Ruget AS, Ladreyt H, In S, Mao S, Sorn S, et al. Serological evidence for Japanese encephalitis and West Nile virus infections in domestic birds in Cambodia. *Frontiers in Veterinary Science*. 2020;7:9.
34. Maeki T, Tajima S, Ikeda M, Kato F, Taniguchi S, Nakayama E, et al. Analysis of cross-reactivity between flaviviruses with sera of patients with Japanese encephalitis showed the importance of neutralization tests for the diagnosis of Japanese encephalitis. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2019 May 16;

35. Heffelfinger JD. Japanese Encephalitis Surveillance and Immunization — Asia and Western Pacific Regions, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2017;66.
36. Sawitri AAS, Yuliyatni PCD, Ariawan MD, Sari KAK, Susanti R, Sutarsa IN. Limitations of immunization registers at community health centers for measuring immunization coverage: a case study of the Japanese encephalitis mass immunization program in Bali Province, Indonesia. *Osong Public Health Res Perspect* [Internet]. 2021 Jun 2 [cited 2021 Jun 14]; Available from: <http://ophrp.org/journal/view.php?doi=10.24171/j.phrp.2020.0241>
37. MITAMURA T. Isolation of the virus of Japanese epidemic encephalitis from mosquitoes caught in nature. *Tokyo Iji Shinshi.* 1938;62:820–31.
38. Le Flohic G, Gonzalez J-P. When Japanese Encephalitis Virus Invaded Eastern Hemisphere – The History of the Spread of Virus Genotypes. In: Ruzek D, editor. *Flavivirus Encephalitis.* InTech; 2011.
39. Wang H, Liang G. Epidemiology of Japanese encephalitis: past, present, and future prospects. *Ther Clin Risk Manag.* 2015 Mar 19;11:435–48.
40. Duong V, Choeung R, Gorman C, Laurent D, Crabol Y, Mey C, et al. Isolation and full-genome sequences of Japanese encephalitis virus genotype I strains from Cambodian human patients, mosquitoes and pigs. *Journal of General Virology.* 2017;98(9):2287–96.
41. Van Den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. 2009. 17 p. (*Annual Review of Entomology*; vol. 54).
42. WHO | Estimated global incidence of Japanese encephalitis: a systematic review [Internet]. WHO. [cited 2018 Mar 6]. Available from: <http://www.who.int/bulletin/volumes/89/10/10-085233/en/>
43. Simon-Loriere E, Faye O, Prot M. Autochthonous Japanese Encephalitis with Yellow Fever Coinfection in Africa | *NEJM.* The new England journal of medicine. 2017 Apr 13;15(376).
44. Japanese encephalitis [Internet]. WHO. [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis>
45. Buescher EL, Scherer WF, McClure HE, Moyer JT, Rosenberg MZ, Yoshii M, et al. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1959 Nov 1;8(6):678–88.
46. Scherer WF, Moyer JT, Izumi T, Gresser I, McCown J. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. VI. Swine. *The American journal of tropical medicine and hygiene.* 1959;8:698–706.
47. Soman RS, Rodrigues FM, Guttikar SN, Guru PY. Experimental viraemia and transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes in ardeid birds. *Indian J Med Res.* 1977 Nov;66(5):709–18.
48. Le Flohic G, Porphyre V, Barbazan P, Gonzalez J-P. Review of Climate, Landscape, and Viral Genetics as Drivers of the Japanese Encephalitis Virus Ecology. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013 Sep 12;7(9).
49. Impoinvil DE, Baylis M, Solomon T. Japanese encephalitis: on the One Health agenda. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2013;365:205–47.
50. Scherer WF, Buescher EL, McClure HE. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan: V. Avian Factors. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1959 Nov 1;8(6):689–97.
51. Rodrigues FM, Guttikar SN, Pinto BD. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis and West Nile viruses among wild birds in the Krishna-Godavari Delta, Andhra Pradesh, India. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75(2):258–62.

52. Jamgaonkar AV, Yergolkar PN, Geevarghese G, Joshi GD, Joshi MV, Mishra AC. Serological evidence for Japanese encephalitis virus and West Nile virus infections in water frequenting and terrestrial wild birds in Kolar District, Karnataka State, India. A retrospective study. *Acta Virol.* 2003;47(3):185–8.
53. Yap G, Lim XF, Chan S, How CB, Humaidi M, Yeo G, et al. Serological evidence of continued Japanese encephalitis virus transmission in Singapore nearly three decades after end of pig farming. *Parasites & Vectors.* 2019 May 17;12(1):244.
54. Ladreyt H, Durand B, Dussart P, Chevalier V. How Central Is the Domestic Pig in the Epidemiological Cycle of Japanese Encephalitis Virus? A Review of Scientific Evidence and Implications for Disease Control. *Viruses.* 2019 Oct 15;11(10).
55. Ricklin ME, García-Nicolás O, Brechbühl D, Python S, Zumkehr B, Nougairede A, et al. Vector-free transmission and persistence of Japanese encephalitis virus in pigs. *Nature Communications.* 2016 Feb 23;7:10832.
56. Ricklin ME, García-Nicolás O, Brechbühl D, Python S, Zumkehr B, Posthaus H, et al. Japanese encephalitis virus tropism in experimentally infected pigs. *Veterinary Research.* 2016;47(1).
57. Lyons AC, Huang Y-JS, Park SL, Ayers VB, Hettenbach SM, Higgs S, et al. Shedding of Japanese Encephalitis Virus in Oral Fluid of Infected Swine. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2018;18(9):469–74.
58. Kumar K, Arshad SS, Selvarajah GT, Abu J, Toung OP, Abba Y, et al. Prevalence and risk factors of Japanese encephalitis virus (JEV) in livestock and companion animal in high-risk areas in Malaysia. *Trop Anim Health Prod.* 2018;50(4):741–52.
59. Lian WC, Liao MY, Mao CL. Diagnosis and genetic analysis of Japanese encephalitis virus infected in horses. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* 2002 Oct;49(8):361–5.
60. Gulati BR, Singha H, Singh BK, Virmani N, Kumar S, Singh RK. Isolation and genetic characterization of Japanese encephalitis virus from equines in India. *J Vet Sci.* 2012 Jun;13(2):111–8.
61. Shimoda H, Ohno Y, Mochizuki M, Iwata H, Okuda M, Maeda K. Dogs as Sentinels for Human Infection with Japanese Encephalitis Virus. *Emerg Infect Dis.* 2010 Jul;16(7):1137–9.
62. Shimoda H, Tamaru S, Morimoto M, Hayashi T, Shimojima M, Maeda K. Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs. *J Vet Med Sci.* 2011 Sep;73(9):1241–2.
63. Wang J-L, Pan X-L, Zhang H-L, Fu S-H, Wang H-Y, Tang Q, et al. Japanese Encephalitis Viruses from Bats in Yunnan, China. *Emerg Infect Dis.* 2009 Jun;15(6):939–42.
64. Kako N, Suzuki S, Sugie N, Kato T, Yanase T, Yamakawa M, et al. Japanese encephalitis in a 114-month-old cow: pathological investigation of the affected cow and genetic characterization of Japanese encephalitis virus isolate. *BMC Vet Res.* 2014 Mar 11;10:63.
65. Katayama T, Saito S, Horiuchi S, Maruta T, Kato T, Yanase T, et al. Nonsuppurative encephalomyelitis in a calf in Japan and isolation of Japanese encephalitis virus genotype 1 from the affected calf. *J Clin Microbiol.* 2013 Oct;51(10):3448–53.
66. Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, Shield J, Bailey MC, Mackenzie JS, et al. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia, 1995. *Medical Journal of Australia.* 1996;165(5):256–60.
67. Ting SHL, Tan HC, Wong WK, Ng ML, Chan SH, Ooi EE. Seroepidemiology of neutralizing antibodies to Japanese encephalitis virus in Singapore: Continued transmission despite abolishment of pig farming? *Acta Tropica.* 2004;92(3):187–91.
68. Mall MP, Kumar A, Malik SV. Sero-positivity of domestic animals against Japanese encephalitis in Bareilly area, U.P. *The Journal of communicable diseases.* 1995;27(4):242–6.

69. Sakai T, Takahashi K, Hisasue S, Horimoto M, Takizawa T. Meteorological factors involved in Japanese encephalitis virus infection in cattle. *Nihon Juigaku Zasshi*. 1990 Feb;52(1):121–7.
70. Angami K, Chakravarty SK, Das MS, Chakraborty MS, Mukherjee KK. Seroepidemiological study of Japanese encephalitis in Dimapur, Nagaland. *Journal of Communicable Diseases*. 1989;21(2):87–95.
71. Johnsen DO, Edelman R, Grossman RA, Muangman D, Pomsdhit J, Gould DJ. Study of Japanese encephalitis virus in Chiang Mai valley, Thailand V. *Animal Infections. American Journal of Epidemiology*. 1974;100(1):57–68.
72. Seong IL, Chang HK, Dong ST, Seong HK, Dong KY. Sero-survey on Aino, Akabane, Chuzan, bovine ephemeral fever and Japanese encephalitis virus of cattle and swine in Korea. *Journal of Veterinary Science*. 2007;8(1):45–9.
73. Saito M, Osa Y, Asakawa M. Antibodies to flaviviruses in wild ducks captured in Hokkaido, Japan: risk assessment of invasive flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2009 Jun;9(3):253–8.
74. Buescher EL, Scherer WF, Rosenberg MZ, Kutner LJ, McClure HE. Immunologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan: IV. Maternal Antibody in Birds. *The Journal of Immunology*. 1959 Dec 1;83(6):614–9.
75. Yang D-K, Oh Y-I, Kim H-R, Lee Y-J, Moon O-K, Yoon H, et al. Serosurveillance for Japanese encephalitis virus in wild birds captured in Korea. *J Vet Sci*. 2011 Dec;12(4):373–7.
76. Lord JS, Gurley ES, Pulliam JRC. Rethinking Japanese Encephalitis Virus Transmission: A Framework for Implicating Host and Vector Species. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2015 Dec 10;9(12):e0004074.
77. Gresser I, Hardy JL, Hu SMK, Scherer WF. Factors Influencing Transmission of Japanese B Encephalitis Virus by a Colonized Strain of *Culex tritaeniorhynchus* Giles, from Infected Pigs and Chicks to Susceptible Pigs and Birds. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1958 Jul 1;7(4):365–73.
78. Adi AAAM, Astawa N, Ayu Asri Damayanti P, Made Kardena I, Gusti Made Krisna Erawan I, Suardana IW, et al. Seroepidemiological Evidence for the Presence of Japanese Encephalitis Virus Infection in Ducks, Chickens, and Pigs, Bali-Indonesia. *Bali Medical Journal*. 2016 Nov 14;5:189.
79. Kalaiyarasu S, Mishra N, Khetan RK, Singh VP. Serological evidence of widespread West Nile virus and Japanese encephalitis virus infection in native domestic ducks (*Anas platyrhynchos* var *domesticus*) in Kuttanad region, Kerala, India. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2016 Oct 1;48:61–8.
80. Loach TR, Narayan KG, Choudhary SP. Serological evidence of persistence of Japanese encephalitis virus activity in Bihar, India. *International journal of zoonoses*. 1983;10(1):7–14.
81. Pant GR. A serological survey of pigs, horses, and ducks in Nepal for evidence of infection with Japanese encephalitis virus. *Ann N Y Acad Sci*. 2006 Oct;1081:124–9.
82. Bae W, Kim JH, Kim J, Lee J, Hwang ES. Changes of epidemiological characteristics of Japanese encephalitis viral infection and birds as a potential viral transmitter in Korea. *Journal of Korean Medical Science*. 2018;33(9).
83. Cleton NB, Bosco-Lauth A, Page MJ, Bowen RA. Age-Related Susceptibility to Japanese Encephalitis Virus in Domestic Ducklings and Chicks. *Am J Trop Med Hyg*. 2014 Feb 5;90(2):242–6.
84. Turell MJ, Mores CN, Dohm DJ, Komilov N, Paragas J, Lee JS, et al. Laboratory transmission of Japanese encephalitis and West Nile viruses by molestus form of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) collected in Uzbekistan in 2004. *J Med Entomol*. 2006 Mar;43(2):296–300.

85. Olson JG, Ksiazek TG, Tan R, Atmosoedjono S, Lee VH, Converse JD. Correlation of population indices of female *Culex tritaeniorhynchus* with Japanese encephalitis viral activity in Kapuk, Indonesia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1985 Jun;16(2):337–42.
86. Rajavel AR, Kumar NP, Natarajan R, Vanamail P, Rathinakumar A, Jambulingam P. Morphological and molecular characterization of the ecological, biological and behavioural variants of the JE vector *Culex tritaeniorhynchus*: an assessment of its taxonomic status. *J Vector Borne Dis*. 2015 Mar;52(1):40–51.
87. Lord JS, Al-Amin HM, Chakma S, Alam MS, Gurley ES, Pulliam JRC. Sampling Design Influences the Observed Dominance of *Culex tritaeniorhynchus*: Considerations for Future Studies of Japanese Encephalitis Virus Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016 Jan;10(1):e0004249.
88. Gajanana A, Rajendran R, Samuel PP, Thenmozhi V, Tsai TF, Kimura-Kuroda J, et al. Japanese encephalitis in south Arcot district, Tamil Nadu, India: a three-year longitudinal study of vector abundance and infection frequency. *J Med Entomol*. 1997 Nov;34(6):651–9.
89. Gingrich JB, Nisalak A, Latendresse JR, Pomsdhit J, Paisansilp S, Hoke CH, et al. A longitudinal study of Japanese encephalitis in suburban Bangkok, Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 1987;18(4):558–66.
90. Nyari N, Singh D, Kakkar K, Sharma S, Pandey SN, Dhole TN. Entomological and serological investigation of Japanese encephalitis in endemic area of eastern Uttar Pradesh, India. *J Vector Borne Dis*. 2015 Dec;52(4):321–8.
91. Faizah AN, Kobayashi D, Amoa-Bosompem M, Higa Y, Tsuda Y, Itokawa K, et al. Evaluating the competence of the primary vector, *Culex tritaeniorhynchus*, and the invasive mosquito species, *Aedes japonicus japonicus*, in transmitting three Japanese encephalitis virus genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020 Dec 28;14(12):e0008986.
92. de Wispelaere M, Desprès P, Choumet V. European *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* Are Competent Vectors for Japanese Encephalitis Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Jan 13;11(1).
93. Huber K, Jansen S, Leggewie M, Badusche M, Schmidt-Chanasit J, Becker N, et al. *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) from Germany have vector competence for Japan encephalitis virus but are refractory to infection with West Nile virus. *Parasitol Res*. 2014 Sep 1;113(9):3195–9.
94. Reuben R, Thenmozhi V, Samuel PP, Gajanana A, Mani TR. Mosquito blood feeding patterns as a factor in the epidemiology of Japanese encephalitis in Southern India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1992;46(6):654–63.
95. Bhattacharyya DR, Handique R, Dutta LP, Dutta P, Doloi P, Goswami BK, et al. Host feeding patterns of *Culex vishnui* sub group of mosquitoes in Dibrugarh district of Assam. *The Journal of communicable diseases*. 1994;26(3):133–8.
96. Arunachalam N, Samuel PP, Hiriyan J, Rajendran R, Dash AP. Short report: Observations on the multiple feeding behavior of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), the vector of Japanese encephalitis in Kerala in southern India. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2005;72(2):198–200.
97. Wang LY. Host preference of mosquito vectors of Japanese encephalitis. *Chinese Journal of Microbiology and Immunology*. 1975;8(4):274–9.
98. Samuel PP, Arunachalam N, Hiriyan J, Tyagi BK. Host feeding pattern of Japanese encephalitis virus vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Kuttanadu, Kerala, India. *Journal of Medical Entomology*. 2008;45(5):927–32.
99. Guo X-X, Li C-X, Wang G, Zheng Z, Dong Y-D, Zhang Y-M, et al. Host feeding patterns of mosquitoes in a rural malaria-endemic region in hainan island, china. *J Am Mosq Control Assoc*. 2014 Dec;30(4):309–11.

100. Fall AG, Diaïté A, Lancelot R, Tran A, Soti V, Etter E, et al. Feeding behaviour of potential vectors of West Nile virus in Senegal. *Parasit Vectors*. 2011 Jun 8;4:99.
101. Philip Samuel P, Arunachalam N, Hiriyan J, Tyagi BK. Host feeding pattern of Japanese encephalitis virus vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Kuttanadu, Kerala, India. *J Med Entomol*. 2008 Sep;45(5):927–32.
102. Tuno N, Tsuda Y, Takagi M. How Zoophilic Japanese Encephalitis Vector Mosquitoes Feed on Humans. *Journal of medical entomology*. 2017;54(1):8–13.
103. Chheng K, Carter MJ, Emary K, Chanpheaktra N, Moore CE, Stoesser N, et al. A prospective study of the causes of febrile illness requiring hospitalization in children in Cambodia. *PLoS ONE*. 2013;8(4):e60634.
104. Touch S, Hills S, Sokhal B, Samnang C, Sovann L, Khieu V, et al. Epidemiology and burden of disease from Japanese encephalitis in Cambodia: results from two years of sentinel surveillance. *Trop Med Int Health*. 2009 Nov;14(11):1365–73.
105. Horwood PF, Duong V, Laurent D, Mey C, Sothy H, Santy K, et al. Aetiology of acute meningoencephalitis in Cambodian children, 2010-2013. *Emerg Microbes Infect*. 2017 May 24;6(5):e35.
106. Henriksson E, Söderberg R, Ström Hallenberg G, Kroesna K, Ly S, Sear B, et al. Japanese Encephalitis in Small-Scale Pig Farming in Rural Cambodia: Pig Seroprevalence and Farmer Awareness. *Pathogens*. 2021 May 10;10(5).
107. Duong V, Sorn S, Holl D, Rani M, Deubel V, Buchy P. Evidence of Japanese encephalitis virus infections in swine populations in 8 provinces of Cambodia: Implications for national Japanese encephalitis vaccination policy. *Acta Tropica*. 2011 Oct 1;120(1):146–50.
108. Cappelle J, Duong V, Pring L, Kong L, Yakovleff M, Prasetyo DB, et al. Intensive Circulation of Japanese Encephalitis Virus in Peri-urban Sentinel Pigs near Phnom Penh, Cambodia. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2016 Dec 7;10(12):e0005149.
109. Di Francesco J, Choeung R, Peng B, Pring L, Pang S, Duboz R, et al. Comparison of the dynamics of Japanese encephalitis virus circulation in sentinel pigs between a rural and a peri-urban setting in Cambodia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2018;12(8).
110. Huynh TTT, Aarnink AJA, Drucker A, Verstegen MWA. Pig Production in Cambodia, Laos, Philippines, and Vietnam: A Review. 2002;3(1):22.
111. Knips V. Review of the livestock sector in the Mekong countries. FAO, AGAL; 2004.
112. Draaf Bretagne. L'élevage en Bretagne, hier, aujourd'hui... et demain ? 2013.
113. Domesticated animal genetic resources in Cambodia [Internet]. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2003. Available from: <http://www.fao.org/3/a1250e/annexes/CountryReports/Cambodia.pdf>
114. Luong P, Dominic S, Soun S, Sau V. The Cambodian Beef Industry. Regional Workshop on Beef markets and trade in Southeast Asian and China; 2015; Vietnam.
115. Chevalier V, Davun H, Sorn S, Ly P, Pov V, Ly S. Large scale dog population demography, dog management and bite risk factors analysis: A crucial step towards rabies control in Cambodia. *PLoS ONE*. 2021 Jul 8;16(7):e0254192.
116. Rocheleau JP, Michel P, Lindsay LR, Drebot M, Dibernardo A, Ogden NH, et al. Characterizing environmental risk factors for West Nile virus in Quebec, Canada, using clinical data in humans and serology in pet dogs. *Epidemiol Infect*. 2017;145(13):2797–807.

117. Goossens HA, van den Bogaard AE, Nohlmans MK. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. *J Clin Microbiol.* 2001 Mar;39(3):844–8.
118. Henn JB, Gabriel MW, Kasten RW, Brown RN, Theis JH, Foley JE, et al. Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a *Bartonella clarridgeiae*-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *J Clin Microbiol.* 2007 Aug;45(8):2411–8.
119. Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;951(1):13–24.
120. Hassell JM, Begon M, Ward MJ, Fèvre EM. Urbanization and Disease Emergence: Dynamics at the Wildlife–Livestock–Human Interface. *Trends in Ecology & Evolution.* 2017 Jan 1;32(1):55–67.
121. Mayi MPA, Bamou R, Djiappi-Tchamen B, Fontaine A, Jeffries CL, Walker T, et al. Habitat and Seasonality Affect Mosquito Community Composition in the West Region of Cameroon. *Insects.* 2020 May 15;11(5):E312.
122. Lounibos LP. Invasions by Insect Vectors of Human Disease. *Annu Rev Entomol.* 2002 Jan 1;47(1):233–66.
123. Samy AM, Elaagip AH, Kenawy MA, Ayres CFJ, Peterson AT, Soliman DE. Climate Change Influences on the Global Potential Distribution of the Mosquito *Culex quinquefasciatus*, Vector of West Nile Virus and Lymphatic Filariasis. *PLOS ONE.* 2016 Oct 3;11(10):e0163863.
124. Tatem AJ, Hay SI, Rogers DJ. Global traffic and disease vector dispersal. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Apr 18;103(16):6242–7.
125. Tian H, Sun Z, Faria NR, Yang J, Cazelles B, Huang S, et al. Increasing airline travel may facilitate co-circulation of multiple dengue virus serotypes in Asia. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017 Aug;11(8):e0005694.
126. Tatem AJ, Rogers DJ, Hay SI. Estimating the malaria risk of African mosquito movement by air travel. *Malar J.* 2006 Jul 14;5:57.
127. Gratz NG, Steffen R, Cocksedge W. Why aircraft disinsection? *Bull World Health Organ.* 2000;78(8):995–1004.
128. Pialoux G, Gaüzère B-A, Jauréguiberry S, Strobel M. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *Lancet Infectious Diseases.* 2007;7(5):319–27.
129. Russell RC. Survival of insects in the wheel bays of a Boeing 747B aircraft on flights between tropical and temperate airports. *Bull World Health Organ.* 1987;65(5):659–62.
130. Kilpatrick AM. Globalization, land use and the invasion of West Nile virus. *Science.* 2011 Oct 21;334(6054):323–7.
131. Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MUG, Souza R, Cunha MS, Hill SC, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science.* 2016 Apr 15;352(6283):345–9.
132. Nouvelle ligne maritime entre l'Asie et La Réunion [Internet]. SETCARGO. 2018 [cited 2021 Jul 1]. Available from: <https://www.setcargo.com/setcargo-asie-reunion/>
133. Port-Louis et Port Réunion, ports majeurs du sud-ouest de l'océan Indien — Géoconfluences [Internet]. [cited 2021 Jul 1]. Available from: <http://geoconfluences.ens-lyon.fr/doc/transv/Mobil/MobilScient5.htm>
134. Numa J-P. Océan indien : Etude géopolitique et stratégique des flux maritimes, risques et menaces. La revue géopolitique [Internet]. 2018 [cited 2018 Mar 26]; Available from: <https://www.diploweb.com/Ocean-Indien-etude-geopolitique-et-strategique-des-flux-maritimes-risques-et-menaces.html>

135. Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M-C, et al. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLOS Medicine*. 2006 May 23;3(7):e263.
136. Sissoko D, Giry C, Gabrie P, Tarantola A, Pettinelli F, Collet L, et al. Rift Valley Fever, Mayotte, 2007–2008. *Emerg Infect Dis*. 2009 Apr;15(4):568–70.
137. Larrieu S, Cardinale E, Ocquidant P, Roger M, Lepec R, Delatte H, et al. A Fatal Neuroinvasive West Nile Virus Infection in a Traveler Returning from Madagascar: Clinical, Epidemiological and Veterinary Investigations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2013 Aug 7;89(2):211–3.
138. Cardinale E, Bernard C, Lecollinet S, Rakotoharinome VM, Ravaomanana J, Roger M, et al. West Nile virus infection in horses, Indian ocean. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2017 Aug 1;53:45–9.
139. Boussès P, Dehecq JS, Brengues C, Fontenille D. Inventaire actualisé des moustiques (Diptera : Culicidae) de l'île de La Réunion, océan Indien. *Bull Soc Pathol Exot*. 2013 May 1;106(2):113–25.
140. Tantely ML, Le Goff G, Boyer S, Fontenille D. An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite*. 2016;23:20.
141. Baharuddin A, Hassan AA, Sheng GC, Nasir SB, Othman S, Yusof R, et al. Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family. *Curr Pharm Des*. 2014;20(21):3428–44.
142. Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J, Mulrow C, Gøtzsche PC, Ioannidis JPA, et al. The PRISMA Statement for Reporting Systematic Reviews and Meta-Analyses of Studies That Evaluate Health Care Interventions: Explanation and Elaboration. *PLOS Medicine*. 2009 Jul 21;6(7):e1000100.
143. Yang D-K, Kweon C-H, Kim B-H, Lim S-I, Kim S-H, Kwon J-H, et al. TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus. *J Vet Sci*. 2004 Dec;5(4):345–51.
144. Ogawa H, Taira O, Hirai T, Takeuchi H, Nagao A, Ishikawa Y, et al. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *J Virol Methods*. 2009 Sep;160(1–2):210–4.
145. Patel P, Landt O, Kaiser M, Faye O, Koppe T, Lass U, et al. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Viol J*. 2013 Feb 14;10:58.
146. Eldadah ZA, Asher DM, Godec MS, Pomeroy KL, Goldfarb LG, Feinstone SM, et al. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J Med Virol*. 1991 Apr;33(4):260–7.
147. Hierholzer JC, Killington RA. 2 - Virus isolation and quantitation. In: Mahy BW, Kangro HO, editors. *Virology Methods Manual*. London: Academic Press; 1996. p. 25–46.
148. Chernesky MA. 6 - Traditional serological tests. In: Mahy BW, Kangro HO, editors. *Virology Methods Manual*. London: Academic Press; 1996. p. 107–22.
149. Yonemitsu K, Minami S, Noguchi K, Kuwata R, Shimoda H, Maeda K. Detection of anti-viral antibodies from meat juice of wild boars. *The Journal of veterinary medical science*. 2019;81(1):155–9.
150. Scherer WF, Moyer JT, Izumi T. Immunologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. V. Maternal antibodies, antibody responses and viremia following infection of swine. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1959;83:620–6.
151. Sasaki O, Karoji Y, Kuroda A, Karaki T, Takenokuma K, Maeda O. Protection of pigs against mosquito-borne Japanese encephalitis virus by immunization with a live attenuated vaccine. *Antiviral Research*. 1982;2(6):355–60.

152. Imoto J-I, Ishikawa T, Yamanaka A, Konishi M, Murakami K, Shibahara T, et al. Needle-free jet injection of small doses of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine*. 2010;28(46):7373–80.
153. Takashima I, Watanabe T, Ouchi N, Hashimoto N. Ecological studies of Japanese encephalitis virus in Hokkaido: Interepidemic outbreaks of swine abortion and evidence for the virus to overwinter locally. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1988;38(2):420–7.
154. Hurlbut HS. The pig-mosquito cycle of Japanese encephalitis in Taiwan. *Journal of medical entomology*. 1964;1:301–7.
155. Shimizu T, Kawakami Y, Fukuhara S, Matumoto M. Experimental stillbirth in pregnant swine infected with Japanese encephalitis virus. *The Japanese journal of experimental medicine*. 1954;24(6):363–75.
156. Carey DE, Reuben R, Myers RM. Japanese encephalitis studies in Vellore, South India. V. Experimental infection and transmission. *The Indian journal of medical research*. 1969;57(2):282–9.
157. Williams DT, Daniels PW, Lunt RA, Wang L-F, Newberry KM, Mackenzie JS. Experimental infections of pigs with Japanese encephalitis virus and closely related Australian flaviviruses. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2001;65(4):379–87.
158. Park SL, Huang Y-JS, Lyons AC, Ayers VB, Hettenbach SM, McVey DS, et al. North American domestic pigs are susceptible to experimental infection with Japanese encephalitis virus. *Sci Rep*. 2018 May 21;8(1):7951.
159. Gallardo C, Soler A, Nieto R, Sánchez MA, Martins C, Pelayo V, et al. Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2015;62(6):612–22.
160. Anderson EC. African swine fever: Current concepts on its pathogenesis and immunology. *Rev sci tech Off int Epiz*. 1986;5(2):477–86.
161. Beltran-Alcrudo D, Arias M, Gallardo C, Kramer SA, Penrith M-L, Food and Agriculture Organization of the United Nations. *African swine fever: detection and diagnosis : a manual for veterinarians*. 2017.
162. Gong W, Li J, Wang Z, Sun J, Mi S, Lu Z, et al. Virulence evaluation of classical swine fever virus subtype 2.1 and 2.2 isolates circulating in China. *Vet Microbiol*. 2019 May;232:114–20.
163. Durand B, Davila S, Cariolet R, Mesplède A, Le Potier M-F. Comparison of viraemia- and clinical-based estimates of within- and between-pen transmission of classical swine fever virus from three transmission experiments. *Vet Microbiol*. 2009 Mar 30;135(3–4):196–204.
164. Ueba N, Maeda A, Otsu K, Mitsuda B, Kimoto T. Natural infection of swine by Japanese encephalitis virus and its modification by vaccination. *Biken Journal, Journal of the Research Institute for Microbial Diseases*. 1972;15(2):67–79.
165. Geevarghese G, Shaikh BH, Jacob PG, Bhat HR. Persistence of haemagglutination-inhibition antibodies to JE and WN viruses in naturally infected domestic pigs in Karnataka State, India. *Acta Virologica*. 1994;38(4):235–7.
166. Yamada M, Nakamura K, Yoshii M, Kaku Y. Nonsuppurative Encephalitis in Piglets after Experimental Inoculation of Japanese Encephalitis Flavivirus Isolated from Pigs. *Veterinary Pathology*. 2004;41(1):62–7.
167. Yamada M, Nakamura K, Yoshii M, Kaku Y, Narita M. Brain Lesions Induced by Experimental Intranasal Infection of Japanese Encephalitis Virus in Piglets. *Journal of Comparative Pathology*. 2009;141(2–3):156–62.

168. Wu R, Wang Q, Liu H, Chai C, He B, Huang X, et al. Phylogenetic analysis reveals that Japanese encephalitis virus genotype III is still prevalent in swine herds in Sichuan province in China. *Arch Virol*. 2016 Jun;161(6):1719–22.
169. Desingu PA, Ray PK, Patel BHM, Singh R, Singh RK, Saikumar G. Pathogenic and Genotypic Characterization of a Japanese Encephalitis Virus Isolate Associated with Reproductive Failure in an Indian Pig Herd. *PLoS ONE*. 2016;11(2):e0147611.
170. Yuan L, Wu R, Liu H, Wen X, Huang X, Wen Y, et al. Tissue tropism and molecular characterization of a Japanese encephalitis virus strain isolated from pigs in southwest China. *Virus Research*. 2016;215:55–64.
171. Lindahl J, Boqvist S, Ståhl K, Thu HTV, Magnusson U. Reproductive performance in sows in relation to Japanese Encephalitis Virus seropositivity in an endemic area. *Tropical Animal Health and Production*. 2012;44(2):239–45.
172. Lu B, Qin Y, Li B, He Y, Duan Q, Liang J, et al. Full-length genome sequence of Japanese encephalitis virus strain FC792, isolated from Guangxi, China. *Genome Announcements*. 2017;5(48).
173. Teng M, Luo J, Fan J-M, Chen L, Wang X-T, Yao W, et al. Molecular characterization of Japanese encephalitis viruses circulating in pigs and mosquitoes on pig farms in the Chinese province of Henan. *Virus Genes*. 2013;46(1):170–4.
174. Liu H, Lu H-J, Liu Z-J, Jing J, Ren J-Q, Liu Y-Y, et al. Japanese encephalitis virus in mosquitoes and swine in Yunnan Province, China 2009-2010. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2013;13(1):41–9.
175. Cao QS, Li XM, Zhu QY, Wang DD, Chen HC, Qian P. Isolation and molecular characterization of genotype 1 Japanese encephalitis virus, SX09S-01, from pigs in China. *Virology Journal*. 2011;8.
176. Okuno T, Mitchell CJ, Chen PS, Wang JS, Lin SY. Seasonal infection of *Culex* mosquitos and swine with Japanese encephalitis virus. *Bulletin of the World Health Organization*. 1973;49(4):347–52.
177. Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile Virus in Urine During Acute Infection. *J Infect Dis*. 2013 Oct 1;208(7):1086–92.
178. Korhonen EM, Huhtamo E, Virtala A-MK, Kantele A, Vapalahti O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *Journal of Clinical Virology*. 2014 Nov 1;61(3):353–8.
179. García-Nicolás O, Braun RO, Milona P, Lewandowska M, Dijkman R, Alves MP, et al. Targeting of the nasal mucosa by Japanese encephalitis virus for non-vector-borne transmission. *Journal of Virology*. 2018;92(24).
180. Burke DS, Tingpalapong M, Ward GS, Andre R, Leake CJ. Intense transmission of Japanese encephalitis virus to pigs in a region free of epidemic encephalitis. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. 1985;16(2):199–206.
181. Peiris JSM, Arunagiri CK, Perera LP, Ratnayake CB, Amerasinghe FP, Karunaratne SHPP, et al. Japanese encephalitis in sri lanka: Comparison of vector and virus ecology in different agro-climatic areas. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1993;87(5):541–8.
182. Zhang H, Luo H, Rehman MU, Nabi F, Li K, Lan Y, et al. Evidence of JEV in *Culex tritaeniorhynchus* and pigs from high altitude regions of Tibet, China. *Journal of Vector Borne Diseases*. 2017;54(1):69–73.
183. Hanna JN, Ritchie SA, Phillips DA, Lee JM, Hills SL, Van Den Hurk AF, et al. Japanese encephalitis in north Queensland, Australia, 1998. *Medical Journal of Australia*. 1999;170(11):533–6.
184. Higgins DA. A serological survey of pigs in Hong Kong for antibodies to Japanese encephalitis virus. *Trop Anim Health Prod*. 1970 Mar;2(1):23–7.

185. Kakkar M, Chaturvedi S, Saxena VK, Dhole TN, Kumar A, Rogawski ET, et al. Identifying sources, pathways and risk drivers in ecosystems of Japanese Encephalitis in an epidemic-prone north Indian district. *PLoS ONE*. 2017;12(5).
186. Kumari R, Kumar K, Rawat A, Singh G, Yadav NK, Chauhan LS. First indigenous transmission of Japanese Encephalitis in urban areas of National Capital Territory of Delhi, India. *Trop Med Int Health*. 2013 Jun;18(6):743–9.
187. Dutta P, Khan SA, Khan AM, Mahanta J. Japanese encephalitis B-virus among the porcine population of Assam. *Indian Veterinary Journal*. 2007;84(11):1125–7.
188. Kumanan K, Ramesh A, Velmurugan R, Jagannathan S, Padmanaban VD. Seroepidemiology of Japanese encephalitis among animals and birds in Tamil Nadu. *Indian Veterinary Journal*. 2002;79(4):311–5.
189. Damayanti PAA, Adi AAAM, Astawa INM, Sudarmaja IM, Kardena IM, Swastika IK. Incidence of Japanese encephalitis among children is associated with the presence of pigs in Bali, Indonesia. *Biomedical and Pharmacology Journal*. 2017;10(3):1333–8.
190. Detha A, Wuri DA, Santhia K. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus using competitive enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) in pigs in East Sumba, Indonesia. *Journal of Advanced Veterinary and Animal Research*. 2015;2(4):481–3.
191. Yamanaka A, Mulyatno KC, Susilowati H, Hendrianto E, Utsumi T, Amin M, et al. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2010;63(1):58–60.
192. Ohno Y, Sato H, Suzuki K, Yokoyama M, Uni S, Shibasaki T, et al. Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2009;71(8):1035–9.
193. Hamano M, Lim CK, Takagi H, Sawabe K, Kuwayama M, Kishi N, et al. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiology and Infection*. 2007;135(6):974–7.
194. Sugiyama I, Shimizu E, Nogami S, Suzuki K, Miura Y, Sentsui H. Serological survey of arthropod-borne viruses among wild boars in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2009;71(8):1059–61.
195. Nidaira M, Kyan H, Taira K, Okano S, Oshiro T, Kato T, et al. Survey of Japanese encephalitis virus in pigs and wild boars on Ishigaki and Iriomote Islands in Okinawa, Japan. *Epidemiology and Infection*. 2014;142(4):856–60.
196. Nidaira M, Taira K, Onodera I, Morikawa T, Itokazu K, Kudaka J, et al. Detection of Japanese encephalitis virus antibody in a pig on Yonaguni Island, where all pigs were slaughtered in 1997. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2007;60(1):70–1.
197. Nidaira M, Taira K, Okano S, Shinzato T, Morikawa T, Tokumine M, et al. Survey of Japanese encephalitis virus in pigs on Miyako, Ishigaki, Kume, and Yonaguni Islands in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2009;62(3):220–4.
198. Nidaira M, Taira K, Itokazu K, Kudaka J, Nakamura M, Ohno A, et al. Survey of the Antibody against Japanese encephalitis virus in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2007;60(5):309–11.
199. Nidaira M, Taira K, Itokazu K, Okano S, Kudaka J, Nakamura M, et al. Detection of Japanese encephalitis virus genome in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2008;61(2):164–5.

200. Yang D-K, Kim H-H, Hyun B-H, Lim S-I, Nam Y-K, Nah J-J, et al. Detection of neutralizing antibody against Japanese encephalitis virus in wild boars of Korea. *Journal of Bacteriology and Virology*. 2012;42(4):353–6.
201. Conlan JV, Vongxay K, Jarman RG, Gibbons RV, Lunt RA, Fenwick S, et al. Serologic study of pig-associated viral zoonoses in Laos. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;86(6):1077–84.
202. Simpson DIH, Smith CEG, de C. Marshall TF, Bright WF, Day J, McMahon DA, et al. Arbovirus infections in sarawak: The role of the domestic pig. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1976;70(1):66–72.
203. Myint L, Oo K, Hlaing W, Hlaing Myat Thu, Thant K-Z, Sein Maung Than, et al. Investigation of Japanese encephalitis virus infection in Bogalay Township, Myanmar in 1999. *Tropical Medicine*. 2000;42(2):47–52.
204. Thakur KK, Pant GR, Wang L, Hill CA, Pogranichniy RM, Manandhar S, et al. Seroprevalence of Japanese Encephalitis Virus and Risk Factors Associated with Seropositivity in Pigs in Four Mountain Districts in Nepal. *Zoonoses and Public Health*. 2012;59(6):393–400.
205. Pant GR, Lunt RA, Rootes CL, Daniels PW. Serological evidence for Japanese encephalitis and West Nile viruses in domestic animals of Nepal. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*. 2006;29(2–3):166–75.
206. See E, Tan HC, Wang D, Ooi EE, Lee M-A. Presence of hemagglutination inhibition and neutralization antibodies to Japanese encephalitis virus in wild pigs on an offshore island in Singapore. *Acta Tropica*. 2002;81(3):233–6.
207. Zhang H, Rehman MU, Li K, Luo H, Lan Y, Nabi F, et al. Epidemiologic survey of Japanese encephalitis virus infection, Tibet, China, 2015. *Emerging Infectious Diseases*. 2017;23(6):1023–4.
208. Li Y-X, Li M-H, Fu S-H, Chen W-X, Liu Q-Y, Zhang H-L, et al. Japanese encephalitis, Tibet, China. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(5):934–6.
209. Ruget A-S, Beck C, Gabassi A, Trevennec K, Lecollinet S, Chevalier V, et al. Japanese encephalitis circulation pattern in swine of northern Vietnam and consequences for swine's vaccination recommendations. *Transboundary and Emerging Diseases*. 2018;65(6):1485–92.
210. Tien TV, Nguyen HT, Mam VS, Nga PT, Igarashi A. Prevention of Japanese Encephalitis (JE) by “BIKEN” vaccine and epidemiological survey on JE in Dong Anh District, Hanoi, Vietnam. *Tropical Medicine*. 1991;33(4):83–91.
211. Do QH, Vu TQH, Huynh TKL, Dinh QT, Deubel V. Current situation of Japanese encephalitis in the south of Vietnam, 1976-1992. *Tropical Medicine*. 1994;36(4):202–14.
212. Phan Thi Nga, Le Kim Phuong, Vu Sinh Nam, Nguyen Thu Yen, Tran Van Tien, Huynh Phuong Lien. Transmission of Japanese encephalitis (JE) virus in Gia Luong District, Ha Bac Province, Vietnam, after JE vaccination, 1993 - 1994. *Tropical Medicine*. 1995;37(4):129–34.
213. Lindahl J, Ståhl K, Chirico J, Boqvist S, Thu HTV, Magnusson U. Circulation of Japanese Encephalitis Virus in Pigs and Mosquito Vectors within Can Tho City, Vietnam. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2013;7(4).
214. Chan IP. Investigation of the HI titre of Japanese encephalitis of swine on Taiwan, Republic of China. *Bulletin de l'Office International des Epizooties*. 1968;69(1):141–3.
215. Borah J, Dutta P, Khan SA, Mahanta J. Epidemiological concordance of Japanese encephalitis virus infection among mosquito vectors, amplifying hosts and humans in India. *Epidemiology and Infection*. 2013;141(1):74–80.

216. Yamamoto HA, Ishida N, Akiyama K, Shiratori T, Konno J. Epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus spread from mosquitoes to pigs through 5 years. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 1970;23(2):75–85.
217. Maeda O, Karaki T, Kuroda A, Sasaki O, Karoji Y, Takenokuma K. Epidemiological studies on Japanese encephalitis in Kyoto city area, Japan III. Seasonal prevalence of virus infections in several pig populations shown by virus recovery from engorged *Culex tritaeniorhynchus summorosus*. *Japanese Journal of Medical Science and Biology*. 1978;31(3):277–90.
218. Konno J, Endo K, Agatsuma H, Ishida N. Cyclic outbreaks of Japanese encephalitis among pigs and humans. *American Journal of Epidemiology*. 1966 Sep;84(2):292–300.
219. Ura M. Ecology of Japanese encephalitis virus in Okinawa, Japan. II. Regional particularity of the virus dissemination in Okinawa island from 1966 to 1976. *Tropical Medicine*. 1976;18(4):165–78.
220. Nitatpattana N, Le Flohic G, Thongchai P, Nakgoi K, Palaboodeewat S, Khin M, et al. Elevated Japanese encephalitis virus activity monitored by domestic sentinel piglets in Thailand. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2011;11(4):391–4.
221. Van Peenen PFD, Joseph PL, Atmosoedjono S, Irsiana R, Saroso JS. Japanese encephalitis virus from pigs and mosquitoes in Jakarta, Indonesia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1975;69(5–6):477–9.
222. Makino Y, Saito M, Phommasack B, Vongxay P, Kanemura K, Pothawan T, et al. Arbovirus infections in pilot areas in Laos. *Tropical Medicine*. 1994;36(4):131–9.
223. Yoshikawa A, Nabeshima T, Inoue S, Agoh M, Morita K. Molecular and serological epidemiology of Japanese encephalitis virus (JEV) in a remote Island of Western Japan: An implication of JEV migration over the East China Sea. *Tropical Medicine and Health*. 2016;44(1).
224. Ura M. Ecology of Japanese encephalitis virus in Okinawa, Japan. I. The investigation on pig and mosquito infection of the virus in Okinawa island from 1966 to 1976. *Tropical Medicine*. 1976;18(4):151–63.
225. Grossman RA, Edelman R, Gould DJ. Study of Japanese encephalitis virus in Chiang Mai valley, Thailand VI. Summary and conclusions. *American Journal of Epidemiology*. 1974;100(1):69–76.
226. Hasegawa M, Tuno N, Yen NT, Nam VS, Takagi M. Influence of the distribution of host species on adult abundance of Japanese encephalitis vectors *Culex vishnui* subgroup and *Culex gelidus* in a rice-cultivating village in northern Vietnam. *Am J Trop Med Hyg*. 2008 Jan;78(1):159–68.
227. Ohba S-Y, Huynh TTT, Le LL, Ngoc HT, Le Hoang S, Takagi M. Mosquitoes and Their Potential Predators In Rice Agroecosystems of the Mekong Delta, Southern Vietnam. *Journal of the American Mosquito Control Association*. 2011 Dec 1;27(4):384–92.
228. Ohba S, Van Soai N, Van Anh DT, Nguyen YT, Takagi M. Study of mosquito fauna in rice ecosystems around Hanoi, Northern Vietnam. *Acta Tropica*. 2015 Feb 1;142:89–95.
229. Murty US, Rao MS, Arunachalam N. The effects of climatic factors on the distribution and abundance of Japanese encephalitis vectors in Kurnool district of Andhra Pradesh, India. *J Vector Borne Dis*. 2010 Mar;47(1):26–32.
230. Self LS, Shin HK, Kim KH, Lee KW, Chow CY, Hong HK. Ecological studies on *Culex tritaeniorhynchus* as a vector of Japanese encephalitis. *Bull World Health Organ*. 1973;49(1):41–7.
231. Sudeep AB. *Culex gelidus*: an emerging mosquito vector with potential to transmit multiple virus infections. *J Vector Borne Dis*. 2014 Dec;51(4):251–8.
232. Rosen L. The natural history of Japanese encephalitis virus. *Annual review of microbiology*. 1986;40:395–414.

233. Keiser J, Maltese MF, Erlanger TE, Bos R, Tanner M, Singer BH, et al. Effect of irrigated rice agriculture on Japanese encephalitis, including challenges and opportunities for integrated vector management. *Acta Tropica*. 2005;95(1):40–57.
234. McArthur MA, Holbrook MR. Japanese Encephalitis Vaccines. *Journal of Bioterrorism & Biodefense*. 2011;01(01).
235. Yun S-I, Lee Y-M. Japanese encephalitis. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. 2014 Feb 1;10(2):263–79.
236. Konishi E, Yamaoka M, Kurane I, Mason PW. Japanese encephalitis DNA vaccine candidates expressing pre-membrane and envelope genes induce virus-specific memory B cells and long-lasting antibodies in swine. *Virology*. 2000;268(1):49–55.
237. García-Nicolás O, Ricklin ME, Liniger M, Vielle NJ, Python S, Souque P, et al. A Japanese encephalitis virus vaccine inducing antibodies strongly enhancing in vitro infection is protective in pigs. *Viruses*. 2017;9(5).
238. Daniels PT. Arboviruses of veterinary significance in the Asia-Western Pacific Region, such as Japanese encephalitis virus. In 2003.
239. Seo H-J, Kim HC, Klein TA, Ramey AM, Lee J-H, Kyung S-G, et al. Molecular Detection and Genotyping of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes during a 2010 Outbreak in the Republic of Korea. *PLOS ONE*. 2013 Feb 4;8(2):e55165.
240. Nah J-J, Yang D-K, Kim H-H, Song J-Y. The present and future of veterinary vaccines for Japanese encephalitis in Korea. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 2015 Jul 1;4(2):130–6.
241. Hsu ST, Chang LC, Lin SY, Chuang TY, Ma CH, Inoue YK, et al. The effect of vaccination with a live attenuated strain of Japanese encephalitis virus on stillbirths in swine in Taiwan. *Bulletin of the World Health Organization*. 1972;46(4):465–71.
242. Ogata M, Nagao Y, Kikui R, Kitamura N, Ariyasu H. Effect of complete adjuvant on vaccination of live attenuated Japanese encephalitis vaccine to swine for preventing viremia. 39. *Epidemiological studies of J.E. Acta medica Okayama*. 1971;25(1):71–5.
243. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 1958 Sep;7(5):561–73.
244. Beck C, Lowenski S, Durand B, Bahuon C, Zientara S, Lecollinet S. Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2017 Sep 15;11(9).
245. Kuno G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv Virus Res*. 2003;61:3–65.
246. Jain P, Jain A, Kumar A, Prakash S, Khan DN, Singh KP, et al. Epidemiology and Etiology of Acute Encephalitis Syndrome in North India. *Japanese Journal of Infectious Diseases*. 2014;67(3):197–203.
247. Sadones H, Reynes J-M, Ong S, Grosjean P, Yim C, Reynes J-M, et al. Etiology of encephalitis syndrome among hospitalized children and adults in Takeo, Cambodia, 1999-2000. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2002 Feb 1;66(2):200–7.
248. Cao L, Fu S, Lu Z, Tang C, Gao X, Li X, et al. Detection of West Nile Virus Infection in Viral Encephalitis Cases, China. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2019 Jan;19(1):45–50.
249. Chang KJ. Studies on the serological cross-reaction between dengue and Japanese encephalitis. *Zhonghua Minguo wei sheng wu ji mian yi xue za zhi = Chinese journal of microbiology and immunology*. 1997;30(4):207–18.

250. Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*. 1989 Jan;70 ( Pt 1):37–43.
251. Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT, Smith DJ, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *Journal of General Virology*. 2011;92(12):2821–9.
252. Goverdhan MK, Kulkarni AB, Gupta AK, Tupe CD, Rodrigues JJ. Two-way cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in bonnet macaques. *Acta Virol*. 1992 May;36(3):277–83.
253. Nemeth NM, Bosco-Lauth AM, Bowen RA. Cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in red-winged blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Avian Dis*. 2009 Sep;53(3):421–5.
254. Dhanda V, Banerjee K, Deshmukh PK, Ilkal MA. Experimental viraemia and transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes in domestic ducks. *Indian Journal of Medical Research*. 1977;66(6):881–8.
255. Frantz L, Meijaard E, Gongora J, Haile J, Groenen MAM, Larson G. The Evolution of Suidae. *Annu Rev Anim Biosci*. 2016;4:61–85.
256. Nitatpattana N, Apiwathnasorn C, Barbazan P, Leemingsawat S, Yoksan S, Gonzalez JLZ. First isolation of Japanese encephalitis from *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*. 2005;36(4):875–8.
257. Thi-Kim-Thoa N, Ngo-Thi-Vien null, Tran-Tuyet-Mai null, Thi-Ngoc-Xuan N. Japanese encephalitis vectors: isolation of virus from culicine mosquitoes in the Saigon area. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*. 1974 Sep;5(3):408–12.
258. Lindahl J, Chirico J, Boqvist S, Thu HTV, Magnusson U. Occurrence of Japanese encephalitis virus mosquito vectors in relation to urban pig holdings. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2012;87(6):1076–82.
259. Diallo AOI, Chevalier V, Cappelle J, Duong V, Fontenille D, Duboz R. How much does direct transmission between pigs contribute to Japanese Encephalitis virus circulation? A modelling approach in Cambodia. *PLoS ONE*. 2018;13(8):e0201209.
260. Zhao S, Lou Y, Chiu APY, He D. Modelling the skip-and-resurgence of Japanese encephalitis epidemics in Hong Kong. *Journal of Theoretical Biology*. 2018;454:1–10.
261. Sunwoo J-S, Jung K-H, Lee S-T, Lee SK, Chu K. Reemergence of Japanese Encephalitis in South Korea, 2010–2015. *Emerg Infect Dis*. 2016 Oct;22(10):1841–3.
262. Tandale BV, Khan SA, Kushwaha KP, Rahman H, Gore MM, Sapkal GN, et al. Effectiveness of Japanese encephalitis SA 14-14-2 live attenuated vaccine among Indian children: Retrospective 1:4 matched case-control study. *Journal of Infection and Public Health*. 2018 Sep 1;11(5):713–9.
263. Khan SU, Salje H, Hannan A, Islam MA, Bhuyan AAM, Islam MA, et al. Dynamics of Japanese encephalitis virus transmission among pigs in Northwest Bangladesh and the potential impact of pig vaccination. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014 Sep;8(9):e3166.
264. Kwon HJ, Kang BJ, Lim YM, Lee CK. Studies on Japanese encephalitis live vaccine. II. Development of an attenuated strain of virus (Anyang strain). *Res Rep Off Rural Dev*. 1975;
265. Chen Y-Y, Fan Y-C, Tu W-C, Chang R-Y, Shih C-C, Lu I-H, et al. Japanese encephalitis virus genotype replacement, Taiwan, 2009-2010. *Emerging Infectious Diseases*. 2011;17(12):2354–6.
266. Schuh AJ, Ward MJ, Leigh Brown AJ, Barrett ADT. Dynamics of the emergence and establishment of a newly dominant genotype of Japanese encephalitis virus throughout Asia. *J Virol*. 2014 Apr;88(8):4522–32.

267. Cao L, Fu S, Gao X, Li M, Cui S, Li X, et al. Low Protective Efficacy of the Current Japanese Encephalitis Vaccine against the Emerging Genotype 5 Japanese Encephalitis Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004686.
268. Tajima S, Yagasaki K, Kotaki A, Tomikawa T, Nakayama E, Moi ML, et al. In vitro growth, pathogenicity and serological characteristics of the Japanese encephalitis virus genotype V Muar strain. *J Gen Virol*. 2015 Sep;96(9):2661–9.
269. Oliveira ARS, Cohnstaedt LW, Cernicchiaro N. Japanese Encephalitis Virus: Placing Disease Vectors in the Epidemiologic Triad. *Ann Entomol Soc Am*. 2018 Oct 31;111(6):295–303.
270. Diallo AO, Chevalier V, Cappelle J, Duboz R, Didier F, Benoit D. Modelling and assessment of combining gilt vaccination, vector control and pig herd management to control Japanese Encephalitis virus transmission in Southeast Asia. *Plos Neglected Tropical Diseases Preprint [Internet]*. 2018 Sep 28 [cited 2019 Aug 30]; Available from: <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/430231>
271. Ben-Dov E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and its dipteran-specific toxins. *Toxins (Basel)*. 2014 Mar 28;6(4):1222–43.
272. Wiwattanawanichakun P, Ratwatthananon A, Poonsri W, Yooboon T, Pluempanupat W, Piyasaengthong N, et al. The Possibility of Using Isolated Alkaloid Compounds and Crude Extracts of *Piper retrofractum* (Piperaceae) as Larvicidal Control Agents for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Larvae. *J Med Entomol*. 2018 Aug 29;55(5):1231–6.
273. Govindarajan M, Vaseeharan B, Alharbi NS, Kadaikunnan S, Khaled JM, Al-Anbr MN, et al. High efficacy of (Z)- $\gamma$ -bisabolene from the essential oil of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) as larvicide and oviposition deterrent against six mosquito vectors. *Environ Sci Pollut Res Int*. 2018 Apr;25(11):10555–66.
274. Dutta P, Khan SA, Khan AM, Borah J, Sarmah CK, Mahanta J. The effect of insecticide-treated mosquito nets (ITMNs) on Japanese encephalitis virus seroconversion in pigs and humans. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2011;84(3):466–72.
275. Di D, Li C, Zhang J, Hameed M, Wang X, Xia Q, et al. Experimental Infection of Newly Hatched Domestic Ducklings via Japanese Encephalitis Virus-Infected Mosquitoes. *Pathogens*. 2020 May;9(5):371.
276. Karna AK, Bowen RA. Experimental Evaluation of the Role of Ecologically-Relevant Hosts and Vectors in Japanese Encephalitis Virus Genotype Displacement. *Viruses*. 2019 Jan;11(1):32.
277. Xiao C, Wang X, Cui G, Pang L, Xu J, Li C, et al. Possible pathogenicity of Japanese encephalitis virus in newly hatched domestic ducklings. *Vet Microbiol*. 2018 Dec;227:8–11.
278. Xiao C, Li C, Di D, Cappelle J, Liu L, Wang X, et al. Differential replication efficiencies between Japanese encephalitis virus genotype I and III in avian cultured cells and young domestic ducklings. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018 Dec 18;12(12):e0007046.
279. Ladreyt H, Auerswald H, Tum S, Ken S, Heng L, In S, et al. Comparison of Japanese Encephalitis Force of Infection in Pigs, Poultry and Dogs in Cambodian Villages. *Pathogens*. 2020 Sep;9(9):719.
280. Nemeth NM, Bowen RA. Dynamics of passive immunity to West Nile virus in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Am J Trop Med Hyg*. 2007 Feb;76(2):310–7.
281. OIE. Use of Animals in Research and Education. In: *OIE Terrestrial Animal Health Code 2019*. 2019.
282. Fox-Lewis A, Hopkins J, Sar P, Sao S, Pheaktra N, Day NPJ, et al. Seroprevalence of Dengue Virus and Rickettsial Infections in Cambodian Children. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;100(3):635–8.
283. Ly S, Fortas C, Duong V, Benmarhnia T, Sakuntabhai A, Paul R, et al. Asymptomatic Dengue Virus Infections, Cambodia, 2012–2013. *Emerging Infect Dis*. 2019;25(7):1354–62.

284. Auerswald H, de Jesus A, Seixas G, Nazareth T, In S, Mao S, et al. First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. *Parasit Vectors* [Internet]. 2019 Mar 13 [cited 2020 Mar 29];12. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6417143/>
285. The R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing; 2020.
286. Lindstedt SL. *Allometry: Body Size Constraints in Animal Design* [Internet]. National Academies Press (US); 1987 [cited 2020 May 4]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK218080/>
287. Mackenzie JS, Williams DT, Smith DW. Japanese Encephalitis Virus: The Geographic Distribution, Incidence, and Spread of a Virus with a Propensity to Emerge in New Areas. In: Tabor E, editor. *Perspectives in Medical Virology* [Internet]. Elsevier; 2006 [cited 2018 Oct 12]. p. 201–68. (Emerging Viruses in Human Populations; vol. 16). Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168706906160103>
288. Boyer S, Durand B, Yean S, Brengues C, Maquart P-O, Fontenille D, et al. Host-Feeding Preference and Diel Activity of Mosquito Vectors of the Japanese Encephalitis Virus in Rural Cambodia. *Pathogens*. 2021 Mar;10(3):376.
289. Yeo G, Chan S, How CB, Humaidi M, Lim XF, Mailepessov D, et al. Molecular Analysis of the Bloodmeals of *Culex* spp. Mosquitoes at Natural Habitats in Singapore to Investigate the Potential Risk of Japanese Encephalitis Virus and West Nile Virus Transmission. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 2020 Jun 16;20(9):703–14.
290. Mwandawiro C, Boots M, Tuno N, Suwonkerd W, Tsuda Y, Takagi M. Heterogeneity in the host preference of Japanese encephalitis vectors in Chiang Mai, northern Thailand. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 2000;94(3):238–42.
291. Keeling MJ, Rohani P. *Modeling Infectious Diseases in Humans and Animals*. Princeton University Press. 2007.
292. Boyer S, Peng B, Pang S, Chevalier V, Duong V, Gorman C, et al. Dynamics and diversity of mosquito vectors of Japanese encephalitis virus in Kandal province, Cambodia. *Journal of Asia-Pacific Entomology*. 2020 Dec 1;23(4):1048–54.
293. Rosen L, Lien JC, Shroyer DA, Baker RH, Lu LC. Experimental vertical transmission of Japanese encephalitis virus by *Culex tritaeniorhynchus* and other mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*. 1989 May;40(5):548–56.
294. Fischer EAJ, Boender G-J, Nodelijk G, de Koeijer AA, van Roermund HJW. The transmission potential of Rift Valley fever virus among livestock in the Netherlands: a modelling study. *Vet Res*. 2013 Jul 22;44:58.
295. Life expectancy at birth, total (years) - Cambodia | Data [Internet]. [cited 2021 Mar 31]. Available from: <https://data.worldbank.org/indicator/SP.DYN.LE00.IN?locations=KH>
296. Adimy M, Mancera PFA, Rodrigues DS, Santos FLP, Ferreira CP. Maternal Passive Immunity and Dengue Hemorrhagic Fever in Infants. *Bull Math Biol*. 2020 Jan 28;82(2):24.
297. Capeding RZ, Brion JD, Caponpon MM, Gibbons RV, Jarman RG, Yoon I-K, et al. The Incidence, Characteristics, and Presentation of Dengue Virus Infections during Infancy. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2010 Feb 5;82(2):330–6.
298. Horimoto M, Sakai T. Maternally derived antibodies to Japanese encephalitis virus in cattle. *Kansenshogaku Zasshi*. 1990 Sep;64(9):1205–8.
299. Chastant S, Mila H. Passive immune transfer in puppies. *Anim Reprod Sci*. 2019 Aug;207:162–70.

300. Nemeth N, Bosco-Lauth A, Oesterle P, Kohler D, Bowen R. North American Birds as Potential Amplifying Hosts of Japanese Encephalitis Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Oct 3;87(4):760–7.
301. Ilkal MA, Dhanda V, Rao BU, George S, Mishra AC, Prasanna Y, et al. Absence of viraemia in cattle after experimental infection with Japanese encephalitis virus. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988;82(4):628–31.
302. Edelman R, Schneider RJ, Vejjajiva A, Pornpibul R, Voodhikul P. Persistence of Virus-Specific IgM and Clinical Recovery after Japanese Encephalitis. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1976 Sep 1;25(5):733–8.
303. Prince HE, Tobler LH, Yeh C, Geftner N, Custer B, Busch MP. Persistence of West Nile virus-specific antibodies in viremic blood donors. *Clin Vaccine Immunol.* 2007 Sep;14(9):1228–30.
304. Subra R. Biology and control of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say, 1823 (Diptera, Culicidae) with special reference to Africa. *Int J Trop Insect Sci.* 1981 Dec;1(04):319–38.
305. Birley MH, Rajagopalan PK. Estimation of the survival and biting rates of *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 1981 Jun;18(3):181–6.
306. Madder DJ, Surgeoner GA, Helson BV. Number of generations, egg production, and developmental time of *Culex pipiens* and *Culex restauns* (Diptera: Culicidae) in southern Ontario. *J Med Entomol.* 1983 May 26;20(3):275–87.
307. Chapman GE, Sherlock K, Hesson JC, Blagrove MSC, Lycett GJ, Archer D, et al. Laboratory transmission potential of British mosquitoes for equine arboviruses. *Parasit Vectors.* 2020 Aug 12;13(1):413.
308. van den Hurk AF, Nisbet DJ, Hall RA, Kay BH, MacKenzie JS, Ritchie SA. Vector competence of Australian mosquitoes (Diptera: Culicidae) for Japanese encephalitis virus. *J Med Entomol.* 2003 Jan;40(1):82–90.
309. Gould DJ, Barnett HC, Suyemoto W. TRANSMISSION OF JAPANESE ENCEPHALITIS VIRUS BY *CULEX GELII*US THEOBALD. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 1962;56(5).
310. van den Driessche P, Watmough J. Reproduction numbers and sub-threshold endemic equilibria for compartmental models of disease transmission. *Mathematical Biosciences.* 2002 Nov 1;180(1):29–48.
311. Viennet E, Garros C, Gardès L, Rakotoarivony I, Allène X, Lancelot R, et al. Host preferences of Palaearctic *Culicoides* biting midges: implications for transmission of orbiviruses. *Medical and Veterinary Entomology.* 2013;27(3):255–66.
312. Wang J, Hihara E. A unified formula for calculating body surface area of humans and animals. *Eur J Appl Physiol.* 2004 Jun;92(1–2):13–7.
313. Seamans TW, Hamershock DW, Bernhardt GE. Determination of body density for twelve bird species. *Ibis.* 1995;137(3):424–8.
314. Haycock GB, Schwartz GJ, Wisotsky DH. Geometric method for measuring body surface area: a height-weight formula validated in infants, children, and adults. *J Pediatr.* 1978 Jul;93(1):62–6.
315. Morris MD. Factorial Sampling Plans for Preliminary Computational Experiments. null. 1991 May 1;33(2):161–74.
316. Ma'roef CN, Dhenni R, Megawati D, Fadhilah A, Lucanus A, Artika IM, et al. Japanese encephalitis virus infection in non-encephalitic acute febrile illness patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Jul;14(7):e0008454.
317. Paul KK, Sazzad HMS, Rahman M, Sultana S, Hossain MJ, Ledermann JP, et al. Hospital-based surveillance for Japanese encephalitis in Bangladesh, 2007–2016: Implications for introduction of

immunization. *International Journal of Infectious Diseases* [Internet]. 2020 Jul 25 [cited 2020 Aug 4]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1201971220305701>

318. Turner P, Suy K, Tan LV, Sar P, Miliya T, Hong NTT, et al. The aetiologies of central nervous system infections in hospitalised Cambodian children. *BMC Infect Dis*. 2017 29;17(1):806.
319. Tarantola A, Goutard F, Newton P, Lamballerie X de, Lortholary O, Cappelle J, et al. Estimating the Burden of Japanese Encephalitis Virus and Other Encephalitides in Countries of the Mekong Region. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2014 Jan 30;8(1):e2533.
320. Mao X, Zhou H. The spatiotemporal distribution of Japanese Encephalitis cases in Yunnan Province, China, from 2007 to 2017. *PLOS ONE*. 2020 Apr 14;15(4):e0231661.
321. Tian H-Y, Bi P, Cazelles B, Zhou S, Huang S-Q, Yang J, et al. How environmental conditions impact mosquito ecology and Japanese encephalitis: An eco-epidemiological approach. *Environment International*. 2015;79:17–24.
322. Montini Maluda MC, Jelip J, Ibrahim MY, Suleiman M, Jeffree MS, Binti Aziz AF, et al. Nineteen Years of Japanese Encephalitis Surveillance in Sabah, Malaysian Borneo. *Am J Trop Med Hyg*. 2020 Jun 8;
323. Wangchuk S, Tamang TD, Darnal JB, Pelden S, Lhazeen K, Mynak ML, et al. Japanese Encephalitis Virus as Cause of Acute Encephalitis, Bhutan. *Emerg Infect Dis*. 2020 Sep;26(9):2239–42.
324. Mighell E, Ward MP. African Swine Fever spread across Asia, 2018–2019. *Transboundary and Emerging Diseases* [Internet]. 2021 [cited 2021 Mar 31]; Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tbed.14039>
325. Woonwong Y, Do Tien D, Thanawongnuwech R. The Future of the Pig Industry After the Introduction of African Swine Fever into Asia. *Animal Frontiers*. 2020 Oct 30;10(4):30–7.
326. AGAL. Livestock sector brief INDIA. FAO; 2005.
327. Tapaswi PK, Ghosh AK, Mukhopadhyay BB. Transmission of Japanese Encephalitis in a 3-population model. *Ecological Modelling*. 1995 Dec 15;83(3):295–309.
328. Panja P, Mondal SK, Chattopadhyay J. Stability and bifurcation analysis of Japanese encephalitis model with/without effects of some control parameters. *Comp Appl Math*. 2018 May 1;37(2):1330–51.
329. Ghosh AK, Tapaswi PK. Dynamics of Japanese encephalitis--a study in mathematical epidemiology. *IMA J Math Appl Med Biol*. 1999 Mar;16(1):1–27.
330. Zahid MH, Kribs CM, Zahid MH, Kribs CM. Impact of cattle on joint dynamics and disease burden of Japanese encephalitis and leptospirosis. *MBE*. 2021;18(4):3046–72.
331. Cecilia H, Métras R, Fall AG, Lo MM, Lancelot R, Ezanno P. It's risky to wander in September: Modelling the epidemic potential of Rift Valley fever in a Sahelian setting. *Epidemics*. 2020 Dec 1;33:100409.
332. Takahashi M. The effects of environmental and physiological conditions of *Culex tritaeniorhynchus* on the pattern of transmission of Japanese encephalitis virus. *J Med Entomol*. 1976 Dec 8;13(3):275–84.
333. Lin C-L, Chang H-L, Lin C-Y, Chen K-T. Seasonal Patterns of Japanese Encephalitis and Associated Meteorological Factors in Taiwan. *Int J Environ Res Public Health*. 2017 Oct 29;14(11).
334. Agreste. Filière volaille [Internet]. DAAF de La Réunion; 2019. Available from: <http://sg-proxy02.maaf.ate.info/IMG/pdf/R97419A07.pdf>
335. Agreste. Filière porcine [Internet]. DAAF de La Réunion; 2019. Available from: [https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/5-\\_FICHE\\_FILIERE\\_PORCINE\\_cle87d8da.pdf](https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/5-_FICHE_FILIERE_PORCINE_cle87d8da.pdf)

336. Ladreyt H, Chevalier V, Durand B. Modelling Japanese Encephalitis Virus transmission dynamics and human exposure in a Cambodian rural multi-host system. PLOS Neglected Tropical Diseases. submitted.
337. Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O, Sall AA. Vector Competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2014 Apr 2;90(4):747–54.
338. Nikolay B, Diallo M, Faye O, Boye CS, Sall AA. Vector Competence of *Culex neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2012 Jun 1;86(6):993–6.
339. La Chambre d'Agriculture de La Réunion - [www.reunion.chambagri.fr](http://www.reunion.chambagri.fr) - Ile de La Réunion [Internet]. [cited 2018 Mar 30]. Available from: <http://www.reunion.chambagri.fr/spip.php?rubrique57>
340. EPLEFPA, CFPPA. L'ERRANCE DES CARNIVORES DOMESTIQUES À LA RÉUNION 2017 - 2018 RÉSUMÉ DE L'ÉTUDE [Internet]. Available from: [https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/EPLEFPA\\_CFPPA\\_de\\_Saint-Paul\\_resume\\_etude\\_sur\\_l\\_errance\\_animale\\_2018-1\\_cle8b49b8.pdf](https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/EPLEFPA_CFPPA_de_Saint-Paul_resume_etude_sur_l_errance_animale_2018-1_cle8b49b8.pdf)
341. Données carroyées à 1 kilomètre | Insee [Internet]. [cited 2021 Jun 15]. Available from: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/1405815>
342. Mosquito Light Trap | David J. Sencer CDC Museum | CDC [Internet]. 2021 [cited 2021 May 27]. Available from: <https://www.cdc.gov/museum/history/mosquito.html>
343. BG-Sentinel: Used worldwide in mosquito surveillance and monitoring [Internet]. [cited 2021 Jun 15]. Available from: [https://www.bg-sentinel.com/en/mosquito\\_monitoring.html](https://www.bg-sentinel.com/en/mosquito_monitoring.html)
344. Dehecq JS. CLE DE DETERMINATION DES MOUSTIQUES DE L'ILE DE LA REUNION. Agence Régionale de Santé Océan Indien; 2014.
345. Référentiel technico-économique SYSTÈME PORC SPÉCIALISÉ NAISSEUR-ENGRAISSEUR Conjoncture 2019 [Internet]. Institut de l'élevage; 2019. Available from: [https://www.reunion.chambagri.fr/Files/PDF/Elevage/Ref/R%C3%A9f%C3%A9rentiel\\_Porc\\_conjoncture\\_2019\\_vf.pdf](https://www.reunion.chambagri.fr/Files/PDF/Elevage/Ref/R%C3%A9f%C3%A9rentiel_Porc_conjoncture_2019_vf.pdf)
346. L'élevage [Internet]. Volay Pei. [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://volaypei.com/la-volay-pei/lelevage/>
347. Une population vieillissante - Insee Analyses Réunion - 25 [Internet]. [cited 2021 Jul 7]. Available from: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/3047952>
348. Agreste. Filière viande bovine [Internet]. DAAF de La Réunion; 2019. Available from: [https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/6-\\_FICHE\\_FILIERE\\_VIANDE\\_BOVINE\\_cle0e9981.pdf](https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/6-_FICHE_FILIERE_VIANDE_BOVINE_cle0e9981.pdf)
349. Agreste. Filière laitière [Internet]. DAAF La Réunion; 2019. Available from: [https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/filiere\\_LAIT\\_v1\\_cle0e92f1.pdf](https://daaf.reunion.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/filiere_LAIT_v1_cle0e92f1.pdf)
350. Vincent M, Larrieu S, Vilain P, Etienne A, Solet J-L, François C, et al. From the threat to the large outbreak: dengue on Reunion Island, 2015 to 2018. *Euro Surveill.* 2019 Nov;24(47).
351. Olive M-M, Baldet T, Devillers J, Fite J, Paty M-C, Paupy C, et al. The COVID-19 pandemic should not jeopardize dengue control. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Sep;14(9):e0008716.
352. Renault P, Solet J-L, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, et al. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg.* 2007 Oct;77(4):727–31.

353. Johnson BJ, Hurst T, Quoc HL, Unlu I, Freebairn C, Faraji A, et al. Field Comparisons of the Gravid Aedes Trap (GAT) and BG-Sentinel Trap for Monitoring *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations and Notes on Indoor GAT Collections in Vietnam. *J Med Entomol*. 2017 Mar 1;54(2):340–8.
354. Li Y, Su X, Zhou G, Zhang H, Puthiyakunnon S, Shuai S, et al. Comparative evaluation of the efficiency of the BG-Sentinel trap, CDC light trap and Mosquito-oviposition trap for the surveillance of vector mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2016 12;9(1):446.
355. Lacroix R, Delatte H, Hue T, Dehecq JS, Reiter P. Adaptation of the BG-Sentinel trap to capture male and female *Aedes albopictus* mosquitoes. *Med Vet Entomol*. 2009 Jun;23(2):160–2.
356. Roiz D, Duperier S, Roussel M, Boussès P, Fontenille D, Simard F, et al. Trapping the Tiger: Efficacy of the Novel BG-Sentinel 2 With Several Attractants and Carbon Dioxide for Collecting *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Southern France. *J Med Entomol*. 2016 Mar;53(2):460–5.
357. Le Goff G, Damiens D, Payet L, Ruttee A-H, Jean F, Lebon C, et al. Enhancement of the BG-sentinel trap with varying number of mice for field sampling of male and female *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors*. 2016 Sep 22;9(1):514.
358. Tran A, Mangeas M, Demarchi M, Roux E, Degenne P, Haramboure M, et al. Complementarity of empirical and process-based approaches to modelling mosquito population dynamics with *Aedes albopictus* as an example—Application to the development of an operational mapping tool of vector populations. *PLOS ONE*. 2020 Jan 17;15(1):e0227407.
359. Reisen WK, Aslam Y, Siddiqui TF, Khan AQ. A mark-release-recapture experiment with *Culex tritaeniorhynchus* Giles. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 1978 Jan 1;72(2):167–77.
360. Le Goff G, Damiens D, Ruttee A-H, Payet L, Lebon C, Dehecq J-S, et al. Field evaluation of seasonal trends in relative population sizes and dispersal pattern of *Aedes albopictus* males in support of the design of a sterile male release strategy. *Parasit Vectors*. 2019 Feb 12;12(1):81.
361. Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc’h G, et al. Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010 Apr;10(3):249–58.
362. Folly AJ, Dorey-Robinson D, Hernández-Triana LM, Ackroyd S, Vidana B, Lean FZX, et al. Temperate conditions restrict Japanese encephalitis virus infection to the mid-gut and prevents systemic dissemination in *Culex pipiens* mosquitoes. *Sci Rep*. 2021 Mar 17;11(1):6133.
363. Campagne de communication : « La dengue, plus sévère que jamais, protégeons-nous ! » [Internet]. [cited 2021 Jul 7]. Available from: <http://www.lareunion.ars.sante.fr/campagne-de-communication-la-dengue-plus-severe-que-jamais-protégeons-nous>
364. Morales Vargas R, Tsunoda T, Noda J, Boussès P, Nguyen TY, Hasebe F, et al. Shape relatedness between geographic populations of *Culex tritaeniorhynchus*, the primary vector of Japanese encephalitis virus: A landmark study. *Infection, Genetics and Evolution*. 2021 Jun 1;90:104764.
365. Kay BH, Farrow RA. Mosquito (Diptera: Culicidae) dispersal: implications for the epidemiology of Japanese and Murray Valley encephalitis viruses in Australia. *J Med Entomol*. 2000 Nov;37(6):797–801.
366. Reynolds DR, Smith AD, Mukhopadhyay S, Chowdhury AK, De BK, Nath PS, et al. Atmospheric transport of mosquitoes in northeast India. *Medical and Veterinary Entomology*. 1996;10(2):185–6.
367. Durand B, Tran A, Balança G, Chevalier V. Geographic variations of the bird-borne structural risk of West Nile virus circulation in Europe. *PLoS One*. 2017;12(10):e0185962.

368. Komiya T, Toriniwa H, Matsumura T, Takegami T, Nakayama T. Epidemiological study on Japanese encephalitis virus distribution in Ishikawa prefecture, Japan, by serological investigation using wild boar sera. *J Vet Med Sci.* 2019 Jun 21;81(6):903–5.
369. Auerswald H, Maquart P-O, Chevalier V, Boyer S. Mosquito Vector Competence for Japanese Encephalitis Virus. *Viruses.* 2021 Jun;13(6):1154.
370. Garcia-Rejon JE, Blitvich BJ, Farfan-Ale JA, Loroño-Pino MA, Chi Chim WA, Flores-Flores LF, et al. Host-Feeding Preference of the Mosquito, *Culex quinquefasciatus*, in Yucatan State, Mexico. *Journal of Insect Science.* 2010 Apr;10(32):1–12.
371. Weng MH, Lien JC, Wang YM, Wu HL, Chin C. Susceptibility of three laboratory strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Japanese encephalitis virus from Taiwan. *J Med Entomol.* 1997 Nov;34(6):745–7.
372. Pan X-L, Liu H, Wang H-Y, Fu S-H, Liu H-Z, Zhang H-L, et al. Emergence of genotype I of Japanese encephalitis virus as the dominant genotype in Asia. *Journal of Virology.* 2011;85(19):9847–53.
373. Han N, Adams J, Fang W, Liu S-Q, Rayner S. Investigation of the genotype III to genotype I shift in Japanese encephalitis virus and the impact on human cases. *Virol Sin.* 2015 Aug 1;30(4):277–89.
374. Huang Y-JS, Hettenbach SM, Park SL, Higgs S, Barrett ADT, Hsu W-W, et al. Differential Infectivities among Different Japanese Encephalitis Virus Genotypes in *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases.* 2016 Oct 5;10(10):e0005038.
375. Gouagna LC, Dehecq J-S, Fontenille D, Dumont Y, Boyer S. Seasonal variation in size estimates of *Aedes albopictus* population based on standard mark–release–recapture experiments in an urban area on Reunion Island. *Acta Tropica.* 2015 Mar 1;143:89–96.
376. Lacroix R, Delatte H, Hue T, Reiter P. Dispersal and Survival of Male and Female *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Réunion Island. *Journal of Medical Entomology.* 2009 Sep 1;46(5):1117–24.
377. Oliveira ARS, Piaggio J, Cohnstaedt LW, McVey DS, Cernicchiaro N. Introduction of the Japanese encephalitis virus (JEV) in the United States - a qualitative risk assessment. *Transbound Emerg Dis.* 2019 Mar 22;
378. Commission Delegated Regulation (EU) 2020/692 of 30 January 2020 supplementing Regulation (EU) 2016/429 of the European Parliament and of the Council as regards rules for entry into the Union, and the movement and handling after entry of consignments of certain animals, germinal products and products of animal origin (Text with EEA relevance) (Text with EEA relevance) [Internet]. *OJ L*, 32020R0692 Jun 3, 2020. Available from: [http://data.europa.eu/eli/reg\\_del/2020/692/oj/eng](http://data.europa.eu/eli/reg_del/2020/692/oj/eng)
379. Rosen L, Shroyer DA, Lien JC. Transovarial Transmission of Japanese Encephalitis Virus by *Culex tritaeniorhynchus* Mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1980 Jul 1;29(4):711–2.
380. Rosen L, Tesh RB, Lien JC, Cross JH. Transovarial transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes. *Science.* 1978 Feb 24;199(4331):909–11.
381. Ritchie SA, Rochester W. Wind-blown mosquitoes and introduction of Japanese encephalitis into Australia. *Emerg Infect Dis.* 2001 Oct;7(5):900–3.
382. Managing the Risks of Extreme Events and Disasters to Advance Climate Change Adaptation — IPCC [Internet]. [cited 2021 Jun 25]. Available from: <https://www.ipcc.ch/report/managing-the-risks-of-extreme-events-and-disasters-to-advance-climate-change-adaptation/>
383. Ciota AT, Matakchiero AC, Kilpatrick AM, Kramer LD. The effect of temperature on life history traits of *Culex* mosquitoes. *J Med Entomol.* 2014 Jan;51(1):55–62.



## ANNEXES

### *Annexe 1 : Variabilité des tests de diagnostic du VEJ pour les porcs*

Les tests diagnostiques pour le VEJ chez les porcs sont essentiels tant dans les études expérimentales que pour identifier les régions ou périodes à risque et les processus épidémiologiques. En effet, les signes cliniques chez les porcs sont complexes et peu spécifiques. La principale difficulté pour évaluer l'exposition des porcs au VEJ réside dans la variabilité des tests disponibles et utilisés, et dans l'existence de réactions croisées au sein et entre les différents sérocomplexes (34,250–253). Comme préliminaire nécessaire, nous présentons ici brièvement les différents tests utilisés pour la détection du VEJ chez les porcs.

#### Détection et isolement du virus

La transcription inverse en chaîne par polymérase (RT-PCR) est la technique de référence pour détecter le génome du virus, étant extrêmement sensible et spécifique (143–146). L'isolement du virus, qui constitue le diagnostic définitif, est possible grâce à différentes techniques. Certaines études anciennes utilisaient l'inoculation intracérébrale à des souris (SMIC) d'échantillons de tissus à tester. Les souris étaient inoculées par voie intracrânienne et surveillées afin de détecter des symptômes neurologiques ou la mort dans un laps de temps défini. L'isolement est maintenant réalisé par l'inoculation de cellules en culture (cellules Vero ou cellules C6/36 de moustique) par un échantillon biologique potentiellement infecté par le virus. Le VEJ est ensuite soit confirmé par l'observation de l'effet cytopathique sur les cellules, soit détecté par RT-PCR, qui est plus sensible (147).

#### Test sérologiques

Le test de neutralisation par réduction de plaque (PRNT) est la technique standard pour le diagnostic sérologique des infections à flavivirus. Le test repose sur la protection des cellules en présence d'anticorps neutralisants dans le sérum. La capacité des anticorps neutralisants à réduire le nombre de plaques de lyse dans une culture cellulaire est quantifiée visuellement. Un échantillon est considéré comme positif si un certain seuil de réduction des plaques par rapport au sérum de contrôle est atteint. Le protocole standard prévoit un seuil de réduction de 90% des plaques de lyse (PRNT90). Cependant, plusieurs études utilisent un seuil plus bas de 80% ou même 50%, afin d'augmenter la sensibilité du test en acceptant une réduction de sa spécificité (11,12). Les tests ELISA (Enzyme Like ImmunoAssays) sont basés sur une réaction colorimétrique pour laquelle l'intensité de la couleur est liée à la concentration des anticorps. Différents kits ELISA sont disponibles (« porcine JE-IgG », « SunRed » ; « ID screen WN ID VET »). C'est un outil intéressant pour l'enquête sérologique comme premier dépistage (148,244). Bien que l'ELISA soit habituellement réalisé sur le sérum, les anticorps anti-flavivirus peuvent également être détectés par ELISA sur le jus de viande, ce qui est censé faciliter la surveillance des animaux sauvages (149). Le test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) est utilisé dans certains laboratoires, notamment pour les enquêtes sur les oiseaux. La méthode IHA exploite la capacité de la protéine E à agréger les érythrocytes en l'absence d'anticorps E neutralisants (243). Elle est sujette à des réactions croisées dans le sérocomplexe VEJ et avec d'autres sérocomplexes de flavivirus. L'IHA et ELISA sont tous deux sujets à des réactions croisées dans le sérocomplexe VEJ et avec d'autres sérocomplexes de flavivirus. Les échantillons positifs doivent donc être confirmés par séroneutralisation (par exemple par PRNT) si l'on veut conclure sur la séroprévalence anti-VEJ spécifiquement (34,244)(11,15).

**Annexe 2 : Estimation des forces d'infection par les flavivirus par mois chez les poulets et les canards échantillonnés dans la province de Kandal en 2016.**

Afin d'étayer le fait que la circulation du VEJ chez les volailles est peu affectée par la saisonnalité, nous avons pu estimer les forces d'infection (FOI) sur le jeu de données aviaires de 2016 analysé par Auerswald et al, 2020 (33). En mars 2016, 417 poulets et 203 canards ont été soumis à un prélèvement sanguin dans trois provinces du Cambodge, dont la province de Kandal (n=296). L'âge était connu pour 492 (79,4%) volailles, et variait de 1 à 36 mois (moyenne 7,93 mois ; [7,19-8,67]<sub>IC95%</sub>). Tous les sérums ont d'abord été soumis à un test d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) pour déterminer la séroprévalence anti-flavivirus. Seuls les échantillons positifs à l'IHA ayant un volume de sérum suffisant ont pu être testés par le test de neutralisation par réduction des foyers (FRNT) (n=65). La séroprévalence globale anti-flavivirus était de 23,7% chez les poulets et de 39,9% chez les canards. La séroprévalence anti-flavivirus observée différait selon les provinces étudiées et était la plus faible à Kandal (19,6%, 58/296 échantillons).

Nous avons sélectionné les 296 poulets et canards qui ont été collectés dans la province de Kandal pour estimer la FOI sur les résultats d'IHA de cet échantillon, car notre étude se concentre sur la province de Kandal. Les méthodes d'estimation des FOI sont les mêmes que celles que nous avons utilisées, et sont donc détaillées dans l'article principal.

Les estimations de FOI par les flavivirus à Kandal étaient de 0,05 par mois et de 0,03 par mois pour les canards et les poulets de 2016 respectivement (tableau 1). Comme les intervalles de confiance des FOI par les flavivirus estimés ne se chevauchent pas, la FOI par les flavivirus était significativement plus élevée chez les canards que chez les poulets.

**Tableau A.1 : Forces d'infection (FOI) par les flavivirus des poulets et des canards par mois dans la province de Kandal en 2016.**

<b>FOI par les flavivirus (IHA)</b>		
	<b>FOI</b>	<b>IC 95%</b>
<b>Canards</b>	0,05	(0,04 – 0,07)
<b>Poulets</b>	0,03	(0,02 – 0,03)

**Annexe 3 :** Forces d'infection (FOI) par les flavivirus et par le VEJ par espèce, dans le district de Khsach Kandal uniquement.

	FOI par les flavivirus (IHA)		FOI par le VEJ (FRNT)	
	FOI	IC 95%	FOI	IC 95%
<b>Porcs</b>	0,12	(0,09 - 0,16)	0,12	(0,09 - 0,16)
<b>Canards</b>	0,06	(0,04 - 0,09)	0,05	(0,04 - 0,08)
<b>Chiens</b>	0,02	(0,01- 0,02)	0,01	(0,01 - 0,02)

*Les poulets ont été exclus car aucun n'était positif à Khsach Kandal*

**Annexe 4 : Equations du modèle déterministe à compartiments (I) et méthode de la « Next Generation Matrix » pour les calculs de  $R_0$  (II).**

I) Equations du modèle déterministe à compartiments

Sept populations d'hôtes (porcs, truies, canards, poulets, bovins, hommes et chiens) sont représentées par le même système d'équations différentielles, où l'indice  $i$  désigne l'espèce. On distingue cinq états de santé :  $M$  (hôtes protégés par leurs anticorps maternels),  $S$  (hôtes sensibles),  $E$  (hôtes latents),  $I$  (hôtes infectieux) et  $R$  (hôtes guéris ou immuns).

$$\begin{cases} \frac{dM_i}{dt} = \mu_i R_i - \delta_i M_i - \mu_i M_i \\ \frac{dS_i}{dt} = \delta_i M_i + \mu_i (S_i E_i I_i M_i) - \left(\frac{b x_i p_i I_v}{N_i}\right) S_i - \mu_i S_i \\ \frac{dE_i}{dt} = \left(\frac{b x_i p_i I_v}{N_i}\right) S_i - \phi_i E_i - \mu_i E_i \\ \frac{dI_i}{dt} = \phi_i E_i - \gamma_i I_i - \mu_i I_i \\ \frac{dR_i}{dt} = \gamma_i I_i - \mu_i R_i \end{cases} \quad \text{avec } x_i = \frac{\pi_i N_i}{\sum_j \pi_j N_j}$$

Une population de vecteurs (*Culex spp*) est représentée par le système d'équations différentielles, où l'état de santé  $S_v$  correspond aux vecteurs sains, non infectés,  $E_v$  aux vecteurs latents, infectés mais non infectieux, et  $I_v$  aux vecteurs infectieux.  $foi_v$  est la force d'infection exercée sur les vecteurs.

$$\begin{cases} \frac{dS_v}{dt} = \mu_v N_v - foi_v S_v - \mu_v S_v \\ \frac{dE_v}{dt} = foi_v S_v - \phi_v E_v - \mu_v E_v \\ \frac{dI_v}{dt} = \phi_v E_v - \mu_v I_v \end{cases} \quad \text{avec } foi_v = b \sum_i x_i q_i \frac{I_i}{N_i}$$

Les notations et les significations des paramètres du modèle sont rappelées dans le tableau suivant:

Paramètre	Définition
<b>Hosts</b>	
$1/\mu_i$	Durée de vie moyenne de l'hôte de l'espèce $i$
$1/\delta_i$	Durée de l'immunité maternelle chez l'hôte de l'espèce $i$
$1/\Phi_i$	Période d'incubation chez l'hôte de l'espèce $i$
$1/\gamma_i$	Période virémique chez l'hôte de l'espèce $i$
<b>Vector</b>	
$1/\mu_v$	Durée de vie moyenne des <i>Culex spp.</i>
$b$	Taux de piqûre de <i>Culex spp.</i>
$1/\Phi_v$	Période extrinsèque d'incubation de <i>Culex spp.</i>
<b>Vector/Hosts interactions</b>	
$\pi_i$	Préférence trophique relative de <i>Culex spp.</i> pour l'hôte de l'espèce $i$
$p_i$	Probabilité de transmission d'un vecteur ( <i>Culex spp.</i> ) à un hôte de l'espèce $i$
$q_i$	Probabilité de transmission de l'hôte de l'espèce $i$ à un vecteur ( <i>Culex spp.</i> )
<b>Population sizes</b>	
$N_v$	Nombre de vecteurs ( <i>Culex spp.</i> ) impliqués dans la transmission du VEJ dans le village modélisé
$N_i$	Nombre d'hôtes de l'espèce $i$ dans le village modélisé

II) Méthode de la “Next Generation Matrix” pour les calculs de  $R_0$

La « Next generation matrix » (NGM) décrit les transmissions d'un agent infectieux entre les états à l'infection. La valeur propre dominante  $R_0$  décrit la croissance, en termes de générations, de la population d'hôtes infectés (310).

1) Nous avons d'abord isolé les compartiments avec les hôtes et les vecteurs infectés ( $E$  et  $I$ ), à partir des équations différentielles de notre modèle :

$$\begin{cases} \frac{dE_p}{dt} = b x_p p_p \frac{I_v}{N_p} S_p - \varphi_p E_p - \mu_p E_p \\ \frac{dI_p}{dt} = \varphi_p E_p - \gamma_p I_p - \mu_p I_p \end{cases} \quad \begin{cases} \frac{dE_v}{dt} = b(x_p q_p \frac{I_p}{N_p} + x_t q_p \frac{I_t}{N_t} + x_c q_c \frac{I_c}{N_c} + x_{pl} q_{pl} \frac{I_{pl}}{N_{pl}} + x_h q_h \frac{I_h}{N_h} + x_b q_b \frac{I_b}{N_b} + x_{chien} q_{chien} \frac{I_{chien}}{N_{chien}}) S_v - \varphi_v E_v - \mu_v E_v \\ \frac{dI_v}{dt} = \varphi_v E_v - \mu_v I_v \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{dE_t}{dt} = b x_t p_p \frac{I_v}{N_t} S_t - \varphi_t E_t - \mu_t E_t \\ \frac{dI_t}{dt} = \varphi_t E_t - \gamma_t I_t - \mu_t I_t \end{cases} \quad \begin{cases} \frac{dE_h}{dt} = b x_h p_h \frac{I_v}{N_h} S_h - \varphi_h E_h - \mu_h E_h \\ \frac{dI_h}{dt} = \varphi_h E_h - \gamma_h I_h - \mu_h I_h \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{dE_c}{dt} = b x_c p_c \frac{I_v}{N_c} S_c - \varphi_c E_c - \mu_c E_c \\ \frac{dI_c}{dt} = \varphi_c E_c - \gamma_c I_c - \mu_c I_c \end{cases} \quad \begin{cases} \frac{dE_b}{dt} = b x_b p_b \frac{I_v}{N_b} S_b - \varphi_b E_b - \mu_b E_b \\ \frac{dI_b}{dt} = \varphi_b E_b - \gamma_b I_b - \mu_b I_b \end{cases}$$

$$\begin{cases} \frac{dE_{pl}}{dt} = b x_{pl} p_{pl} \frac{I_v}{N_{pl}} S_{pl} - \varphi_{pl} E_{pl} - \mu_{pl} E_{pl} \\ \frac{dI_{pl}}{dt} = \varphi_{pl} E_{pl} - \gamma_{pl} I_{pl} - \mu_{pl} I_{pl} \end{cases} \quad \begin{cases} \frac{dE_{chien}}{dt} = b x_{chien} p_{chien} \frac{I_v}{N_{chien}} S_{chien} - \varphi_{chien} E_{chien} - \mu_{chien} E_{chien} \\ \frac{dI_{chien}}{dt} = \varphi_{chien} E_{chien} - \gamma_{chien} I_{chien} - \mu_{chien} I_{chien} \end{cases}$$

With:  $p$ =porcs,  $t$ =trouies,  $c$ =canards,  $pl$ =poulets,  $v$ =*Culex spp.*,  $h$ =humains,  $b$ =bovins.

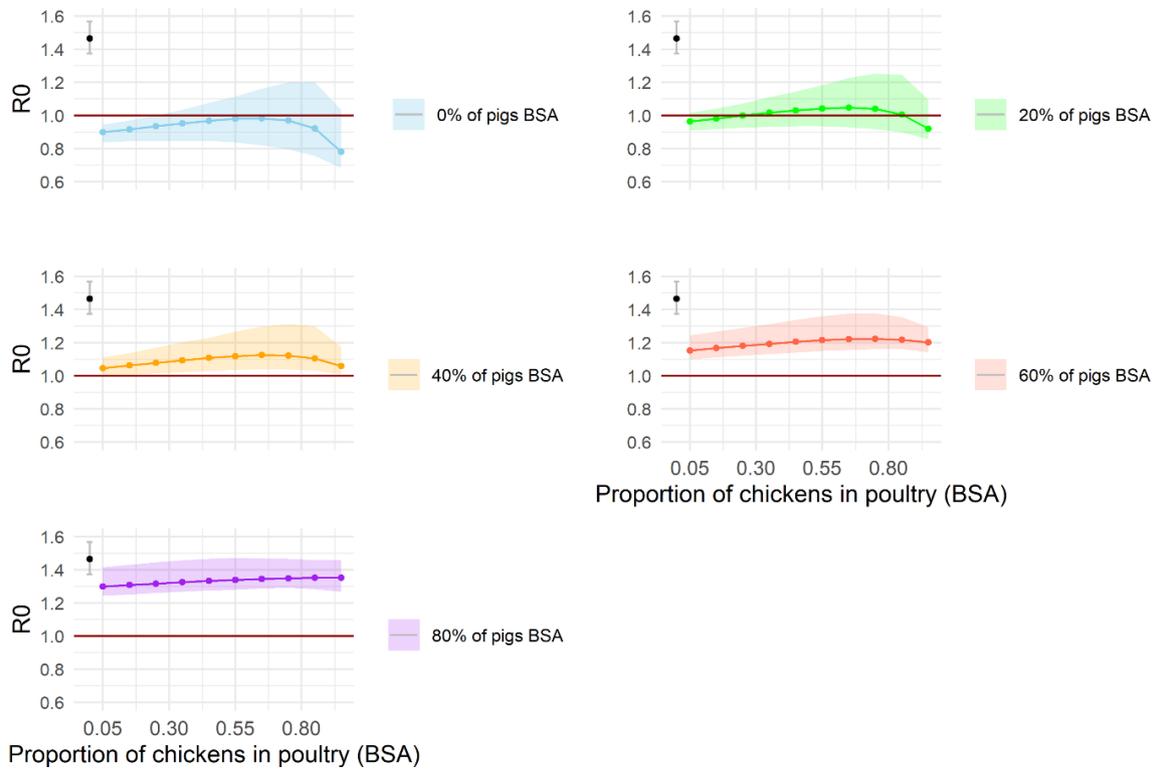
- 2) Pour chaque espèce, nous avons identifié les termes de transmission et de migration, desquels nous avons déduit deux vecteurs :  $F$  est le taux auquel de nouvelles infections apparaissent (termes de transmission) et  $V$  est le taux auquel les individus entrent ou sortent du compartiment en raison de l'achèvement d'un stade d'infection ou de la mort (termes de migration).

$$\begin{array}{l}
 F = \\
 \begin{array}{l}
 b x_p p_p \frac{I_v}{N_p} S_p \\
 0 \\
 b x_t p_p \frac{I_v}{N_t} S_t \\
 0 \\
 b x_c p_c \frac{I_v}{N_c} S_c \\
 0 \\
 b x_{pl} p_{pl} \frac{I_v}{N_{pl}} S_{pl} \\
 0 \\
 b x_p q_p \frac{I_p}{N_p} S_v + b x_t q_p \frac{I_t}{N_t} S_v + b x_c q_c \frac{I_c}{N_c} S_v + b x_{pl} q_{pl} \frac{I_{pl}}{N_{pl}} S_v + b x_h q_h \frac{I_h}{N_h} S_v + b x_b q_b \frac{I_b}{N_b} S_v + b x_{chien} q_{chien} \frac{I_{chien}}{N_{chien}} S_v \\
 0 \\
 b x_h p_h \frac{I_v}{N_h} S_h \\
 0 \\
 b x_b p_b \frac{I_v}{N_b} S_b \\
 0 \\
 b x_{chien} p_{chien} \frac{I_v}{N_{chien}} S_{chien} \\
 0
 \end{array} \\
 \end{array}
 \quad
 \begin{array}{l}
 V = \\
 \begin{array}{l}
 \varphi_p E_p + \mu_p E_p \\
 -\varphi_p E_p + \gamma_p I_p + \mu_p I_p \\
 \varphi_p E_t + \mu_t E_t \\
 -\varphi_p E_t + \gamma_p I_t + \mu_t I_t \\
 \varphi_c E_c + \mu_c E_c \\
 -\varphi_c E_c + \gamma_c I_c + \mu_c I_c \\
 \varphi_{pl} E_{pl} + \mu_{pl} E_{pl} \\
 -\varphi_{pl} E_{pl} + \gamma_{pl} I_{pl} + \mu_{pl} I_{pl} \\
 \varphi_v E_v + \mu_v E_v \\
 -\varphi_v E_v + \mu_v I_v \\
 \varphi_h E_h + \mu_h E_h \\
 -\varphi_h E_h + \gamma_h I_h + \mu_h I_h \\
 \varphi_b E_b + \mu_b E_b \\
 -\varphi_b E_b + \gamma_b I_b + \mu_b I_b \\
 \varphi_{chien} E_{chien} + \mu_{chien} E_{chien} \\
 -\varphi_{chien} E_{chien} + \gamma_{chien} I_{chien} + \mu_{chien} I_{chien}
 \end{array}
 \end{array}$$

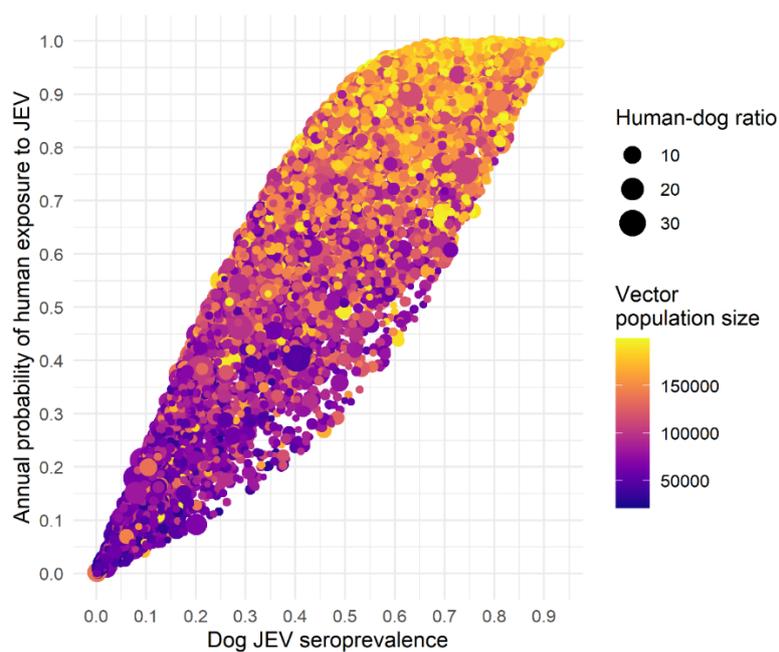
- 3) Nous avons ensuite défini les matrices Jacobiennes à l'équilibre sans maladie (*disease-free equilibrium*) DFE ( $x_0$ ), où  $S_i = N_i$  pour les hôtes et les vecteurs:  $\mathbf{F} = \frac{\partial F_i(x_0)}{\partial x_j}$  et  $\mathbf{V} = \frac{\partial V_i(x_0)}{\partial x_j}$ ,  $i$  et  $j$  étant chaque espèce dans les compartiments correspondant aux individus infectés (voir page suivante).
- 4) Ainsi,  $\mathbf{F.V}^{-1}$  est la NGM et le  $R_0$  est le rayon spectral de la NGM, c'est-à-dire la valeur absolue maximale de toutes les valeurs propres de la NGM.



**Annexe 5 :**  $R_0$  selon de la proportion de poulets parmi les volailles (BSA), pour cinq proportions de porcs parmi les hôtes compétents (BSA). Le point noir correspond au  $R_0$  pour 100% de porcs parmi les hôtes compétents (BSA).



**Annexe 6 :** Probabilité annuelle d'exposition humaine au VEJ en fonction de la séroprévalence anti-VEJ canine, pour des ratios homme-chien et des tailles de population vectorielle variables.

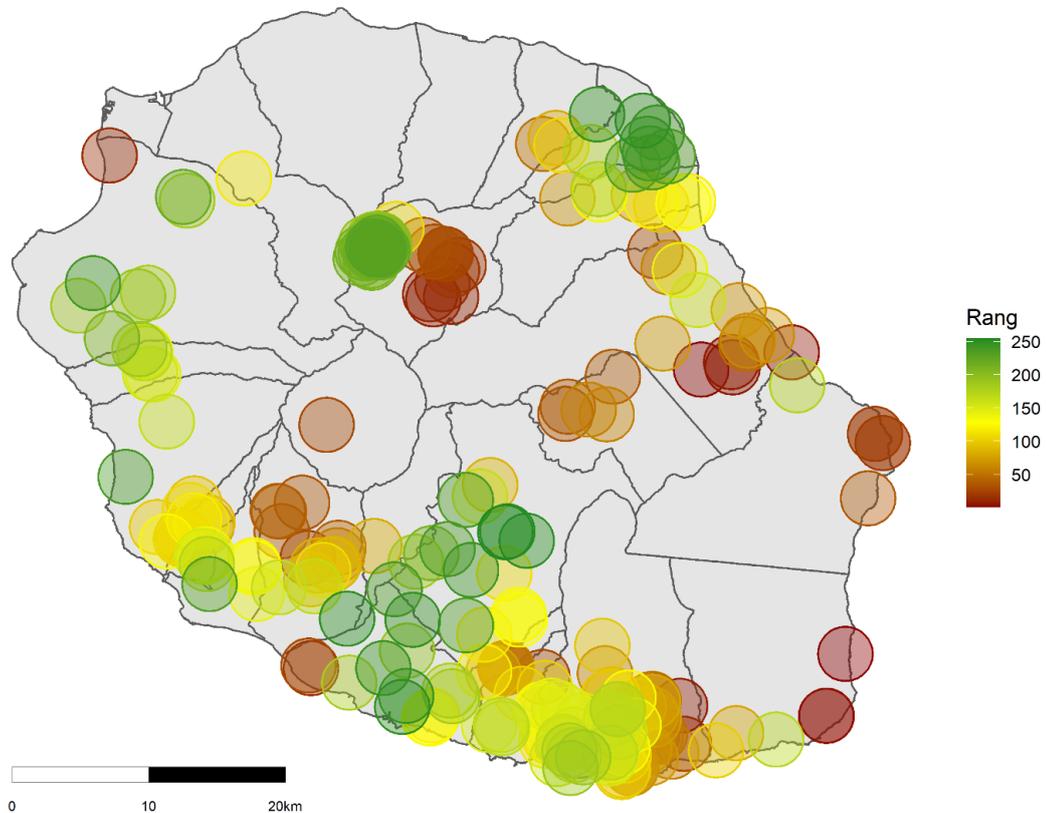


**Annexe 7 : Détail des captures de *Culex spp.*, par site de capture, par piège et par saison de capture.**

	Friche			Elevage porcs et volailles				Ferme pédagogique			tot
	CDC	BG	tot	CDC	BG1	BG2	tot	CDC	BG	tot	
ETE (nov-avr)	4 (2)*	122 (47)	126 (49)	33 (28)	33 (28)	40 (34)	106 (90)	8 (6)	66 (52)	74 (58)	<b>306 (197)</b>
HIVER (mai-oct)	1 (1)	122 (40)	123 (41)	20 (20)	58 (57)	62 (62)	140 (139)	2 (2)	177 (175)	179 (177)	<b>442 (357)</b>
tot	5 (3)	144 (87)	149 (90)	53 (48)	91 (85)	102 (96)	246 (229)	10 (8)	243 (227)	253 (235)	<b>748 (554)</b>

\* total (nombre de femelles)

**Annexe 8 : Rang des zones tampons (de 2 km de rayon autour des élevages de porcs), classées selon la valeur du  $R_0$  calculé.**





Review

# How Central Is the Domestic Pig in the Epidemiological Cycle of Japanese Encephalitis Virus? A Review of Scientific Evidence and Implications for Disease Control

Hélène Ladreyt <sup>1,2</sup>, Benoit Durand <sup>1</sup>, Philippe Dussart <sup>3</sup> and Véronique Chevalier <sup>2,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> Epidemiology Unit, Laboratory for Animal Health, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), University Paris-Est, 94700 Maisons-Alfort, France; helena.ladreyt@anses.fr (H.L.); benoit.durand@anses.fr (B.D.)

<sup>2</sup> Agricultural Research for Development (CIRAD), UMR ASTRE, F-34090 Montpellier, France

<sup>3</sup> Virology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, PO Box 983, Phnom Penh 12201, Cambodia; pdussart@pasteur-kh.org

<sup>4</sup> Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, PO Box 983, Phnom Penh 12201, Cambodia

<sup>5</sup> Agricultural Research for Development (CIRAD), UMR ASTRE, Phnom Penh 12201, Cambodia

\* Correspondence: veronique.chevalier@cirad.fr or vchevalier@pasteur-kh.org

Received: 30 August 2019; Accepted: 11 October 2019; Published: 15 October 2019



**Abstract:** Despite the existence of human vaccines, Japanese encephalitis (JE) remains the leading cause of human encephalitis in Asia. Pigs are described as the main amplifying host, but their role in JE epidemiology needs to be reassessed in order to identify and implement efficient control strategies, for both human and animal health. We aimed to provide a systematic review of publications linked to JE in swine, in terms of both individual and population characteristics of JE virus (JEV) infection and circulation, as well as observed epidemiological patterns. We used the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) statement to select and analyze relevant articles from the Scopus database, 127 of which were included in the review. Pigs are central, but the implication of secondary hosts cannot be ruled out and should be further investigated. Although human vaccination cannot eradicate the virus, it is clearly the most important means of preventing human disease. However, a better understanding of the actual involvement of domestic pigs as well as other potential JEV hosts in different JEV epidemiological cycles and patterns could help to identify additional/complementary control measures, either by targeting pigs or not, and in some specific epidemiological contexts, contribute to reduce virus circulation and protect humans from JEV infection.

**Keywords:** Japanese encephalitis virus; pig; epidemiology; control

## 1. Introduction

Japanese encephalitis (JE) is a serious vector-borne zoonosis and probably the most important cause of human viral encephalitis in South East Asia (SEA). In 2011, the last attempt to estimate the overall incidence of JE reported an approximated incidence of 67,900 JE cases in 24 Asian and Western Pacific countries. Approximately three-quarters of these concerned children, and JE remains a substantial public health issue even in areas that have developed human vaccination programs [1]. The fatality rate can reach 30%, and 30% to 50% of survivors may continue to suffer definitive neurological or psychiatric sequelae [2]. There are no licensed anti-JE drugs available, and the management of patients remains symptomatic.

JE is caused by a flavivirus, which is part of the JE virus (JEV) serocomplex along with West Nile Virus (WNV), Murray Valley encephalitis virus (MVEV), Saint Louis encephalitis virus (SLEV), and Usutu virus (USUV). JEV distribution has long been limited to SEA but has now extended to Australia, Papua New Guinea, and a human indigenous case was recently confirmed in Africa [3]. To date, five genotypes (GI to GV) have been described, with most isolated strains belonging to genotypes I, II, and III [4]. While genotype III (GIII) was the most frequently isolated genotype throughout most of Asia from 1935 until the 1990s, a genotype shift occurred in the last 30 years. In pigs, genotype I (GI) started to be the most isolated genotype after the 90s in Japan, South Korea, India, Nepal, Thailand, Vietnam, and Cambodia [5,6].

JEV is transmitted from animals, especially pigs, to humans by *Culex* mosquitoes, such as *Culex tritaeniorhynchus* or *Culex gelidus*, and probably by some *Aedes* mosquitoes [7–15]. The commonly described cycle implicates Ardeid birds as JEV reservoirs, pigs as the main amplifying hosts, and *Culex* mosquitoes as vectors [16–20]. In addition to vector-borne transmission, recent findings suggest that direct transmission between pigs could also occur [21–23]. Domestic birds might also be involved in the cycle. Indeed, they were shown to be exposed to JEV and could develop sufficient viraemia to re-infect mosquitoes when bitten [24–27]. Other animals, such as cattle or dogs, were shown to be exposed to JEV, but no study investigated their potential role in the epidemiological cycle, and they are, for now, considered to be dead-end hosts [28–35]. Humans and horses, also subjected to developing fatal encephalitis, are, for now, only known to be dead-end hosts [36,37].

Since there is no antiviral treatment or antiviral prophylaxis, human vaccination remains the only available tool to protect humans from JEV infection [38], but it does not prevent JEV circulation. As a matter of fact, human JE cases still occur in countries where mass vaccination campaigns are implemented. If pigs are the main amplifying host of JE, breaking the mosquito–pig transmission cycle should stop virus circulation and protect humans from JEV infection. Thus, improving our knowledge on the characteristics of swine infection by JEV in terms of viraemia, the immune response, mechanisms of transmission, and clinical signs is necessary to better assess the role of domestic pigs in the epidemiological cycle, and to identify additional control measures focusing on pigs. How prevalent is JEV in swine? What are the different JE epidemiological patterns? Do pig-targeted control measures allow control of JEV circulation? The present review aimed at synthesizing the knowledge related to pigs and JEV, at both the individual and population levels, in order to discuss the importance of swine in the JEV transmission cycle. The role of pigs in the JEV epidemiological cycle is described based on the available studies, and potential pig-related control measures are discussed.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Protocol, Search Process, and Databases

This review followed the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) method for systematic reviews and meta-analyses [39]. All studies dealing with both JEV and swine were eligible for the systematic review. Serological surveys, experimental and ecological studies, and JEV outbreak investigations were considered. We only reviewed articles written in English and no publication date restriction was imposed, thus, the publication year extended from 1947 to 2019. The Scopus database was searched electronically using the following request: (“Japanese encephalitis” or “Japanese B encephalitis”) and (“pigs” or “swine”). We used the “all field” option in order to collect the articles in which the search terms appeared in the titles, abstracts, or keywords.

The same person conducted all of the initial searching and screening. Articles were listed in an Excel file to sort them and keep track of any excluded ones. Duplicates were removed and the study selection was made in three steps: i) title screening, ii) abstract reading of papers kept after title screening, and iii) full-text reading of papers kept after abstract reading.

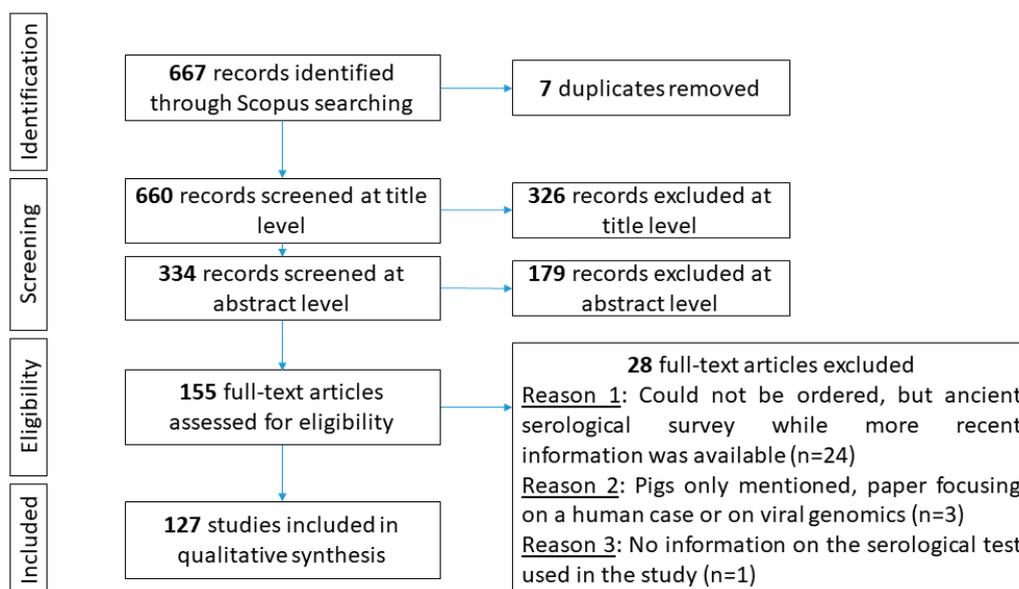
## 2.2. Inclusion and Exclusion Criteria

The study selection was based on the following inclusion criteria: English-written articles reporting cross-sectional or longitudinal serological surveys, experimental infections, description of clinical disease, pathogenicity, transmission routes, viraemia, immune response and diagnosis, effects of vaccination, control measures, epidemiological cycle and systems, and all subjects being directly related to swine. The exclusion criteria included reviews, notes and reports from congresses, travelers' recommendations, genome sequencing alone, experimental virology alone (viral structure, virus–cell interactions), development of diagnostic tests, not focused on swine (i.e., focused on humans, mosquitoes), human outbreak notifications, focus on viruses other than JEV, and mathematical modeling approaches.

## 3. Results

### 3.1. Study Selection

The query of the Scopus database was performed on 15 March 2019 and returned 667 records. The study selection process is represented in Figure 1. At the end of the selection process, 127 studies were included in the qualitative synthesis.



**Figure 1.** Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) flow diagram representing the selection process.

### 3.2. Individual Characteristics of JEV Infection in Swine

All mentioned virologic and serological tests are described in Supplementary Material File S1 [40–46].

#### 3.2.1. Viraemia in JEV-Infected Pigs

Viraemia is the presence of virus in the blood. During this phase, JEV can be transmitted to mosquitoes that bite the viraemic pig if viraemia level is high enough. It was experimentally shown that viraemia levels of about  $10^4$  infectious units per mL appeared to be sufficient to transmit the virus to mosquitoes [47–50]. Six articles reported experimental works related to viraemia in JEV-infected pigs. Sows and piglets were inoculated with different JEV strains and bled daily in order to detect the virus, by intracerebral inoculation of suckling mice (ICISM) in the earliest studies, and JEV ribonucleic acid (RNA) by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) in the more recent ones. The results are presented in Table 1. Depending on the study, viraemia was detected between one and

five days post-infection (dpi), and lasted from three to five days [22,47,51–54]. One study concluded that the higher the concentration of inoculated virus, the earlier the virus was detected (as early as one day). When detected, virus titers reached 2.6 log LD<sub>50</sub>/0.03 mL of blood upon titration intracranially in weanling mice, with LD<sub>50</sub> being 50% of the lethal dose [47]. More recently, viraemia was quantified by detecting JEV RNA using quantitative RT-PCR (RT-qPCR) on the inoculated piglets, reaching about 10<sup>4</sup> RNA units/mL [22,54].

**Table 1.** Viraemia and active immune response in pigs after Japanese encephalitis virus (JEV) experimental infection.

Protocol	Viraemia			Immune Response		Reference
	Test	Detection Period	Peak Value	Test	Antibody Detection	
5 sows, IV inoculation, Kanagawa strain, bled daily	ICISM	1–4 dpi	NA	VN in mice	>7 dpi	[51]
4 piglets, SC inoculation, M5/596 and pig9 strains, bled daily	ICISM	For 4 days	2.6 log LD <sub>50</sub> /0.03 mL	HIA	7–35 * dpi	[47]
2 piglets, SC inoculation, 9215 strain, bled daily	ICISM	1–4 dpi	NA	HIA	All positive at 7 dpi	[52]
6 piglets, SC inoculation, Nakayama strain, bled daily	ICISM + RT-PCR	2–5 dpi	NA	SNT	All positive at 14 dpi	[53]
12 piglets, IV + ID inoculation, Nakayama strain, bled daily	RT-PCR	1–5 dpi	10 <sup>4</sup> U/mL **	SNT	3–11 * dpi	[22]
10 piglets, IV inoculation, JE-91 strain, bled daily	RT-PCR	3–5 dpi	10 <sup>3.5</sup> U/mL **	SNT	All positive at 28 dpi	[54]

IV—intravenous; SC—subcutaneous; ID—intradermal; LD<sub>50</sub>—50% lethal dose; TCID<sub>50</sub>—50% tissue culture infective dose; ICISM—intracerebral inoculation of suckling mice; RT-PCR—reverse transcription-polymerase chain reaction; VN—virus neutralization; HIA—hemagglutination inhibition assay; SNT—seroneutralization test; dpi—day post-infection; \*All piglets positive at the date when monitoring ended; \*\* One U was defined as the viral RNA quantity corresponding to 1 TCID<sub>50</sub> of the virus preparation used as the standard by the authors; NA: non-applicable, when viraemia detection was qualitative.

Neither of these measures of viraemia can be quantitatively compared, as infectivity assays detect the presence of infectious virions whereas RT-qPCR detects RNA from both non-defective and defective virions [53].

These experimental studies consistently showed that JEV viraemia was early and short. This may explain why JEV is difficult to isolate from pigs under field conditions in cross-sectional studies as well as in longitudinal studies if the periodicity of blood sampling is not high enough. In comparison with other pig diseases of importance, African Swine Fever (ASF) causes viraemia for three weeks to up to two months [55–57] and Classical Swine Fever (CSF) for one to three weeks [58,59].

Viraemia characteristics under field conditions could be documented through the follow-up of pigs and the detection of JEV in blood. Ueba et al. followed up piglets for several months, and tested them from once a day to once every four days using ICISM. The results confirmed the viraemia durations observed under experimental conditions, as viraemia was detected for three to five days [60].

### 3.2.2. Humoral Response of Pigs after JEV Infection

The humoral response after experimental infection was studied in six articles (Table 1). Depending on the protocol of the study (JEV strain, inoculation route and dose, age of the piglets), antibodies after JEV experimental infection appeared at 3 to 7 dpi, and were detected until the end of the study (7–35 dpi). Ueba et al. reported that viraemia dropped as soon as hemagglutination inhibition assay (HIA) antibodies were detected [60]. This suggested that the viraemia was relatively short due to the early onset of the immune response. In the 90s, Geevarghese et al. monitored piglets under real

conditions for a longer time and showed a persistence of antibodies detected by HIA for up to three years [61], although this long-lasting immunity may have been due to repeated exposure to JEV, thereby boosting immunity.

### 3.2.3. Clinical Signs

Clinical signs, either in sows or in piglets after experimental virus inoculation or after natural infection, were described in fourteen articles. Detailed methodology of the surveys and their results are provided in Table 3.

One experimental work described JEV-associated sow reproductive failure (Table 2) [51]. Depending on the JEV strain used for sow inoculation, the consequences of experimental infection of seronegative sows ranged from no impact on the litter to reproductive disorders in two out of six sows. Reproductive failure was characterized as presence of mummified or hydrocephalic fetuses in the litters. In both cases, sows developed viraemia and an immune response after infection.

It was shown that experimentally JEV-infected piglets also developed clinical signs. Results of the four concerned studies are summarized in Table 2. Fever was detected one day post-infection and mild neurological signs, such as hind limbs tremor or depression, were observed until a maximum of 10 dpi. All clinical signs disappeared in few days without treatment. No macroscopic lesions were detected, but three articles reported unspecific microscopic lesions on inoculated piglets.

**Table 2.** Sow reproductive disorders after experimental JEV infection and clinical signs and lesions after experimental JEV infection of piglets.

Method	Clinical Signs	Macroscopic Lesions	Microscopic Lesions	Reference
5 pregnant sows, IV inoculation, Fuji strain, bled daily until farrow	No	/	/	[51] 1st experiment
6 pregnant sows, IV inoculation, Kanagawa strain, bled daily until farrow	Mummified and hydrocephalic fetuses in 2/6 litters	/	/	[51] 2nd experiment
14 piglets, IV inoculation, clinical signs monitoring and histopathology after euthanasia	Fever until 4 dpi, depression and hind limbs tremor	No	Non-suppurative encephalitis with perivascular cuffing of mononuclear cells and multifocal gliosis in grey and white matter cerebrum	[62]
10 piglets, intranasal inoculation, clinical signs monitoring and histopathology after euthanasia	Fever until 4 dpi, depression and slight hind limbs tremor on 4 piglets until 10 dpi maximum	No	Non-suppurative encephalitis with perivascular cuffing of lymphocytes, multifocal gliosis, neuronal degeneration, and necrosis	[63]
12 piglets, IV and ID inoculation, clinical signs monitoring, histopathology after euthanasia and RT-PCR on tissues	Fever until 5 dpi, reduce appetite, less manure, and reluctance to move until 6 to 9 dpi	No	Signs of viral meningoencephalomyelitis	[22]
10 piglets, IV inoculation, clinical signs monitoring, histopathology after euthanasia and RT-PCR on tissues	Fever until 5 dpi, mild depression and lethargy until 5 dpi, mild ataxia between 10 and 13 dpi, 2 pigs with hind limb ataxia between 19 and 27 dpi	No	No	[54]

IV—intravenous; ID—intradermal; dpi—day post-infection; RT-PCR—reverse transcription-polymerase chain reaction; /—not investigated.

The clinical impacts of JEV are more difficult observe under field conditions. In seven articles, authors tested tissues of aborted of stillborn piglets in herds with apparent reproductive failure and in

which JEV was suspected. These results are summarized in Table 3. JEV was isolated in 5/37 to 8/8 of the brains of aborted or stillborn piglets. Four articles also gave quantitative information about sow reproductive failure (i.e., the presence of stillborn piglets or aborted or mummified fetuses in one litter) in the affected herds. The authors identified reproductive failure rates ranging from 15% to 36% of the reproductive sows [50,64–66]. Another study based its analysis on breeders' interviews in a herd where anti-JEV antibodies were detected in sows. Information related to reproductive performances were collected (number of piglets born in total and alive in the last litter, occurrence of abortion and birth of stillborn or weak born piglets with or without neurological symptoms). According to farmers, in the first herd, 31 out of 51 sows showed reproductive disorders. The authors then showed a positive correlation between the detection of anti-JEV antibodies (based on Enzyme-Linked Immunosorbent Assays detecting IgG (IgG ELISA) results) and the number of stillborn piglets for sows younger than 1.5 years old [67], suggesting that JEV infection caused both reproductive failure and the appearance of protective antibodies in young pregnant sows.

**Table 3.** Detection of JEV in pig herds with reproductive failure and quantification of reproductive disorders.

Lab Method	Material	Result	Differential Diagnosis Intention	Reproductive Failure	Country	Reference
RT-PCR	Aborted fetuses	Detection	No	No quantitative data	China	[68]
RT-PCR	Sample of 37 CSF of aborted piglets	5/37	No	No quantitative data	China	[69]
ICISM, virus isolation, RT-PCR	Sample of 108 brain tissues of stillborn piglets	20/108	No	No quantitative data	China	[70]
RT-PCR	Sample of 3 brain samples of stillborn piglets	3/3	CSFV, PRRSV, PRV, PPV not detected	30 sows with RF/200 sows (15%)	China	[64]
RT-PCR	31 brain samples of stillborn piglets (all stillborn piglets of the farm)	7/31	No	10 sows with RF/28 sows (36%), 2–5 sb/sow, 31 sb in total	India	[65]
RT-PCR	Sample of 8 brain samples of stillborn piglets	8/8	CSFV, PRRSV, PRV, PPV not detected	37 sows with RF/128 sows (29%)	China	[66]
HIA on body fluids and virus isolation (unspecified method)	Aborted fetuses	Isolation on "some" fetuses	No	50 sows with RF/320 sows (3 farms) (16%)	Japan	[50]

RT-PCR—reverse transcription-polymerase chain reaction; ICISM—intracerebral inoculation of suckling mice; HIA—hemagglutination inhibition assay; CSF—cerebrospinal fluid; CSFV—classical swine fever virus; PRRSV—porcine respiratory syndrome virus; PRV—pseudorabies virus; PPV—porcine parvovirus; sb—stillborn; RF—reproductive failure (abortion or at least one stillborn piglet in the litter).

Two field studies reported clinical signs in piglets potentially induced by JEV. In 2009, piglets developed viral encephalitis and died in a farm in Japan. Seven brains were sampled, in which JEV was detected by RT-PCR [71]. In 2014 in India, a study was conducted in pigs with a history of reproductive failure. Macroscopic and microscopic lesions were detected in association with JEV infection in stillborn piglets, confirmed by RT-PCR [65]. Stillborn piglets showed subcutaneous hemorrhages, hydranencephaly, or swollen brains with dilatation of the ventricular spaces and thinning of the surrounding parenchyma. Histopathology of brain tissue revealed widespread edema, congestion, microhaemorrhages in parenchyma, neuronal degeneration, and accumulation of glial cells. These microscopic lesions were in accordance with the experimental work presented above.

Finally, JEV might cause reproductive problems in boars, but studies are limited. Ogasa et al. detected JEV in the semen of two out of five experimentally inoculated boars by ICISM, and reported a reduced spermatozoal motility and concentration in two other boars [72]. On the other hand, in Teng et al. two out of twelve diseased boars showing testicular swelling tested positive by RT-PCR on seminal fluid [69].

In conclusion, both experimental and field studies showed that the JEV clinical signs mainly consisted of reproductive disorders in females (and to a lesser extent in males), ranging from weak piglet births to abortions. JEV was detected in the brain tissues of infected piglets that developed unspecific signs of encephalitis.

#### 3.2.4. Anti-JEV Maternal Antibodies

The persistence of anti-JEV maternal antibodies in piglets under field conditions was described in four articles. The results are presented in Table 4. All four studies were based on the follow-up of piglets in Japan, Cambodia, and South India. In early studies, anti-JEV maternal antibodies disappeared in piglets aged 1.5 to 4 months [51,73]. These results were confirmed by recent studies that showed a disappearance of anti-JEV maternal antibodies in piglets aged between 2 and 3.5 months [74,75].

**Table 4.** Persistence of anti-JEV maternal antibodies in piglets under field conditions.

Protocol	Test	Average Age of Waning of Anti-JEV Maternal Antibodies	Country	Reference
80 piglets, 2–7 months old, from farms, bled monthly	HIA	>4 months old	Japan	[47]
9 piglets, in mosquito traps, bled monthly	HIA	>1.5 months old	Japan	[47]
2 cohorts of 15 piglets, 2 months old, bled every 10 days for 4 months	IgG ELISA	>3 months old	Cambodia, peri-urban	[74]
2 cohorts of 15 piglets, 2 months old, bled every 10 days for 4 months	IgG ELISA	Peri-urban: >2 months old Rural: >3.5 months old	Cambodia, peri-urban and rural	[75]
5 piglets, 2 months old, bled every month for 3 years	HIA	>2 months old	South India	[61]

HIA—hemagglutination inhibition assay; ELISA—Enzyme-Linked Immunosorbent Assay.

#### 3.2.5. JEV Excretion

Few studies analyzed JEV excretion. Three studies focused on JEV oro-nasal shedding, which may explain the diffusion of JEV in pig herds where they are no or few mosquitoes. Piglets were experimentally infected and monitored for clinical signs, viraemia, excretion, and virus tropism. Viral shedding in nasal secretions was detected by RT-qPCR from 2 to 8 dpi at levels similar to viraemia, i.e., from  $10^1$  to  $10^4$  units/mL, depending on the study [22,23,54]. Authors also reported a prolonged detection of JEV RNA in the tonsils, until at least 28 dpi.

No studies looked for JEV excretion in abortion fluids, whereas the virus was detected in brain tissues of aborted or stillborn piglets (see Table 5). Ricklin et al. detected JEV RNA in urine at a low frequency (in one urine sample of the 28 monitored piglets) [21], and authors suggested tropism differences between JEV and other flaviviruses, such as WNV or dengue virus (DENV) [76,77].

One study detected JEV in seminal fluids of diseased wild boars [69].

### 3.3. JEV Transmission Mechanisms and Patterns and Pig-Related Control

#### 3.3.1. JEV Transmission Mechanisms

To date, two transmission mechanisms of JEV to and between pigs have been studied, i.e., the well-known vector transmission and potential direct transmission through oro-nasal shedding.

##### JEV Vector-Borne Transmission

In 1964, an experimental study analyzed the mosquito-pig and the pig-mosquito transmission [78]. Authors inoculated *Cx. tritaeniorhynchus* mosquitoes with JEV and let them bite pigs with varying anti-JEV antibody titers. Pigs were bled daily before and after their contact with the infected mosquitoes. ICISM tests were performed on blood samples (intracranial inoculation to 3-day-old mice) and virus titer was expressed as a LD<sub>50</sub>. JEV was detected in all pigs except from the one that had the highest anti-JEV antibody titer, showing that the mosquito-pig transmission was effective. While the virus was detected in pigs (during the viraemic period), healthy mosquitoes were allowed to feed on them. Fourteen days later, authors showed the presence of JEV in salivary secretion of these mosquitoes. Anti-JEV antibody-free pigs presented the highest viraemia (log 1.1–2.5 LD<sub>50</sub>) and re-infected 10%–96% of the mosquitoes feeding upon them. These results were confirmed a few years later [52].

More recently, in China, the genomes of JEV strains isolated from pigs and mosquitoes were found to be very similar, demonstrating JEV vector-borne circulation under field conditions [70].

##### JEV Direct Transmission

Besides vector-borne transmission, the three experimental studies showing nasal and oral shedding of JEV presented above (3.2.5. JEV excretion) suggested a risk of direct transmission between pigs [22,23,54]. Table 5 presents the results of two additional studies that showed the effectiveness of this direct transmission. Authors first inoculated piglets with known doses of JEV and put them in contact with naïve ones in absence of mosquitoes [21]. Then, piglets were orally and intra-nasally inoculated with known doses of JEV and monitored [21,63]. In both studies, clinical signs were observed and viraemia and oro-nasal shedding of JEV were detected by RT-PCR. The incubation period for pigs infected by contact was three to five days with respect to the development of viraemia. The incubation period for pigs oro-nasally infected ranged from one to three days depending on the inoculated doses. Viraemia reached 10<sup>3</sup> to 10<sup>4</sup> U/mL, with 1 U corresponding to the RNA quantity found in one 50% tissue culture infective dose (TCID<sub>50</sub>) of a virus preparation they used.

**Table 5.** Experimental evidence of JEV direct transmission between piglets.

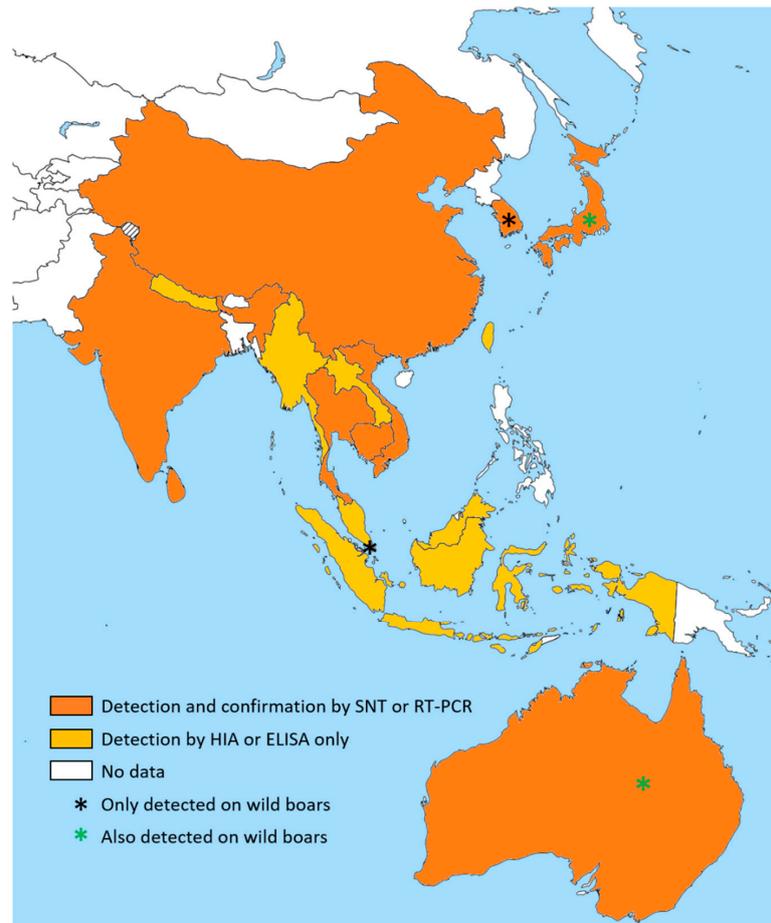
Infection Route	Test for Viraemia and Oro-Nasal Fluids	Clinical Signs	Viraemia	Oro-Nasal Shedding	Reference
Contact with infected pigs in vector-free buildings	RT-PCR	Yes	Yes, 3–10 dac ~ 10 <sup>4</sup> U/mL	Yes, 5–10 dac ~10 <sup>1.5</sup> U/mL	[21] 1 <sup>st</sup> experience
Oro-nasal inoculation	RT-PCR	Yes	Yes, 1–9 dpi ~10 <sup>3.5</sup> U/mL	Yes, 3–9 dpi ~10 <sup>3</sup> U/mL	[21] 2 <sup>nd</sup> experience
Intranasal inoculation	/	Yes	/	/	[63]

dpi—day post-infection; dac—day after contact; RT-PCR—reverse transcription-polymerase chain reaction; /—not investigated.

Furthermore, a recent study suggested that nasal epithelium could be a route of entry and exit for JEV in pigs. As JEV is shed to both the apical and basolateral sides of the epithelial cells, such an infection could mediate virus entry into the host as well as oro-nasal virus spread to other hosts in a manner principally comparable to that of respiratory viruses such as influenza virus [79].

### 3.3.2. Geographical Distribution of JEV in Swine

From 1966 to 2016, the presence of anti-JEV antibodies was reported in swine in seventeen Asian and/or Pacific countries, from India in the west to Japan in the east and from the north of Australia in the south to China in the north (Figure 2). However, since the antibodies detected by either ELISA or HIA might have corresponded to those of other viruses in the same serological complex with JEV, only seroneutralization tests, such as the plaque reduction neutralization test (PRNT), allow the confirmation of true JEV exposure. In some studies, a good consistency between high HIA titer and 50% plaque reduction titer was observed [74,75,80].



**Figure 2.** JEV detection in swine from 1966 to 2016, based on selected studies.

Globally, the prevalence levels ranged from 3.1% to 74% (in Table 6, the prevalence was only calculated if more than 100 swine were tested). In the most recent studies (pigs sampled after 2007), the highest seroprevalences in domestic pigs (>50%) were found in Laos, Cambodia, Vietnam, and India. In Cambodia (2007, [80]) and in Thailand (1983, [81]), seroprevalence detected by HIA was shown to increase with age once piglets had lost their maternal antibodies. However, in Sri Lanka in 1988, authors did not observe any significant correlation between the ages of the sampled animals and the seroprevalence detected by the reference seroneutralization test (SNT) [82].

Few seroprevalence data were reported for China, even though the virus was detected in pigs by RT-PCR on several occasions [64,68–71]. However, in Tibet, three studies reported IgM prevalence levels using capture ELISA ranging from 5% to 33% of the sampled pigs. JEV infection was confirmed by RT-PCR in some of the positive animals, suggesting a relatively high level of the incidence of JEV infection in Tibetan pigs.

**Table 6.** Detection and seroprevalence of JEV in swine in the world.

Sampling Region	Sampling Year	Origin of Sampled Animals (A/F if Pigs)	Age of Sampled Animals	Tested Animals	Serological Test	Anti-JEV Antibodies Evidence	Confirmation Test and Result	Reference	Older References
Australia (T.)	1995	F	NS	90	HIA	63/90	SNT +	[34]	
Australia (T.)	1998	Feral pigs	NS	113	HIA	90/113	nd	[83]	
Cambodia	2007	A and F	~4.3 m (20 d–12 m)	505	HIA and IgG ELISA	65.7% and 63.5%	nd	[80]	[74,75]*
Hong Kong	1968	F	NS	558	HIA	60.4%	nd	[84]	
India	2014	F	>3 m	51	IgG ELISA	35/51	RT-PCR +	[85]	[86–88]
Indonesia	2015	F	NS	80	IgG ELISA	32/80	nd	[89]	[90,91]
Japan (M.)	2008	Wild boars	NS	36	SNT	30/36	SNT +	[92]	[93,94]
Japan (Is.)	2010	F	NS	128	HIA	3.1%	RT-PCR -	[95]	[96,97]**
Japan (Ir.)	2010	Wild boars	NS	117	HIA	44.4%	RT-PCR -	[95]	[98,99]
South-Korea	2011	Wild boars	NS	288	SNT	66%	SNT +	[100]	
Laos	2009	A	4–12 m	727	HIA	74.7%	nd	[101]	
Malaysia	2016	F	NS	90	IgG ELISA	40/90	nd	[31]	[102]
Myanmar	1999	F	NS	36	HIA	12/36	nd	[103]	
Nepal	2010	F	4–48 m	454	IgG ELISA	16.7%	nd	[104]	[105,106]
Singapore	1999	Wild boars	NS	28	HIA	28/28	SNT +	[107]	
Sri Lanka	1988	F	1–24 m	951	SNT	32.6%	SNT +	[82]	
Thailand	1983	A	4–12 m	100	HIA	74%	ICISM +	[81]	[13]
China (Tibet)	2015	A	1–6 m	102	IgM ELISA	nr	RT-PCR +	[108]	[109,110]
Vietnam	2010	A	4–8 m	641	IgG ELISA	60.4%	SNT +	[111]	[67,112–115]
Taiwan	1966	F	3–8 m	6000	HIA	37.3%	nd	[116]	

d—days; m—months; T.—Torres strait, Australia; M.—Main; Is.—Ishigaki; Ir.—Iriomote (Japanese islands); A—abattoir; F—farm; NS—not specified; nr—not relevant as authors looked for IgM; nd—not done. \* more recent longitudinal studies—no measured JEV seroprevalence but JEV confirmed by RT-PCR; \*\* JEV confirmed by either RT-PCR, ICISM, or SNT.

Concerning wild boars and feral pigs, high JEV seroprevalence levels were found in Japan (between 44% ( $n = 117$ ) and 83% ( $n = 36$ )), South Korea (66% ( $n = 288$ )), and Singapore (100% ( $n = 68$ ), last study in 1999). In 1998, anti-flavivirus antibodies were detected by HIA in almost 80% of feral pigs in the north of Queensland, Australia [83]. These feral pigs were sampled during a JE outbreak investigation, suggesting that some of these anti-flavivirus detected antibodies were anti-JEV antibodies and that there may be a link between wildlife and JE circulation. Only SNT tests could confirm this statement. In other countries, the comparison between JEV seroprevalence levels observed in domestic pigs and in wild boars is difficult; in Japan, wild boars and domestic pigs were sampled from different islands, and in South Korea, only wild boars were sampled. In Singapore, however, wild boars were sampled in the same year and the same area as domestic pigs, and both seroprevalences were high (respectively 100% ( $n = 28$ ) and 94% ( $n = 81$ )).

Table 6 summarizes the most recent cross-sectional and longitudinal serological surveys undergone in swine for each country, with older references being indicated in the last column.

### 3.3.3. Epidemiological Patterns

Results of several field studies suggested that either the peak of mosquito abundance or the rise of infected mosquitoes (detection of JEV by ICISM) coincided with the seroconversion period of the pigs (detected by an increase of the proportion of positive pigs for anti-JEV antibodies using HIA) [73,102,117–119] and was linked to the occurrence of clinical signs in humans [14,78,82,113,120,121]. These latter results raised the question of the seasonality of JEV transmission (see Figure 6 in Konno et al. reviewed in Van den Hurk et al. [120,122]).

Seasonality of JEV circulation in pigs was shown either by longitudinal serosurveys (in which pigs were followed-up), or by repeated cross-sectional serosurveys in slaughterhouses or on farms. In the longitudinal studies, depending on the protocol, 2- to 4-month-old piglets were put into pens and blood sampled daily to monthly for four months to two years. In the longest surveys, the piglets were replaced when they seroconverted [14,73–75,78,81,83,117,123–125]. In repeated cross-sectional surveys, pigs aged from four to twelve months were sampled every month in slaughterhouses over one to ten years, depending on the protocol [50,101,102,112,114,118,120,121,126–128], and reproductive sows were sampled monthly on a farm in south Vietnam [67]. These results are presented in Table 7.

Three main epidemiological patterns can be distinguished:

- (i) An endemic pattern with no seasonality, where JE circulation is high all year round, as in Cambodia where two longitudinal surveys showed that all monitored piglets seroconverted in less than four months, regardless of the time of year [74,75].
- (ii) An endemic pattern with seasonality, where JE circulation also occurs all year round but peaks during the hot and rainy seasons, as in north Vietnam [112,114], Laos [101,126], Malaysia [102], Indonesia [125], Thailand (except for the mountainous Chang Mai district) [14,123], and Taiwan [73,78,116].
- (iii) An epidemic pattern, with peaks of JEV transmission separated by periods of non-detection, as in north Australia [83], north India [117], Sri Lanka [82], the Chang Mai district in Thailand [124], and Japan [50,118,120,121,127,128]. In Japan, Konno et al. detailed cyclic outbreaks of JE among swine and human populations linked to vector abundances, which was reviewed in 2009 [120,122].

For the two latter epidemiological patterns, periods of high JE circulation were identified thanks to longitudinal studies; these are given in Table 7. Usually, JEV seroconversion rates peaked during the hot and rainy season. Longitudinal studies showed that during high circulation periods, almost all of the monitored piglets seroconverted against JEV from as early as one week (in Taiwan) to five and a half months (in Indonesia).

**Table 7.** Detected seasonality in JEV infection in pigs.

Country/Region	Sampling Protocol (Longitudinal or Cross-Sectional (Abattoir or Farm))	Detected Seasonality in Pig Infection	Corresponding Climate	References
Cambodia	Longitudinal <sup>1</sup>	All year	Not relevant **	[74,75]
North Vietnam	Abattoir <sup>2</sup>	February–October * January–October *	Summer/rainy season	[114] [112]
South Vietnam	Farms <sup>1</sup>	All year	Not relevant **	[67]
Laos	Abattoir <sup>1</sup>	June–July * August *	Summer/rainy season	[101] [126]
Malaysia	Abattoir <sup>2,3</sup>	November–January *	Summer/rainy season	[102]
Indonesia	Longitudinal <sup>2,4</sup>	October–March *	Summer/rainy season	[125]
Thailand Bangkok	Longitudinal <sup>2,1</sup>	February–May*	Hot and dry season	[14,123]
Chiang Mai	Longitudinal <sup>2,3</sup>	May–July	Hot/rainy season	[124,129]
Taiwan	Longitudinal <sup>2,4</sup>	March–October, peak in August/July*	Summer monsoon	[73,78,116]
Japan, main Island	Abattoir <sup>1,5</sup>	July–November, peak in August/September	Summer (rainfall) to fall (typhoons)	[127]
	Abattoir <sup>2</sup>	June–December		[50]
	Abattoir <sup>2,4</sup>	July–August		[118]
	Abattoir <sup>2</sup>	May–March, peak in August		[120]
Japan, Okinawa	Abattoir <sup>2</sup> Abattoir <sup>2,4</sup>	August April–October	Tropical climate	[121,128]
North East India	Longitudinal <sup>2</sup>	June–August	Monsoon	[117]
Sri Lanka Dry zone	Longitudinal <sup>3</sup>	October–November	Hot/rainy season	[82]
Wet zone		March–April		
North Australia	Longitudinal <sup>2,3</sup>	February–April	Hot/rainy season	[83]

\* Period of highest detected circulation, but circulation all year around; <sup>1</sup>ELISA; <sup>2</sup>HIA; <sup>3</sup>SNT; <sup>4</sup>ICISM; \*\* Not relevant because there is no seasonality.

In the 90s, in north Vietnam, two studies showed periodic variations of JEV seroprevalence in pigs (higher circulation in the wet and hot season), suggesting a seasonal circulation of JEV [112,114]. These results contrasted with those obtained in south Vietnam (Mekong delta), where a recent study did not identify any correlation between JEV seroprevalence in sows and season [67]. In Thailand, JE seasonality was reported to be much more marked in the Chiang Mai district [124], 700 km north from Bangkok, than in Bangkok; JE circulation in pigs was detected only from March to December (reaching 90% of JEV seroconversion between May and July), while circulation was detected all year round in Bangkok district [78,123]. In Taiwan, it is believed that the circulation of JE also occurs in winter, since Chan et al. detected HIA antibodies in 15.6% of 5-month-old pigs raised in winter, suggesting that this prevalence was not of maternal origin but due to a slight circulation [116].

Besides these temporal patterns, the intensity of JEV circulation also varies with the landscape. *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, and *Culex quinquefasciatus*, the main vectors of JEV, are rural mosquito species that are mainly distributed in rice field agroecosystems of Asian countries, flooded either by rain or irrigation [11,122,130–137]. For this reason, JEV seroprevalence studies were mainly conducted in swine reared in (or close to) such ecosystems. In such contexts, JEV seroprevalence was shown to be potentially very high, with values ranging from about 40% in Indonesia to more than 75% of HIA- or ELISA-positive results (confirmed by SNT) in Hong Kong or Laos [31,34,84,85,89,101,103,104,116]. These high prevalence levels led to JE being considered mainly a rural disease, and proximity to rice fields and pig rearing, particularly backyard farming, were identified as major risk factors of JE in humans [89].

However, several studies conducted in Taiwan [116], Thailand [14,81], Hong Kong [84], Japan [128], and more recently in Cambodia [74,75], Vietnam [113,115], and Malaysia [31] showed that JEV can also circulate in swine in peri-urban or even urban areas. The JEV seroprevalence values ranged from 26.5% to more than 90% of HIA- or IgG ELISA-positive results in cross-sectional studies, and seroconversion rates reached 100% of the monitored piglets in longitudinal studies performed in Cambodia. These observations suggest the implication of other vectors and/or other host species in the corresponding epidemiological systems.

#### 3.3.4. Pig-Related JEV Control

Pig-related control measures have already been reviewed elsewhere [20,138,139]. Both JEV inactivated and live-attenuated vaccines derived from cell cultures are used, and pig vaccination has been reported in Japan, Nepal, Taiwan, and South Korea, but to a limited extent and only in order to protect pregnant sows from reproductive disorders [140]. Human vaccines are widely used [141,142], and mass vaccination program in humans were put into place in several countries, such as Japan, South Korea, and Taiwan, where programs are long-lasting and of high quality, or Nepal, Malaysia, India, Sri Lanka, Thailand, Vietnam, and China, where programs are emerging [1]. In the animal sector, vaccine development and vaccine program implementation are more limited [48,143,144], except in South Korea where a vaccination program in swine with a live-attenuated vaccine has been implemented over the last 30 years, reducing the prevalence of the disease in pigs [145,146].

In our selection, two articles reported the impact of JEV vaccination on the frequency of reproductive failure in sows. The effectiveness of JEV vaccination on reproduction was first shown in 1971 in the field by monitoring vaccinated and unvaccinated groups of sows. The vaccinated group presented two times less abnormal farrows (partial or total abortion or stillbirths), fewer malformed or stillborn piglets (1%–7% against 31%–54% in the unvaccinated group), and larger litters (two to three more piglets by litter) [147]. In experimental conditions, vaccination protected against fetus mummification [49].

Three surveys suggested that JEV pig vaccination interfered with the JEV epidemiological cycle, thereby reducing the impact of JE on public health. A live-attenuated vaccine with Freund's complete adjuvant showed a drastic decrease in viraemia in piglets [60,148]. A few years later, the live-attenuated vaccine was confirmed to reduce viraemia and prevent mosquito re-infection in pigs [48,147]. However, the impact of mass vaccination in pigs on human disease has not been demonstrated yet. In South Korea, after 30 years of the JEV vaccination program in swine, outbreaks in humans were still not prevented [145].

## 4. Discussion

This review confirmed that pigs are central in JE epidemiology, not only for virus maintenance and amplification, but also in transmission to humans. Pigs develop high levels of viraemia that last for two to four days and attract JE vectors, and the rapid turnover of piglets in any kind of pig farming induces a permanently high proportion of susceptible individuals that facilitate JEV circulation. Moreover, pig farms are often located close to human dwellings, especially with backyard farming, which is common in Asia; this proximity facilitates human infection.

From 1966 to 2016, the presence of anti-JEV antibodies was reported in swine in seventeen Asian and/or Pacific countries, with seroprevalence levels ranging from 3.1% to 74%. Although the diversity of study areas, periods, and protocols partly explain this wide interval, the reported seroprevalence levels are difficult to compare due to the variety of the serological tests used and the lack of specificity of some of these tests. Indeed, the reference technique for the serological diagnosis of flavivirus infections is SNT [122]. Only a few cross-sectional surveys selected in this review used SNT to confirm that the flavivirus they detected (either by HIA or ELISA) was JEV [34,35,82,96,102,105,111]. In the remaining studies, authors used HIA or IgG ELISA. HIA exploits the ability of viral envelope proteins to aggregate erythrocytes in the absence of neutralizing envelope antibodies, and is subject to many

cross-reactivities in the JEV serocomplex and with other flaviviruses due to the type of antigen used [149]. Similarly, ELISA tests, which are based on a colorimetric reaction for which the color intensity is related to the antibody concentration, are specific to flaviviruses but not exclusively to JEV, depending of the type of antigen used [150]. Moreover, although all of the selected HIA studies used the same technique [149], many ELISA kits are available and were used in the published surveys. Flaviviruses other than JEV, such as WNV and DENV, are known to circulate in JEV-infected countries [151]. This co-circulation poses a diagnostic challenge due to antibody cross-reactivity within and between the different serocomplexes [53,152–159]. Thus, confirming HIA- and ELISA-positive results via SNT appears essential in the proper evaluation of JEV seroprevalence [160]. It is also worth noting that, although it is the reference test, SNT may be subject to limited cross-reactions within the serocomplex of Japanese encephalitis. This sometimes requires testing other flaviviruses (such as WNV and DENV) in parallel to JEV, and the implementation of a decision algorithm based on the SNT titers, in order to identify the flavivirus to which the animals were exposed [150]. This complex confirmation procedure was used in few selected studies [34,82,111]. High-quality data on the seroprevalence and incidence of JE are thus lacking in various countries, and there is a real need for research efforts into virological and serological methods for diagnosis and monitoring of JE.

JE is often described as a significant cause of reproductive disorders in sows and boars. Only one experimental study provided evidence of the impact of JEV infection on sows [51]. The reproductive impact of JEV appears difficult to quantify under field conditions, and statistical correlations between JEV infection and reproductive failure are rarely investigated. Moreover, the frequency of reproductive disorders appears to be linked to the epidemiological pattern of JEV. In endemic areas with no marked seasonality, year-round contact of swine with the virus leads to immunity in most gilts before sexual maturity; JEV infection in pigs is consequently of minor importance on reproductive performance [67]. Under seasonal transmission conditions, sows are more likely to present reproductive disorders if they are still susceptible when they reach sexual maturity. These observations might affect the pig-related control strategies that are discussed below.

Several experimental studies showed that domestic pigs developed high viraemia, allowing for pig–mosquito–pig transmission [22,47,54]. Several surveys showed that the primary JEV vectors *Cx. tritaeniorhynchus*, *Culex vishnui*, and *Cx. gelidus* have a trophic preference for cows and pigs [161–165]. However, the two former species often showed higher rates of blood feeding on pigs than on cows, probably due to their plasticity to host availability, since in rural areas, pigs are often more abundant than cows [166]. Moreover, the number of susceptible pigs is always large due to a large turnover stemming from the breeding system. Finally, pig farming in Asia is often backyard breeding, which situates pigs very close to human dwellings. All these elements support the major importance of pigs in the JEV transmission cycle.

However, recent studies suggested that other JE epidemiological systems may exist with small or no implications resulting from the domestic pig. First, autochthonous human JEV cases occurred in Seoul, South Korea, even though no pigs are reared in the city [26]. In 2013, in China, Teng et al. isolated JEV in mosquitoes, humans, and pigs, and showed that the same strain was identified in mosquitoes and human, but not in pigs [69]. Finally, two studies, one being very recent, showed that JEV continued to circulate decades after the abolition of pig farming on Singapore Island [35,167].

It is generally considered that Ardeid birds, such as egrets and herons, are the wild reservoir hosts [168–173]. However, little recent evidence of this statement is available [18,168,174]. Several surveys or observations showed that other species, such as domestic birds, are exposed, and suggested that secondary reservoirs may be involved in JEV circulation. In the 60s, Gresser et al. discussed the potential implication of domestic birds in the JEV cycle in addition to pigs [175]. More recently, domestic birds have been shown to be exposed to JEV in Nepal and Cambodia, as antibodies were detected by both ELISA and SNT [106,176]. Anti-flavivirus antibodies were also detected in domestic birds in Malaysia, suggesting possible JEV circulation [31]. Experimental studies

showed that inoculated ducks and chicken developed different levels of JE viraemia, probably high enough to re-infect mosquitoes [24,177].

The question of a non-avian wild reservoir for JEV has never really been assessed, while Southeast Asia hosts the highest wild pig (Suidae family) diversity in the world [178]. As presented above, wild boars were shown to be highly exposed to JEV on two Japanese islands, with the virus genome showing a high homology with JEV that was previously isolated from pigs reared on another Japanese island. The detection of JEV RNA and anti-flavivirus IgG antibodies in wild boars suggested that they could act as additional reservoirs in rural and forest areas [99]. In the north of Queensland, Australia, cross-reacting anti-flavivirus antibodies were detected in almost 80% of feral pigs during a JE outbreak, and the authors suggested that they possible became amplifying hosts [83].

JE was traditionally considered a rural disease. However, several surveys showed that the virus could be transmitted in peri-urban and urban areas, suggesting the presence in these areas of mosquito species able to transmit JEV. That could be the case for *Cx. quinquefasciatus*, which is anthropophilic and competent for JEV transmission [179,180]. *Cx. tritaeniorhynchus*, *Cx. gelidus*, and *Cx. quinquefasciatus* were also trapped in urban households in Vietnam, regardless of whether or not there were pigs in the area [181]. In peri-urban areas, people do not traditionally rear large numbers of pigs or domestic birds. However, increasing urbanization is likely to increase pig numbers on farms, as well as the numbers of farms close to urban areas, thus bringing human and pig JEV-susceptible populations into close proximity with each other. Thus, there is a need to improve our knowledge of the JEV transmission cycle that may not be as simple as we think it is. The existence of secondary reservoirs could explain JEV transmission in areas with no or low pig density, which is the case in some urban or peri-urban areas in Cambodia or Laos for example, or in mountainous areas [108,110,167,182].

JE is primarily a vector-borne disease, but recent surveys suggested that direct transmission from pigs to pigs could occur [21,63]. Two additional in silico studies performed with Cambodian and Hong Kong data showed that incorporating direct transmission in models allowed a better fit to be observed from the serological data than a vector-borne transmission model alone [183,184]. The reemergence of JEV cases in the same locations from one year to another indicates that JEV can overwinter locally [50]. Among others, direct transmission could explain the overwintering of JEV in pig herds in epidemic or endemic regions where JEV transmission and human cases are seasonal [21].

Human vaccines are widely used in humans [141,142], and mass vaccination programs were put into place in several countries, such as Japan, South Korea, and Taiwan, where the programs are long-lasting and of high quality, or Nepal, Malaysia, India, Sri Lanka, Thailand, Vietnam, and China, where programs are emerging [1]. As humans are dead-end hosts, human vaccination alone cannot stop virus circulation. Moreover, human cases may re-occur in case of vaccination failure or the emergence of a new strain for which the current vaccine is not effective. JE did re-emerge in South Korea (2010–2015) after a mass vaccination program, which was presumed to have failed to induce lifelong immunity, so older age groups became susceptible again [185]. Vaccines are also expensive, require multiples doses, and remote and/or poor people may not be able to afford them. Additionally, some of these human vaccines may not be 100% effective, as demonstrated in Tandale et al. [186].

Pig vaccination could be used as an alternative to control JEV circulation. Vaccinating pigs not only protects them from possible reproductive disorders, but also helps to break the transmission cycle, thus reducing the impact on human health. In northern Bangladesh, Khan et al. built a compartmental model to describe JEV transmission dynamics in this region and to estimate the potential impact of pig vaccination. They showed that vaccinating 50% of the total pig population each year would result in an 82% reduction in the annual incidence of JE infection in pigs [187]. Vaccines are widely used in Japan, Taiwan, and South Korea, where the incidence of disease in swine has been reduced thanks to the use of a live-attenuated strain (Anyang300) conducted throughout these countries for the past 30 years [145,146,188].

In epidemic or endemic areas with seasonality patterns, the birth season of pigs has an influence on the age at which pigs get infected by JEV, thereby determining the existence or not of

reproductive disorders. In northern Vietnam where the transmission peak occurs between July and September, Ruget et al. used temperature and pig serological data to predict the age of initial JEV infection. Pigs born at the end of the winter become susceptible to JEV infection during the period of high circulation and before reaching sexual maturity. On the other hand, pigs born later during the summer are protected by their maternal antibodies during the transmission peak season. They lose their maternal anti-JEV antibodies and thus become susceptible again during winter, when vector abundance is very low. According to authors, around 20% of these pigs did not infected with JEV before 8 months, thus experienced reproduction disorders when getting infected during the following summer. These animals (born between July and September) should be targeted for vaccination [111].

However, pig vaccination has several limitations:

- (i) The large South Korean vaccination program has not prevented outbreaks in the human population in recent years [145];
- (ii) Whatever the pig production system and the socio-economical context, the turnover of pig populations is always rapid and therefore the cost of vaccination is high;
- (iii) JEV may still circulate within vaccinated pig populations [144];
- (iv) Pig vaccines are based on GIII viruses, the dominant circulating genotype in Asia. However, there are now several studies showing the replacement of GIII by GI that could negatively modify the effectiveness of current vaccines [113,189,190]. JEV was indeed detected in vaccinated populations in aborted fetuses and stillborn piglets in China [68,70]. The authors warned against a potential lack of effectiveness of the vaccine and suggested that the safety of the SA14-14-2 strain belonging to GIII, which is used for vaccine development in pigs, should be reassessed;
- (v) The currently available vaccines do not confer full protection against the emerging JEV GV strain [191,192].

Finally, the fact that the cycle, at least in some regions, is much more complex (multi-host without or with a weak implication of domestic pig), suggests that a single pig vaccination would not solve the problem directly either [193].

Modeling studies were conducted to test new alternative control measures, such as pig herd management. Indeed, the intensity of transmission within a herd depends on the proportion of susceptible and immune animals, and therefore partly depends on the management of the herd. Depending on pig herd size and herd management practices, the proportion of immune pigs within a herd may vary and favor or reduce viral circulation between pigs. For example, the synchronization of piglet birth, which is common in semi-commercial and commercial pig herds, induces regular bursts of susceptible animals when these piglets lose their anti-JEV maternal antibodies. Increasing the duration between two successive litters, which could be controlled through insemination synchronization, would possibly prevent JEV circulation between successive piglet births [194].

As JEV is mainly a vector-borne disease, an alternative to vaccination exists in vector control. Insecticide spray for adults, larvicides such as *Bacillus thuringiensis* toxin for juvenile stages, extracts of *Piper retrofractum* (Piperaceae), or essential oils as oviposition deterrents are techniques that have been used previously [195–197]. Another option which is already used in some Cambodian rural areas is to cover pigpens with mosquito nets. The use of insecticide-treated mosquito nets was shown to reduce seroconversion rate in humans and pigs in India [198].

In conclusion, this review underlines that JEV epidemiological patterns vary according to the region. Pigs, when present, play a central role, but other hosts may also be involved, such as wild boars or domestic birds. Human vaccination remains the most effective way to protect human populations, but it does not stop the circulation of the virus. It is therefore also necessary to act on the reservoir–mosquito cycle and to adapt existing measures according to the functioning of this multi-host system.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/1999-4915/11/10/949/s1>, File S1: Variability of the JEV diagnostic tests for pigs.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.L., B.D., and V.C.; methodology, H.L., B.D., and V.C.; validation, H.L., B.D., and V.C.; formal analysis, H.L.; investigation, H.L.; resources, B.D. and V.C.; data curation, H.L.; writing—original draft preparation, H.L.; writing—review and editing, H.L., B.D., V.C., and P.D.; visualization, H.L.; supervision, B.D. and V.C.; project administration, B.D. and V.C.

**Funding:** This research was funded by the French Ministry of Agriculture.

**Acknowledgments:** We are grateful to Cecile Beck and Sylvie Lecollinet from the Virology Unit of the Laboratory for Animal Health, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), Maisons-Alfort, France, for helping in the data collection related to diagnostic tests.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

- Campbell, G.L.; Hills, S.L.; Fischer, M.; Jacobson, J.A.; Hoke, C.H.; Hombach, J.M.; AMarfin, A.; Solomon, T.; Tsai, T.F.; Tsu, V.D.; et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: A systematic review. *Bull. World Health Organ.* **2011**, *89*, 766–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Fischer, M.; Hills, S.; Staples, E.; Johnson, B.; Yaich, M.; Solomon, T. Japanese Encephalitis Prevention and Control: Advances, Challenges, and New Initiatives. *Emerg. Infect.* **2008**, *8*, 93–124.
- Simon-Loriere, E.; Faye, O.; Prot, M. Autochthonous Japanese Encephalitis with Yellow Fever Coinfection in Africa. *N. Engl. J. Med.* **2017**, *376*, 1483–1485. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Le Flohic, G.; Gonzalez, J.-P. When Japanese Encephalitis Virus Invaded Eastern Hemisphere—The History of the Spread of Virus Genotypes. In *Flavivirus Encephalitis*; Ruzek, D., Ed.; InTech: London, UK, 2011. [[CrossRef](#)]
- Wang, H.; Liang, G. Epidemiology of Japanese encephalitis: Past, present, and future prospects. *Ther. Clin. Risk Manag.* **2015**, *11*, 435–448. [[PubMed](#)]
- Duong, V.; Choeung, R.; Gorman, C.; Laurent, D.; Crabol, Y.; Mey, C.; Peng, B.; Di Francesco, J.; Hul, V.; Sothy, H.; et al. Isolation and full-genome sequences of Japanese encephalitis virus genotype I strains from Cambodian human patients, mosquitoes and pigs. *J. Gen. Virol.* **2017**, *98*, 2287–2296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- De Wispelaere, M.; Desprès, P.; Choumet, V. European *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* Are Competent Vectors for Japanese Encephalitis Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005294. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huber, K.; Jansen, S.; Leggewie, M.; Badusche, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Becker, N.; Tannich, E.; Becker, S.C. *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae) from Germany have vector competence for Japan encephalitis virus but are refractory to infection with West Nile virus. *Parasitol. Res.* **2014**, *113*, 3195–3199. [[CrossRef](#)]
- Turell, M.J.; Mores, C.N.; Dohm, D.J.; Komilov, N.; Paragas, J.; Lee, J.S.; Shermuhemedova, D.; Endy, T.P.; Kodirov, A.; Khodjaev, S. Laboratory Transmission of Japanese Encephalitis and West Nile Viruses by Molestus Form of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) Collected in Uzbekistan in 2004. *J. Med. Entomol.* **2006**, *43*, 296–300. [[CrossRef](#)]
- Olson, J.G.; Ksiazek, T.G.; Tan, R.; Atmosoedjono, S.; Lee, V.H.; Converse, J.D. Correlation of population indices of female *Culex tritaeniorhynchus* with Japanese encephalitis viral activity in Kapuk, Indonesia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **1985**, *16*, 337–342.
- Rajavel, A.R.; Kumar, N.P.; Natarajan, R.; Vanamail, P.; Rathinakumar, A.; Jambulingam, P. Morphological and molecular characterization of the ecological, biological and behavioural variants of the JE vector *Culex tritaeniorhynchus*: An assessment of its taxonomic status. *J. Vector Borne Dis.* **2015**, *52*, 40–51.
- Lord, J.S.; Al-Amin, H.M.; Chakma, S.; Alam, M.S.; Gurley, E.S.; Pulliam, J.R.C. Sampling Design Influences the Observed Dominance of *Culex tritaeniorhynchus*: Considerations for Future Studies of Japanese Encephalitis Virus Transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gajanana, A.; Rajendran, R.; Samuel, P.P.; Thenmozhi, V.; Tsai, T.F.; Kimura-Kuroda, J.; Reuben, R. Japanese Encephalitis in South Arcot District, Tamil Nadu, India: A Three-Year Longitudinal Study of Vector Abundance and Infection Frequency. *J. Med. Entomol.* **1997**, *34*, 651–659. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Gingrich, J.B.; Nisalak, A.; Latendresse, J.R.; Pomsdhit, J.; Paisansilp, S.; Hoke, C.H.; Chantalakana, C.; Satayaphantha, C.; Uechiewcharnkit, K. A longitudinal study of Japanese encephalitis in suburban Bangkok, Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **1987**, *18*, 558–566.

15. Nyari, N.; Singh, D.; Kakkar, K.; Sharma, S.; Pandey, S.N.; Dhole, T.N. Entomological and serological investigation of Japanese encephalitis in endemic area of eastern Uttar Pradesh, India. *J. Vector Borne Dis.* **2015**, *52*, 321–328.
16. Buescher, E.L.; Scherer, W.F.; McCluse, H.; Moyer, J.T.; Rosenberg, M.Z.; Yoshii, Y.; Okada, Y. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1959**, *8*, 678–688. [[CrossRef](#)]
17. Scherer, W.F.; Moyer, J.T.; Izumi, T.; Gresser, I.; McCown, J. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1959**, *8*, 644–650. [[CrossRef](#)]
18. Soman, R.S.; Rodrigues, F.M.; Guttikar, S.N.; Guru, P.Y. Experimental viraemia and transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes in ardeid birds. *Indian J. Med. Res.* **1977**, *66*, 709–718.
19. Le Flohic, G.; Porphyre, V.; Barbazan, P.; Gonzalez, J.-P. Review of Climate, Landscape, and Viral Genetics as Drivers of the Japanese Encephalitis Virus Ecology. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2208. [[CrossRef](#)]
20. Impoinvil, D.E.; Baylis, M.; Solomon, T. Japanese encephalitis: On the One Health agenda. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **2013**, *365*, 205–247.
21. Ricklin, M.E.; García-Nicolás, O.; Brechbühl, D.; Python, S.; Zumkehr, B.; Nougairede, A.; Charrel, R.N.; Posthaus, H.; Oevermann, A.; Summerfield, A. Vector-free transmission and persistence of Japanese encephalitis virus in pigs. *Nat. Commun.* **2016**, *7*, 10832. [[CrossRef](#)]
22. Ricklin, M.E.; García-Nicolás, O.; Brechbühl, D.; Python, S.; Zumkehr, B.; Posthaus, H.; Oevermann, A.; Summerfield, A. Japanese encephalitis virus tropism in experimentally infected pigs. *Veter Res.* **2016**, *47*, 34. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lyons, A.C.; Huang, Y.-J.S.; Park, S.L.; Ayers, V.B.; Hettenbach, S.M.; Higgs, S.; McVey, D.S.; Noronha, L.; Hsu, W.-W.; VanLandingham, D.L. Shedding of Japanese Encephalitis Virus in Oral Fluid of Infected Swine. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 469–474. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Cleton, N.B.; Page, M.J.; Bowen, R.A.; Bosco-Lauth, A. Age-Related Susceptibility to Japanese Encephalitis Virus in Domestic Ducklings and Chicks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 242–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Nemeth, N.; Bosco-Lauth, A.; Oesterle, P.; Kohler, D.; Bowen, R. North American Birds as Potential Amplifying Hosts of Japanese Encephalitis Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *87*, 760–767. [[CrossRef](#)]
26. Bae, W.; Kim, J.H.; Kim, J.; Lee, J.; Hwang, E.S. Changes of Epidemiological Characteristics of Japanese Encephalitis Viral Infection and Birds as a Potential Viral Transmitter in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **2018**, *33*, 33. [[CrossRef](#)]
27. Adi, A.A.A.M.; Astawa, N.M.; Damayanti, P.A.A.; Kardena, I.M.; Erawan, I.G.M.K.; Suardana, I.W.; Putra, I.G.A.A.; Matsumoto, Y. Seroepidemiological Evidence for the Presence of Japanese Encephalitis Virus Infection in Ducks, Chickens, and Pigs, Bali-Indonesia. *Bali Med. J.* **2016**, *5*, 189.
28. Shimoda, H.; Ohno, Y.; Mochizuki, M.; Iwata, H.; Okuda, M.; Maeda, K. Dogs as Sentinels for Human Infection with Japanese Encephalitis Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1137–1139. [[CrossRef](#)]
29. Shimoda, H.; Tamaru, S.; Morimoto, M.; Hayashi, T.; Shimojima, M.; Maeda, K. Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs. *J. Veter Med. Sci.* **2011**, *73*, 1241–1242. [[CrossRef](#)]
30. Wang, J.-L.; Pan, X.-L.; Zhang, H.-L.; Fu, S.-H.; Wang, H.-Y.; Tang, Q.; Wang, L.-F.; Liang, G.-D. Japanese Encephalitis Viruses from Bats in Yunnan, China. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 939–942. [[CrossRef](#)]
31. Kumar, K.; Arshad, S.S.; Selvarajah, G.T.; Abu, J.; Toung, O.P.; Abba, Y.; Bande, F.; Yasmin, A.R.; Sharma, R.; Ong, B.L.; et al. Prevalence and risk factors of Japanese encephalitis virus (JEV) in livestock and companion animal in high-risk areas in Malaysia. *Trop. Anim. Health Prod.* **2018**, *50*, 741–752. [[CrossRef](#)]
32. Kako, N.; Suzuki, S.; Sugie, N.; Kato, T.; Yanase, T.; Yamakawa, M.; Shirafuji, H. Japanese encephalitis in a 114-month-old cow: Pathological investigation of the affected cow and genetic characterization of Japanese encephalitis virus isolate. *BMC Vet. Res.* **2014**, *10*, 63. [[CrossRef](#)]
33. Katayama, T.; Saito, S.; Horiuchi, S.; Maruta, T.; Kato, T.; Yanase, T.; Yamakawa, M.; Shirafuji, H. Nonsuppurative Encephalomyelitis in a Calf in Japan and Isolation of Japanese Encephalitis Virus Genotype 1 from the Affected Calf. *J. Clin. Microbiol.* **2013**, *51*, 3448–3453. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Hanna, J.N.; Ritchie, S.A.; Phillips, D.A.; Shield, J.; Bailey, M.C.; Mackenzie, J.S.; Poidinger, M.; McCall, B.J.; Mills, P.J. An outbreak of Japanese encephalitis in the Torres Strait, Australia, 1995. *Med. J. Aust.* **1996**, *165*, 256–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ting, S.H.L.; Tan, H.C.; Wong, W.K.; Ng, M.L.; Chan, S.H.; Ooi, E.E. Seroepidemiology of neutralizing antibodies to Japanese encephalitis virus in Singapore: Continued transmission despite abolishment of pig farming? *Acta Trop.* **2004**, *92*, 187–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

36. Lian, W.-C.; Liau, M.-Y.; Mao, C.-L.; Lian, W.; Liau, M.; Mao, C. Diagnosis and Genetic Analysis of Japanese Encephalitis Virus Infected in Horses. *J. Veter Med. Ser. B* **2002**, *49*, 361–365. [[CrossRef](#)]
37. Gulati, B.R.; Singha, H.; Singh, B.K.; Virmani, N.; Kumar, S.; Singh, R.K. Isolation and genetic characterization of Japanese encephalitis virus from equines in India. *J. Veter Sci.* **2012**, *13*, 111–118. [[CrossRef](#)]
38. Baharuddin, A.; Hassan, A.A.; Sheng, G.C.; Nasir, S.B.; Othman, S.; Yusof, R.; Othman, R.; Rahman, N.A. Current approaches in antiviral drug discovery against the Flaviviridae family. *Curr. Pharm. Des.* **2014**, *20*, 3428–3444. [[CrossRef](#)]
39. Liberati, A.; Altman, D.G.; Tetzlaff, J.; Mulrow, C.; Gøtzsche, P.C.; Ioannidis, J.P.; Clarke, M.; Devereaux, P.; Kleijnen, J.; Moher, D. The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate health care interventions: Explanation and elaboration. *J. Clin. Epidemiol.* **2009**, *62*, e1–e34. [[CrossRef](#)]
40. Yang, D.-K.; Kweon, C.-H.; Kim, B.-H.; Lim, S.-I.; Kim, S.-H.; Kwon, J.-H.; Han, H.-R. TaqMan reverse transcription polymerase chain reaction for the detection of Japanese encephalitis virus. *J. Veter Sci.* **2004**, *5*, 345–351. [[CrossRef](#)]
41. Ogawa, H.; Taira, O.; Hirai, T.; Takeuchi, H.; Nagao, A.; Ishikawa, Y.; Tuchiya, K.; Nunoya, T.; Ueda, S. Multiplex PCR and multiplex RT-PCR for inclusive detection of major swine DNA and RNA viruses in pigs with multiple infections. *J. Virol. Methods* **2009**, *160*, 210–214. [[CrossRef](#)]
42. Patel, P.; Landt, O.; Kaiser, M.; Faye, O.; Koppe, T.; Lass, U.; Sall, A.A.; Niedrig, M. Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses. *Virol. J.* **2013**, *10*, 58. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Eldadah, Z.A.; Asher, D.M.; Godec, M.S.; Pomeroy, K.L.; Goldfarb, L.G.; Feinstone, S.M.; Levitan, H.; Gibbs, C.J.; Gajdusek, D.C. Detection of flaviviruses by reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *J. Med. Virol.* **1991**, *33*, 260–267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Hierholzer, J.C.; Killington, R.A. 2-Virus isolation and quantitation. In *Virology Methods Manual*; Mahy, B.W., Kangro, H.O., Eds.; Academic Press: London, UK, 1996; pp. 25–46.
45. Chernesky, M.A. 6-Traditional serological tests. In *Virology Methods Manual*; Mahy, B.W., Kangro, H.O., Eds.; Academic Press: London, UK, 1996; pp. 107–122.
46. Yonemitsu, K.; Minami, S.; Noguchi, K.; Kuwata, R.; Shimoda, H.; Maeda, K. Detection of anti-viral antibodies from meat juice of wild boars. *J. Vet. Med Sci.* **2019**, *81*, 155–159. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Scherer, W.F.; Moyer, J.T.; Izumi, T. Immunologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. V. Maternal antibodies, antibody responses and viremia following infection of swine. *J. Immunol.* **1959**, *83*, 620–626.
48. Sasaki, O.; Karoji, Y.; Kuroda, A.; Karaki, T.; Takenokuma, K.; Maeda, O. Protection of pigs against mosquito-borne Japanese encephalitis virus by immunization with a live attenuated vaccine. *Antivir. Res.* **1982**, *2*, 355–360. [[CrossRef](#)]
49. Imoto, J.-I.; Ishikawa, T.; Yamanaka, A.; Konishi, M.; Murakami, K.; Shibahara, T.; Kubo, M.; Lim, C.-K.; Hamano, M.; Takasaki, T.; et al. Needle-free jet injection of small doses of Japanese encephalitis DNA and inactivated vaccine mixture induces neutralizing antibodies in miniature pigs and protects against fetal death and mummification in pregnant sows. *Vaccine* **2010**, *28*, 7373–7380. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Takashima, I.; Hashimoto, N.; Watanabe, T.; Ouchi, N. Ecological Studies of Japanese Encephalitis Virus in Hokkaido: Interepidemic Outbreaks of Swine Abortion and Evidence for the Virus to Overwinter Locally. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1988**, *38*, 420–427. [[CrossRef](#)]
51. Shimizu, T.; Kawakami, Y.; Fukuhara, S.; Matumoto, M. Experimental stillbirth in pregnant swine infected with Japanese encephalitis virus. *Jpn. J. Exp. Med.* **1954**, *24*, 363–375.
52. Carey, D.E.; Reuben, R.; Myers, R.M. Japanese encephalitis studies in Vellore, South India. V. Experimental infection and transmission. *Indian J. Med Res.* **1969**, *57*, 282–289.
53. Williams, D.T.; Alunt, R.; Wang, L.F.; Daniels, P.W.; Newberry, K.M.; MacKenzie, J.S. Experimental infections of pigs with Japanese encephalitis virus and closely related Australian flaviviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2001**, *65*, 379–387. [[CrossRef](#)]
54. Park, S.L.; Huang, Y.-J.S.; Lyons, A.C.; Ayers, V.B.; Hettenbach, S.M.; McVey, D.S.; Burton, K.R.; Higgs, S.; VanLandingham, D.L. North American domestic pigs are susceptible to experimental infection with Japanese encephalitis virus. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 7951. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

55. Gallardo, C.; Soler, A.; Nieto, R.; Sánchez, M.A.; Martins, C.; Pelayo, V.; Carrascosa, A.; Revilla, Y.; Simon, A.; Briones, V.; et al. Experimental Transmission of African Swine Fever (ASF) Low Virulent Isolate NH/P68 by Surviving Pigs. *Transbound. Emerg. Dis.* **2015**, *62*, 612–622. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Anderson, E. African swine fever: Current concept on its pathogenesis and immunology. *Rev. Sci. Tech.* **1986**, *5*, 477–486. [[CrossRef](#)]
57. Beltran-Alcrudo, D.; Arias, M.; Gallardo, C.; Kramer, S.A.; Penrith, M.-L. *African Swine Fever: Detection and Diagnosis: A Manual for Veterinarians*; Food and Agriculture Organization of the United Nations: Rome, Italy, 2017.
58. Gong, W.; Li, J.; Wang, Z.; Sun, J.; Mi, S.; Lu, Z.; Cao, J.; Dou, Z.; Sun, Y.; Wang, P.; et al. Virulence evaluation of classical swine fever virus subgenotype 2.1 and 2.2 isolates circulating in China. *Veter Microbiol.* **2019**, *232*, 114–120. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Durand, B.; Davila, S.; Cariolet, R.; Mesplède, A.; Le Potier, M.-F. Comparison of viraemia- and clinical-based estimates of within- and between-pen transmission of classical swine fever virus from three transmission experiments. *Veter Microbiol.* **2009**, *135*, 196–204. [[CrossRef](#)]
60. Ueba, N.; Maeda, A.; Otsu, K.; Mitsuda, B.; Kimoto, T. Natural infection of swine by Japanese encephalitis virus and its modification by vaccination. *Biken J. J. Res. Inst. Microb. Dis.* **1972**, *15*, 67–79.
61. Geevarghese, G.; Shaikh, B.H.; Jacob, P.G.; Bhat, H.R. Persistence of haemagglutination-inhibition antibodies to JE and WN viruses in naturally infected domestic pigs in Karnataka State, India. *Acta Virol.* **1994**, *38*, 235–237.
62. Nakamura, K.; Kaku, Y.; Yamada, M.; Yoshii, M. Nonsuppurative Encephalitis in Piglets after Experimental Inoculation of Japanese Encephalitis Flavivirus Isolated from Pigs. *Veter Pathol.* **2004**, *41*, 62–67.
63. Yamada, M.; Nakamura, K.; Yoshii, M.; Kaku, Y.; Narita, M. Brain Lesions Induced by Experimental Intranasal Infection of Japanese Encephalitis Virus in Piglets. *J. Comp. Pathol.* **2009**, *141*, 156–162. [[CrossRef](#)]
64. Wu, R.; Wang, Q.; Liu, H.; Chai, C.; He, B.; Huang, X.; Wen, Y.; Wen, X.; Yan, Q.; Ma, X.; et al. Phylogenetic analysis reveals that Japanese encephalitis virus genotype III is still prevalent in swine herds in Sichuan province in China. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 1719–1722. [[CrossRef](#)]
65. Desingu, P.A.; Ray, P.K.; Patel, B.H.M.; Singh, R.; Saikumar, G. Pathogenic and Genotypic Characterization of a Japanese Encephalitis Virus Isolate Associated with Reproductive Failure in an Indian Pig Herd. *PLoS ONE* **2016**, *11*, 0147611. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Yuan, L.; Wu, R.; Liu, H.; Wen, X.; Huang, X.; Wen, Y.; Ma, X.; Yan, Q.; Huang, Y.; Zhao, Q.; et al. Tissue tropism and molecular characterization of a Japanese encephalitis virus strain isolated from pigs in southwest China. *Virus Res.* **2016**, *215*, 55–64. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Lindahl, J.; Boqvist, S.; Ståhl, K.; Thu, H.T.V.; Magnusson, U. Reproductive performance in sows in relation to Japanese Encephalitis Virus seropositivity in an endemic area. *Trop. Anim. Health Prod.* **2012**, *44*, 239–245. [[CrossRef](#)]
68. Lu, B.; Qin, Y.; Li, B.; He, Y.; Duan, Q.; Liang, J.; Chen, Z.; Su, Q.; Bi, B.; Zhao, W. Full-Length Genome Sequence of Japanese Encephalitis Virus Strain FC792, Isolated from Guangxi, China. *Genome Announc.* **2017**, *5*, e01054-17. [[CrossRef](#)]
69. Teng, M.; Luo, J.; Fan, J.M.; Chen, L.; Wang, X.T.; Yao, W.; Wang, C.Q.; Zhang, G.P. Molecular characterization of Japanese encephalitis viruses circulating in pigs and mosquitoes on pig farms in the Chinese province of Henan. *Virus Genes* **2013**, *46*, 170–174. [[CrossRef](#)]
70. Liu, H.; Lu, H.-J.; Liu, Z.-J.; Jing, J.; Ren, J.-Q.; Liu, Y.-Y.; Lu, F.; Jin, N.-Y. Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes and Swine in Yunnan Province, China 2009–2010. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2013**, *13*, 41–49. [[CrossRef](#)]
71. Cao, Q.S.; Li, X.M.; Zhu, Q.Y.; Wang, D.D.; Chen, H.C.; Qian, P. Isolation and molecular characterization of genotype 1 Japanese encephalitis virus, SX09S-01, from pigs in China. *Virol. J.* **2011**, *8*, 472. [[CrossRef](#)]
72. Ogasa, A.; Yokoki, Y.; Fujisaki, Y.; Habu, A. Reproductive disorders in boars infected experimentally with Japanese encephalitis virus. *Jpn. J. Anim. Reprod.* **1977**, *23*, 171–175. [[CrossRef](#)]
73. Okuno, T.; Mitchell, C.J.; Chen, P.S.; Wang, J.S.; Lin, S.Y. Seasonal infection of Culex mosquitos and swine with Japanese encephalitis virus. *Bull. World Health Organ.* **1973**, *49*, 347–352.
74. Cappelle, J.; Duong, V.; Pring, L.; Kong, L.; Yakovleff, M.; Prasetyo, D.B.; Peng, B.; Choeng, R.; Duboz, R.; Ong, S.; et al. Intensive Circulation of Japanese Encephalitis Virus in Peri-urban Sentinel Pigs near Phnom Penh, Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005149. [[CrossRef](#)]

75. Di Francesco, J.; Choeung, R.; Peng, B.; Pring, L.; Pang, S.; Duboz, R.; Ong, S.; Sorn, S.; Tarantola, A.; Fontenille, D.; et al. Comparison of the dynamics of Japanese encephalitis virus circulation in sentinel pigs between a rural and a peri-urban setting in Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006644. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Barzon, L.; Pacenti, M.; Franchin, E.; Pagni, S.; Martello, T.; Cattai, M.; Cusinato, R.; Palù, G. Excretion of West Nile Virus in Urine During Acute Infection. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 1086–1092. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Korhonen, E.M.; Huhtamo, E.; Virtala, A.-M.K.; Kantele, A.; Vapalahti, O. Approach to non-invasive sampling in dengue diagnostics: Exploring virus and NS1 antigen detection in saliva and urine of travelers with dengue. *J. Clin. Virol.* **2014**, *61*, 353–358. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Hurlbut, H.S. The Pig-Mosquito Cycle of Japanese Encephalitis Virus in Taiwan. *J. Med. Entomol.* **1964**, *1*, 301–307. [[CrossRef](#)]
79. García-Nicolás, O.; Braun, R.O.; Milona, P.; Lewandowska, M.; Dijkman, R.; Alves, M.P.; Summerfield, A. Targeting of the Nasal Mucosa by Japanese Encephalitis Virus for Non-Vector-Borne Transmission. *J. Virol.* **2018**, *92*, e01091-18. [[CrossRef](#)]
80. Duong, V.; Sorn, S.; Holl, D.; Rani, M.; Deubel, V.; Buchy, P. Evidence of Japanese encephalitis virus infections in swine populations in 8 provinces of Cambodia: Implications for national Japanese encephalitis vaccination policy. *Acta Trop.* **2011**, *120*, 146–150. [[CrossRef](#)]
81. Burke, D.S.; Tingpalapong, M.; Ward, G.S.; Andre, R.; Leake, C.J. Intense transmission of Japanese encephalitis virus to pigs in a region free of epidemic encephalitis. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **1985**, *16*, 199–206.
82. Peiris, J.; Amerasinghe, F.; Arunagiri, C.; Perera, L.; Karunaratne, S.; Ratnayake, C.; Kulatilaka, T.; Abeysinghe, M. Japanese encephalitis in Sri Lanka: Comparison of vector and virus ecology in different agro-climatic areas. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1993**, *87*, 541–548. [[CrossRef](#)]
83. Hanna, J.N.; ARitchie, S.; Hills, S.L.; Hurk, A.F.V.D.; APhillips, D.; Pyke, A.T.; Lee, J.M.; AJohansen, C.; MacKenzie, J.S. Japanese encephalitis in north Queensland, Australia, 1998. *Med. J. Aust.* **1999**, *170*, 533–536. [[CrossRef](#)]
84. Higgins, D.A. A serological survey of pigs in Hong Kong for antibodies to Japanese encephalitis virus. *Trop. Anim. Health Prod.* **1970**, *2*, 23–27. [[CrossRef](#)]
85. Kakkar, M.; Chaturvedi, S.; Saxena, V.K.; Dhole, T.N.; Kumar, A.; Rogawski, E.T.; Abbas, S.; Venkataramanan, V.V.; Chatterjee, P. Identifying sources, pathways and risk drivers in ecosystems of Japanese Encephalitis in an epidemic-prone north Indian district. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0175745. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Kumari, R.; Kumar, K.; Rawat, A.; Singh, G.; Yadav, N.K.; Chauhan, L.S. First indigenous transmission of Japanese Encephalitis in urban areas of National Capital Territory of Delhi, India. *Trop. Med. Int. Health* **2013**, *18*, 743–749. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. Dutta, P.; Khan, S.A.; Khan, A.M.; Mahanta, J. Japanese encephalitis B-virus among the porcine population of Assam. *Indian Vet. J.* **2007**, *84*, 1125–1127.
88. Kumanan, K.; Ramesh, A.; Velmurugan, R.; Jagannathan, S.; Padmanaban, V.D. Seroepidemiology of Japanese encephalitis among animals and birds in Tamil Nadu. *Indian Vet. J.* **2002**, *79*, 311–315.
89. Damayanti, P.A.A.; Adi, A.A.A.M.; Astawa, I.N.M.; Sudarmaja, I.M.; Kardena, I.M.; Swastika, I.K. Incidence of Japanese Encephalitis among Children is associated with the Presence of Pigs in Bali, Indonesia. *Biomed. Pharmacol. J.* **2017**, *10*, 1333–1338. [[CrossRef](#)]
90. Detha, A.; Wuri, D.A.; Santhia, K. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus using competitive enzyme linked immunosorbent assay (C-ELISA) in pigs in East Sumba, Indonesia. *J. Adv. Vet. Anim. Res.* **2015**, *2*, 481–483. [[CrossRef](#)]
91. Yamanaka, A.; Mulyatno, K.C.; Susilowati, H.; Hendrianto, E.; Utsumi, T.; Amin, M.; Lusida, M.I.; Soegijanto, S.; Konishi, E. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis virus among pigs in Bali and East Java, Indonesia, 2008. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2010**, *63*, 58–60.
92. Ohno, Y.; Sato, H.; Suzuki, K.; Yokoyama, M.; Uni, S.; Shibasaki, T.; Sashika, M.; Inokuma, H.; Kai, K.; Maeda, K. Detection of antibodies against Japanese encephalitis virus in raccoons, raccoon dogs and wild boars in Japan. *J. Veter Med. Sci.* **2009**, *71*, 1035–1039. [[CrossRef](#)]

93. Hamano, M.; Lim, C.K.; Takagi, H.; Sawabe, K.; Kuwayama, M.; Kishi, N.; Kurane, I.; Takasaki, T. Detection of antibodies to Japanese encephalitis virus in the wild boars in Hiroshima prefecture, Japan. *Epidemiol. Infect.* **2007**, *135*, 974–977. [[CrossRef](#)]
94. Sugiyama, I.; Shimizu, E.; Nogami, S.; Suzuki, K.; Miura, Y.; Sentsui, H. Serological survey of arthropod-borne viruses among wild boars in Japan. *J. Veter. Med. Sci.* **2009**, *71*, 1059–1061. [[CrossRef](#)]
95. Nidaira, M.; Kyan, H.; Taira, K.; Okano, S.; Oshiro, T.; Kato, T.; Kudo, N.; Azama, Y.; Mahoe, Y.; Kudaka, J.; et al. Survey of Japanese encephalitis virus in pigs and wild boars on Ishigaki and Iriomote Islands in Okinawa, Japan. *Epidemiol. Infect.* **2014**, *142*, 856–860. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Nidaira, M.; Taira, K.; Onodera, I.; Morikawa, T.; Itokazu, K.; Kudaka, J.; Ohno, A. Detection of Japanese encephalitis virus antibody in a pig on Yonaguni Island, where all pigs were slaughtered in 1997. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2007**, *60*, 70–71. [[PubMed](#)]
97. Nidaira, M.; Taira, K.; Okano, S.; Shinzato, T.; Morikawa, T.; Tokumine, M.; Asato, Y.; Tada, Y.; Miyagi, K.; Matsuda, S.; et al. Survey of Japanese encephalitis virus in pigs on Miyako, Ishigaki, Kume, and Yonaguni Islands in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2009**, *62*, 220–224. [[PubMed](#)]
98. Nidaira, M.; Taira, K.; Itokazu, K.; Kudaka, J.; Nakamura, M.; Ohno, A.; Takasaki, T. Survey of the antibody against Japanese encephalitis virus in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2007**, *60*, 309–311. [[PubMed](#)]
99. Nidaira, M.; Taira, K.; Itokazu, K.; Okano, S.; Kudaka, J.; Nakamura, M.; Ohno, A.; Takasaki, T. Detection of Japanese encephalitis virus genome in Ryukyu wild boars (*Sus scrofa riukiuanus*) in Okinawa, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2008**, *61*, 164–165.
100. Yang, D.-K.; Kim, H.-H.; Hyun, B.-H.; Lim, S.-I.; Nam, Y.-K.; Nah, J.-J.; Song, J.-Y. Detection of Neutralizing Antibody Against Japanese Encephalitis Virus in Wild Boars of Korea. *J. Bacteriol. Virol.* **2012**, *42*, 353. [[CrossRef](#)]
101. Conlan, J.V.; Vongxay, K.; Jarman, R.G.; Gibbons, R.V.; Lunt, R.A.; Fenwick, S.; Thompson, R.C.A.; Blacksell, S.D. Serologic study of pig-associated viral zoonoses in Laos. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *86*, 1077–1084. [[CrossRef](#)]
102. Simpson, D.; Smith, C.; Marshall, T.D.C.; Platt, G.; Way, H.; Bowen, E.; Bright, W.; Day, J.; McMahon, D.; Hill, M.; et al. Arbovirus infections in Sarawak: The role of the domestic pig. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1976**, *70*, 66–72. [[CrossRef](#)]
103. Myint, L.; Oo, K.; Hlaing, W.; Thu, H.M.; Thant, K.Z.; Than, S.M.; Aye, K.T.; Oo, S.W.; Ha, T.; Moe, K.; et al. Investigation of Japanese encephalitis virus infection in Bogalay Township, Myanmar in 1999. *Trop. Med.* **2000**, *42*, 47–52.
104. Thakur, K.K.; Pant, G.R.; Wang, L.; Hill, C.A.; Pogranichniy, R.M.; Manandhar, S.; Johnson, A.J.; Thakur, K. Seroprevalence of Japanese Encephalitis Virus and Risk Factors Associated with Seropositivity in Pigs in Four Mountain Districts in Nepal. *Zoonoses Public Health* **2012**, *59*, 393–400. [[CrossRef](#)]
105. Pant, G.R.; Lunt, R.A.; Rootes, C.L.; Daniels, P.W. Serological evidence for Japanese encephalitis and West Nile viruses in domestic animals of Nepal. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2006**, *29*, 166–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Pant, G.R. A Serological Survey of Pigs, Horses, and Ducks in Nepal for Evidence of Infection with Japanese Encephalitis Virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1081*, 124–129. [[CrossRef](#)]
107. See, E.; Tan, H.C.; Wang, D.; Ooi, E.E.; Lee, M.-A. Presence of hemagglutination inhibition and neutralization antibodies to Japanese encephalitis virus in wild pigs on an offshore island in Singapore. *Acta Trop.* **2002**, *81*, 233–236. [[CrossRef](#)]
108. Zhang, H.; Luo, H.; Rehman, M.U.; Nabi, F.; Li, K.; Lan, Y.; Huang, S.; Zhang, L.; Mehmood, K.; Shahzad, M.; et al. Evidence of JEV in *Culex tritaeniorhynchus* and pigs from high altitude regions of Tibet, China. *J. Vector Borne Dis.* **2017**, *54*, 69–73. [[PubMed](#)]
109. Zhang, H.; Rehman, M.U.; Li, K.; Luo, H.; Lan, Y.; Nabi, F.; Zhang, L.; Iqbal, M.K.; Zhu, S.; Javed, M.T.; et al. Epidemiologic survey of Japanese encephalitis virus infection, Tibet, China, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 1023–1024. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
110. Li, Y.-X.; Li, M.-H.; Fu, S.-H.; Chen, W.-X.; Liu, Q.-Y.; Zhang, H.-L.; Da, W.; Hu, S.-L.; La Mu, S.D.; Bai, J.; et al. Japanese Encephalitis, Tibet, China. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 934–936. [[CrossRef](#)]

111. Ruget, A.S.; Beck, C.; Gabassi, A.; Trévennec, K.; Lecollinet, S.; Chevalier, V.; Cappelle, J. Japanese encephalitis circulation pattern in swine of northern Vietnam and consequences for swine's vaccination recommendations. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 1485–1492. [[CrossRef](#)]
112. Tien, T.V.; Nguyen, H.T.; Mam, V.S.; Nga, P.T.; Igarashi, A. Prevention of Japanese Encephalitis (JE) by “BIKEN” vaccine and epidemiological survey on JE in Dong Anh District, Hanoi, Vietnam. *Trop. Med.* **1991**, *33*, 83–91.
113. Do, Q.H.; Vu, T.Q.H.; Huynh, T.K.L.; Dinh, Q.T.; Deubel, V. Current situation of Japanese encephalitis in the south of Vietnam, 1976–1992. *Trop. Med.* **1994**, *36*, 202–214.
114. Nga, P.T.; Phuong, I.; Nam, V.S.; Yen, N.T.; van Tien, T.; Lien, H.P. Transmission of Japanese encephalitis (JE) virus in Gia Luong District, Ha Bac Province, Vietnam, after JE vaccination, 1993–1994. *Trop. Med.* **1995**, *37*, 129–134.
115. Lindahl, J.F.; Ståhl, K.; Chirico, J.; Boqvist, S.; Thu, H.T.V.; Magnusson, U. Circulation of Japanese Encephalitis Virus in Pigs and Mosquito Vectors within Can Tho City, Vietnam. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
116. Chan, I.P. Investigation of the HI titre of Japanese encephalitis of swine on Taiwan, Republic of China. *Bull. Off. Int. Epizoot.* **1968**, *69*, 141–143. [[PubMed](#)]
117. Borah, J.; Dutta, P.; Khan, S.A.; Mahanta, J. Epidemiological concordance of Japanese encephalitis virus infection among mosquito vectors, amplifying hosts and humans in India. *Epidemiol. Infect.* **2013**, *141*, 74–80. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
118. Yamamoto, H.; Ishida, N.; Akiyama, K.; Shiratori, T.; Konno, J. Epidemiological analyses of Japanese encephalitis virus spread from mosquitoes to pigs through 5 years. *Jpn. J. Med. Sci. Boil.* **1970**, *23*, 75–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
119. Maeda, O.; Karaki, T.; Kuroda, A.; Sasaki, O.; Karoji, Y.; Takenokuma, K. Epidemiological studies on Japanese encephalitis in Kyoto city area, Japan. III. Seasonal prevalence of virus infections in several pig populations shown by virus recovery from engorged *Culex tritaeniorhynchus summorosus*. *Jpn. J. Med. Sci. Boil.* **1978**, *31*, 277–290. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
120. Konno, J.; Endo, K.; Agatsuma, H.; Ishida, N. Cyclic outbreaks of Japanese encephalitis among pigs and humans. *Am. J. Epidemiol.* **1966**, *84*, 292–300. [[CrossRef](#)]
121. Ura, M. Ecology of Japanese encephalitis virus in Okinawa, Japan. II. Regional particularity of the virus dissemination in Okinawa island from 1966 to 1976. *Trop. Med.* **1976**, *18*, 165–178.
122. Van Den Hurk, A.F.; Ritchie, S.A.; Mackenzie, J.S. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu. Rev. Entomol.* **2009**, *54*, 17–35. [[CrossRef](#)]
123. Nitatpattana, N.; Le Flohic, G.; Thongchai, P.; Nakgoi, K.; Palaboodeewat, S.; Khin, M.; Barbazan, P.; Yoksan, S.; Gonzalez, J.P. Elevated Japanese encephalitis virus activity monitored by domestic sentinel piglets in Thailand. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 391–394. [[CrossRef](#)]
124. Johnsen, D.O.; Edelman, R.; Grossman, R.A.; Muangman, D.; Pomsdhit, J.; Gould, D.J. Study of Japanese encephalitis virus in Chiang Mai valley, Thailand V. Animal infections. *Am. J. Epidemiol.* **1974**, *100*, 57–68. [[CrossRef](#)]
125. Van Peenen, P.F.D.; Joseph, P.L.; Atmosoedjono, S.; Irsiana, R.; Saroso, J.S. Japanese encephalitis virus from pigs and mosquitoes in Jakarta, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1975**, *69*, 477–479. [[CrossRef](#)]
126. Makino, Y.; Saito, M.; Phommasack, B.; Vongxay, P.; Kanemura, K.; Pothawan, T.; Insisiengmay, S.; Fukunaga, T. Arbovirus infections in pilot areas in Laos. *Trop. Med.* **1994**, *36*, 131–139.
127. Yoshikawa, A.; Nabeshima, T.; Inoue, S.; Agoh, M.; Morita, K. Molecular and serological epidemiology of Japanese encephalitis virus (JEV) in a remote island of western Japan: An implication of JEV migration over the East China Sea. *Trop. Med. Health* **2016**, *44*, 8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
128. Ura, M. Ecology of Japanese encephalitis virus in Okinawa, Japan. I. The investigation on pig and mosquito infection of the virus in Okinawa island from 1966 to 1976. *Trop. Med.* **1976**, *18*, 151–163.
129. Grossman, R.A.; Edelman, R.; Gould, D.J. Study of Japanese encephalitis virus in Chiang Mai valley, Thailand VI. Summary and conclusions. *Am. J. Epidemiol.* **1974**, *100*, 69–76. [[CrossRef](#)]
130. Hasegawa, M.; Nam, V.S.; Tuno, N.; Takagi, M.; Yen, N.T. Influence of the distribution of host species on adult abundance of Japanese encephalitis vectors *Culex vishnui* subgroup and *Culex gelidus* in a rice-cultivating village in northern Vietnam. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *78*, 159–168. [[CrossRef](#)]

131. Ohba, S.-Y.; Huynh, T.T.T.; Le, L.L.; Ngoc, H.T.; Le Hoang, S.; Takagi, M. Mosquitoes and Their Potential Predators in Rice Agroecosystems of the Mekong Delta, Southern Vietnam. *J. Am. Mosq. Control. Assoc.* **2011**, *27*, 384–392. [[CrossRef](#)]
132. Ohba, S.; Van Soai n Van Anh, D.T.; Nguyen, Y.T.; Takagi, M. Study of mosquito fauna in rice ecosystems around Hanoi, Northern Vietnam. *Acta Trop.* **2015**, *142*, 89–95. [[CrossRef](#)]
133. Murty, U.S.; Rao, M.S.; Arunachalam, N. The effects of climatic factors on the distribution and abundance of Japanese encephalitis vectors in Kurnool district of Andhra Pradesh, India. *J. Vector Borne Dis.* **2010**, *47*, 26–32.
134. Self, L.S.; Shin, H.K.; Kim, K.H.; Lee, K.W.; Chow, C.Y.; Hong, H.K. Ecological studies on *Culex tritaeniorhynchus* as a vector of Japanese encephalitis. *Bull. World Health Organ.* **1973**, *49*, 41–47.
135. Sudeep, A.B. *Culex gelidus*: An emerging mosquito vector with potential to transmit multiple virus infections. *J. Vector Borne Dis.* **2014**, *51*, 251–258. [[PubMed](#)]
136. Rosen, L. The Natural History of Japanese Encephalitis Virus. *Annu. Rev. Microbiol.* **1986**, *40*, 395–414. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Keiser, J.; Maltese, M.F.; Erlanger, T.E.; Bos, R.; Tanner, M.; Singer, B.H.; Utzinger, J. Effect of irrigated rice agriculture on Japanese encephalitis, including challenges and opportunities for integrated vector management. *Acta Trop.* **2005**, *95*, 40–57. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
138. Morita, K.; Nabeshima, T.; Buerano, C.C. Japanese encephalitis. *OIE Rev. Sci. Tech.* **2015**, *34*, 441–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
139. Mansfield, K.L.; Hernández-Triana, L.M.; Banyard, A.C.; Fooks, A.R.; Johnson, N. Japanese encephalitis virus infection, diagnosis and control in domestic animals. *Veter Microbiol.* **2017**, *201*, 85–92. [[CrossRef](#)]
140. Daniels, P.T. *Arboviruses of Veterinary Significance in The Asia-Western Pacific Region, Such as Japanese Encephalitis Virus*; Office International des Epizooties: Paris, France, 2003.
141. McArthur, M.A.; Holbrook, M.R. Japanese Encephalitis Vaccines. *J. Bioterrorism Biodefense* **2011**, *2*. [[CrossRef](#)]
142. Yun, S.-I.; Lee, Y.-M. Japanese encephalitis. *Hum. Vaccines Immunother.* **2014**, *10*, 263–279. [[CrossRef](#)]
143. Konishi, E.; Yamaoka, M.; Kurane, I.; Mason, P.W. Japanese Encephalitis DNA Vaccine Candidates Expressing Premembrane and Envelope Genes Induce Virus-Specific Memory B Cells and Long-Lasting Antibodies in Swine. *Virology* **2000**, *268*, 49–55. [[CrossRef](#)]
144. García-Nicolás, O.; Ricklin, M.E.; Liniger, M.; Vielle, N.J.; Python, S.; Souque, P.; Charneau, P.; Summerfield, A. A Japanese Encephalitis Virus Vaccine Inducing Antibodies Strongly Enhancing In Vitro Infection Is Protective in Pigs. *Viruses* **2017**, *9*, 124. [[CrossRef](#)]
145. Seo, H.-J.; Kim, H.C.; Klein, T.A.; Ramey, A.M.; Lee, J.-H.; Kyung, S.-G.; Park, J.-Y.; Cho, Y.S.; Cho, I.-S.; Yeh, J.-Y. Molecular Detection and Genotyping of Japanese Encephalitis Virus in Mosquitoes during a 2010 Outbreak in the Republic of Korea. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e55165. [[CrossRef](#)]
146. Nah, J.-J.; Yang, D.-K.; Kim, H.-H.; Song, J.-Y. The present and future of veterinary vaccines for Japanese encephalitis in Korea. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **2015**, *4*, 130–136. [[CrossRef](#)]
147. Hsu, S.T.; Chang, L.C.; Lin, S.Y.; Chuang, T.Y.; Ma, C.H.; Inoue, Y.K.; Okuno, T. The effect of vaccination with a live attenuated strain of Japanese encephalitis virus on stillbirths in swine in Taiwan. *Bull. World Health Organ.* **1972**, *46*, 465–471. [[PubMed](#)]
148. Ogata, M.; Nagao, Y.; Kikui, R.; Kitamura n Ariyasu, H. Effect of complete adjuvant on vaccination of live attenuated Japanese encephalitis vaccine to swine for preventing viremia. 39. Epidemiological studies of J.E. *Acta Med. Okayama* **1971**, *25*, 71–75.
149. Clarke, D.H.; Casals, J. Techniques for Hemagglutination and Hemagglutination-Inhibition with Arthropod-Borne Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1958**, *7*, 561–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
150. Beck, C.; Lowenski, S.; Durand, B.; Bahuon, C.; Zientara, S.; Lecollinet, S. Improved reliability of serological tools for the diagnosis of West Nile fever in horses within Europe. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005936. [[CrossRef](#)]
151. Kuno, G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. *Adv. Virus Res.* **2003**, *61*, 3–65.
152. Jain, P.; Jain, A.; Kumar, A.; Prakash, S.; Khan, D.N.; Singh, K.P.; Garg, R.K.; Kumar, R.; Kumar, G.A. Epidemiology and etiology of acute encephalitis syndrome in North India. *Jpn. J. Infect. Dis.* **2014**, *67*, 197–203. [[CrossRef](#)]

153. Srey, V.H.; Sadones, H.; Ong, S.; Yim, C.; Reynes, J.-M.; Sor, S.; Mam, M.; Grosjean, P. Etiology of encephalitis syndrome among hospitalized children and adults in Takeo, Cambodia, 1999–2000. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2002**, *66*, 200–207. [[CrossRef](#)]
154. Cao, L.; Fu, S.; Lu, Z.; Tang, C.; Gao, X.; Li, X.; Lei, W.; He, Y.; Li, M.; Cao, Y.; et al. Detection of West Nile Virus Infection in Viral Encephalitis Cases, China. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2019**, *19*, 45–50. [[CrossRef](#)]
155. Chang, K.J. Studies on the serological cross-reaction between dengue and Japanese encephalitis. *Chin. J. Microbiol. Immunol.* **1997**, *30*, 207–218.
156. Calisher, C.H.; Karabatsos, N.; Dalrymple, J.M.; Shope, R.E.; Porterfield, J.S.; Westaway, E.G.; Brandt, W.E. Antigenic Relationships between Flaviviruses as Determined by Cross-neutralization Tests with Polyclonal Antisera. *J. Gen. Virol.* **1989**, *70*, 37–43. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Mansfield, K.L.; Horton, D.L.; Johnson, N.; Li, L.; Barrett, A.D.T.; Smith, D.J.; Galbraith, S.E.; Solomon, T.; Fooks, A.R. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J. Gen. Virol.* **2011**, *92*, 2821–2829. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
158. Goverdhan, M.K.; Kulkarni, A.B.; Gupta, A.K.; Tupe, C.D.; Rodrigues, J.J. Two-way cross-protection between West Nile and Japanese encephalitis viruses in bonnet macaques. *Acta Virol.* **1992**, *36*, 277–283. [[PubMed](#)]
159. Nemeth, N.M.; Bosco-Lauth, A.M.; Bowen, R.A. Cross-Protection Between West Nile and Japanese Encephalitis Viruses in Red-Winged Blackbirds (*Agelaius phoeniceus*). *Avian Dis. Dig.* **2009**, *4*, 421–425. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
160. Maeki, T.; Tajima, S.; Ikeda, M.; Kato, F.; Taniguchi, S.; Nakayama, E.; Takasaki, T.; Lim, C.-K.; Saijo, M. Analysis of cross-reactivity between flaviviruses with sera of patients with Japanese encephalitis showed the importance of neutralization tests for the diagnosis of Japanese encephalitis. *J. Infect. Chemother.* **2019**, *25*, 786–790. [[CrossRef](#)]
161. Reuben, R.; Thenmozhi, V.; Samuel, P.P.; Gajanana, A.; Mani, T.R. Mosquito Blood Feeding Patterns as a Factor in the Epidemiology of Japanese Encephalitis in Southern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1992**, *46*, 654–663. [[CrossRef](#)]
162. Bhattacharyya, D.R.; Handique, R.; Dutta, L.P.; Dutta, P.; Doloi, P.; Goswami, B.K.; Sharma, C.K.; Mahanta, J. Host feeding patterns of *Culex vishnui* sub group of mosquitoes in Dibrugarh district of Assam. *J. Commun. Dis.* **1994**, *26*, 133–138.
163. Arunachalam, N.; Samuel, P.P.; Hiriyan, J.; Rajendran, R.; Dash, A.P. Short report: Observations on the multiple feeding behavior of *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae), the vector of Japanese encephalitis in Kerala in southern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *72*, 198–200. [[CrossRef](#)]
164. Wang, L.Y. Host preference of mosquito vectors of Japanese encephalitis. *Chin. J. Microbiol.* **1975**, *8*, 274–279.
165. Samuel, P.P.; Arunachalam, N.; Hiriyan, J.; Tyagi, B.K. Host Feeding Pattern of Japanese Encephalitis Virus Vector Mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Kuttanadu, Kerala, India. *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 927–932. [[CrossRef](#)]
166. Tuno, N.; Tsuda, Y.; Takagi, M. How Zoophilic Japanese Encephalitis Vector Mosquitoes Feed on Humans. *J. Med Entomol.* **2017**, *54*, 8–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
167. Yap, G.; Lim, X.F.; Chan, S.; How, C.B.; Humaidi, M.; Yeo, G.; Mailepessov, D.; Kong, M.; Lai, Y.L.; Okumura, C.; et al. Serological evidence of continued Japanese encephalitis virus transmission in Singapore nearly three decades after end of pig farming. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
168. Rodrigues, F.; Guttikar, S.; Pinto, B. Prevalence of antibodies to Japanese encephalitis and West Nile viruses among wild birds in the Krishna-Godavari Delta, Andhra Pradesh, India. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1981**, *75*, 258–262. [[CrossRef](#)]
169. Saito, M.; Osa, Y.; Asakawa, M. Antibodies to Flaviviruses in Wild Ducks Captured in Hokkaido, Japan: Risk Assessment of Invasive Flaviviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *9*, 253–258. [[CrossRef](#)]
170. Buescher, E.L.; Scherer, W.F.; Rosenberg, M.Z.; Kutner, L.J.; McClure, H.E. Immunologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan: IV. Maternal Antibody in Birds. *J. Immunol.* **1959**, *83*, 614–619.
171. Scherer, W.F.; Buescher, E.L.; McClure, H.E. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1959**, *8*, 689–697. [[CrossRef](#)]
172. Jamgaonkar, A.V.; Yergolkar, P.N.; Geevarghese, G.; Joshi, G.D.; Joshi, M.V.; Mishra, A.C. Serological evidence for Japanese encephalitis virus and West Nile virus infections in water frequenting and terrestrial wild birds in Kolar District, Karnataka State, India. A retrospective study. *Acta Virol.* **2003**, *47*, 185–188.

173. Yang, D.-K.; Oh, Y.-I.; Kim, H.-R.; Lee, Y.-J.; Moon, O.-K.; Yoon, H.; Kim, B.; Lee, K.-W.; Song, J.-Y. Serosurveillance for Japanese encephalitis virus in wild birds captured in Korea. *J. Veter Sci.* **2011**, *12*, 373–377. [[CrossRef](#)]
174. Lord, J.S.; Gurley, E.S.; Pulliam, J.R.C. Rethinking Japanese Encephalitis Virus Transmission: A Framework for Implicating Host and Vector Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004074. [[CrossRef](#)]
175. Gresser, I.; Hardy, J.L.; Hu, S.M.K.; Scherer, W.F. Factors Influencing Transmission of Japanese B Encephalitis Virus by a Colonized Strain of *Culex Tritaeniorhynchus* Giles, from Infected Pigs and Chicks to Susceptible Pigs and Birds. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1958**, *7*, 365–373. [[CrossRef](#)]
176. Hauerwald, H. Serological evidence for Japanese encephalitis and West Nile virus infections in domestic birds in Cambodia. In preparation.
177. Dhanda, V.; Banerjee, K.; Deshmukh, P.K.; Ailikal, M. Experimental viraemia and transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes in domestic ducks. *Indian J. Med. Res.* **1977**, *66*, 881–888. [[PubMed](#)]
178. Frantz, L.; Meijaard, E.; Gongora, J.; Haile, J.; Groenen, M.A.M.; Larson, G. The Evolution of Suidae. *Annu. Rev. Anim. Biosci.* **2016**, *4*, 61–85. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
179. Nitatpattana, N.; Apiwathnasorn, C.; Barbazan, P.; Leemingsawat, S.; Yoksan, S.; Gonzalez, J.L.Z. First isolation of Japanese encephalitis from *Culex quinquefasciatus* in Thailand. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2005**, *36*, 875–878.
180. Thoa, N.T.K.; Vien, N.T.; Mai, T.T.; Xuan, N.T.N. Japanese encephalitis vectors: Isolation of virus from culicine mosquitoes in the Saigon area. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **1974**, *5*, 408–412.
181. Lindahl, J.; Chirico, J.; Boqvist, S.; Thu, H.T.V.; Magnusson, U. Occurrence of Japanese encephalitis virus mosquito vectors in relation to urban pig holdings. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *87*, 1076–1082. [[CrossRef](#)]
182. Huynh, T.T.T.; Aarnink, A.J.A.; Drucker, A.; Verstegen, M.W.A. Pig Production in Cambodia, Laos, Philippines, and Vietnam: A Review. *Asian J. Agric. Dev.* **2006**, *3*, 69–90.
183. Diallo, A.O.I.; Chevalier, V.; Cappelle, J.; Duong, V.; Fontenille, D.; Duboz, R. How much does direct transmission between pigs contribute to Japanese Encephalitis virus circulation? A modelling approach in Cambodia. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0201209. [[CrossRef](#)]
184. Zhao, S.; Lou, Y.; Chiu, A.P.; He, D. Modelling the skip-and-resurgence of Japanese encephalitis epidemics in Hong Kong. *J. Theor. Boil.* **2018**, *454*, 1–10. [[CrossRef](#)]
185. Sunwoo, J.-S.; Jung, K.-H.; Lee, S.-T.; Lee, S.K.; Chu, K. Reemergence of Japanese Encephalitis in South Korea, 2010–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 1841–1843. [[CrossRef](#)]
186. Tandale, B.V.; Khan, S.A.; Kushwaha, K.P.; Rahman, H.; Gore, M.M.; Sapkal, G.N.; Bondre, V.P.; Srivastava, D.; Laskar, B.; Mahanta, J. Effectiveness of Japanese encephalitis SA 14-14-2 live attenuated vaccine among Indian children: Retrospective 1:4 matched case-control study. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 713–719. [[CrossRef](#)]
187. Khan, S.U.; Salje, H.; Hannan, A.; Islam, M.A.; Bhuyan, A.A.M.; Islam, M.A.; Rahman, M.Z.; Nahar, N.; Hossain, M.J.; Luby, S.P.; et al. Dynamics of Japanese Encephalitis Virus Transmission among Pigs in Northwest Bangladesh and the Potential Impact of Pig Vaccination. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3166. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
188. Kwon, H.J.; Kang, B.J.; Lim, Y.M.; Lee, C.K. Studies on Japanese encephalitis live vaccine. II. Development of an attenuated strain of virus (Anyang strain). *Res. Rep. Off. Rural Dev.* **1975**, *17*, 95–100.
189. Chen, Y.-Y.; Fan, Y.-C.; Tu, W.-C.; Chang, R.-Y.; Shih, C.-C.; Lu, I.-H.; Chien, M.-S.; Lee, W.-C.; Chen, T.-H.; Chang, G.-J.; et al. Japanese Encephalitis Virus Genotype Replacement, Taiwan, 2009–2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 2354–2356. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
190. Schuh, A.J.; Ward, M.J.; Brown, A.J.L.; Barrett, A.D.T. Dynamics of the Emergence and Establishment of a Newly Dominant Genotype of Japanese Encephalitis Virus throughout Asia. *J. Virol.* **2014**, *88*, 4522–4532. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
191. Cao, L.; Fu, S.; Gao, X.; Li, M.; Cui, S.; Li, X.; Cao, Y.; Lei, W.; Lu, Z.; He, Y.; et al. Low Protective Efficacy of the Current Japanese Encephalitis Vaccine against the Emerging Genotype 5 Japanese Encephalitis Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004686. [[CrossRef](#)]
192. Tajima, S.; Moi, M.L.; Yagasaki, K.; Nakayama, E.; Takasaki, T.; Saijo, M.; Tomikawa, T.; Kurane, I.; Kotaki, A.; Lim, C.-K. In vitro growth, pathogenicity and serological characteristics of the Japanese encephalitis virus genotype V Muar strain. *J. Gen. Virol.* **2015**, *96*, 2661–2669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

193. Oliveira, A.R.S.; Cohnstaedt, L.W.; Cernicchiaro, N. Japanese Encephalitis Virus: Placing Disease Vectors in the Epidemiologic Triad. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **2018**, *111*, 295–303. [[CrossRef](#)]
194. Diallo, A.O.; Chevalier, V.; Cappelle, J.; Duboz, R.; Didier, F.; Benoit, D. Modelling and assessment of combining gilt vaccination, vector control and pig herd management to control Japanese Encephalitis virus transmission in Southeast Asia. *BioRxiv* **2018**. [[CrossRef](#)]
195. Ben-Dov, E. *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and Its Dipteran-Specific Toxins. *Toxins* **2014**, *6*, 1222–1243. [[CrossRef](#)]
196. Wiwattanawanichakun, P.; Ratwatthananon, A.; Poonsri, W.; Yooboon, T.; Pluempanupat, W.; Piyasaengthong, N.; Nobsathian, S.; Bullangpoti, V. The Possibility of Using Isolated Alkaloid Compounds and Crude Extracts of *Piper retrofractum* (Piperaceae) as Larvicidal Control Agents for *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) Larvae. *J. Med. Entomol.* **2018**, *55*, 1231–1236. [[CrossRef](#)]
197. Govindarajan, M.; Vaseeharan, B.; Alharbi, N.S.; Kadaikunnan, S.; Khaled, J.M.; Al-Anbr, M.N.; Alyahya, S.A.; Maggi, F.; Benelli, G. High efficacy of (Z)- $\gamma$ -bisabolene from the essential oil of *Galinsoga parviflora* (Asteraceae) as larvicide and oviposition deterrent against six mosquito vectors. *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2018**, *25*, 10555–10566. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
198. Dutta, P.; Khan, S.A.; Khan, A.M.; Borah, J.; Sarmah, C.K.; Mahanta, J. The Effect of Insecticide-Treated Mosquito Nets (ITMNs) on Japanese Encephalitis Virus Seroconversion in Pigs and Humans. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *84*, 466–472. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



# Serological Evidence for Japanese Encephalitis and West Nile Virus Infections in Domestic Birds in Cambodia

Heidi Auerswald<sup>1\*</sup>, Anne-Sophie Ruget<sup>2,3</sup>, Helena Ladreyt<sup>3,4,5</sup>, Saraden In<sup>1</sup>, Soktheaom Mao<sup>1</sup>, San Sorn<sup>6</sup>, Sothyra Tum<sup>7</sup>, Veasna Duong<sup>1</sup>, Philippe Dussart<sup>1</sup>, Julien Cappelle<sup>2,3,4,8†</sup> and Véronique Chevalier<sup>2,3,4†</sup>

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giovanni Savini,  
Experimental Zooprophyllactic Institute  
of Abruzzo and  
Molise G. Caporale, Italy

### Reviewed by:

Venkatramana D. Krishna,  
University of Minnesota Twin Cities,  
United States  
Daniel Marc,  
INRA Centre Val de Loire, France

### \*Correspondence:

Heidi Auerswald  
hauerswald@pasteur-kh.org

†These authors have contributed  
equally to this work

### Specialty section:

This article was submitted to  
Veterinary Infectious Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Veterinary Science

**Received:** 23 September 2019

**Accepted:** 09 January 2020

**Published:** 29 January 2020

### Citation:

Auerswald H, Ruget A-S, Ladreyt H, In S, Mao S, Sorn S, Tum S, Duong V, Dussart P, Cappelle J and Chevalier V (2020) Serological Evidence for Japanese Encephalitis and West Nile Virus Infections in Domestic Birds in Cambodia. *Front. Vet. Sci.* 7:15. doi: 10.3389/fvets.2020.00015

<sup>1</sup> Virology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, Phnom Penh, Cambodia,

<sup>2</sup> Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, Phnom Penh, Cambodia, <sup>3</sup> Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Unité Mixte de Recherche ASTRE, Montpellier, France, <sup>4</sup> ASTRE, Université Montpellier, CIRAD, INRAE, Montpellier, France,

<sup>5</sup> Epidemiology Unit, Laboratory for Animal Health, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), University Paris-Est, Maisons-Alfort, France, <sup>6</sup> General Directorate for Animal Health and Production, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Phnom Penh, Cambodia, <sup>7</sup> National Animal Health and Production Research Institute, General Directorate for Animal Health and Production, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Phnom Penh, Cambodia, <sup>8</sup> UMR EpiA, INRAE, VetAgro Sup, Marcy l'Étoile, France

Mosquito-borne flaviviruses with an enzootic transmission cycle like Japanese encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV) are a major public health concern. The circulation of JEV in Southeast Asia is well-documented, and the important role of pigs as amplification hosts for the virus is long known. The influence of other domestic animals especially poultry that lives in high abundance and close proximity to humans is not intensively analyzed. Another understudied field in Asia is the presence of the closely related WNV. Such analyses are difficult to perform due to the intense antigenic cross-reactivity between these viruses and the lack of suitable standardized serological assays. The main objective of this study was to assess the prevalence of JEV and WNV flaviviruses in domestic birds, detailed in chickens and ducks, in three different Cambodian provinces. We determined the flavivirus seroprevalence using an hemagglutination inhibition assay (HIA). Additionally, we investigated in positive samples the presence of JEV and WNV neutralizing antibodies (nAb) using foci reduction neutralization test (FRNT). We found 29% (180/620) of the investigated birds positive for flavivirus antibodies with an age-dependent increase of the seroprevalence (OR = 1.04) and a higher prevalence in ducks compared to chicken (OR = 3.01). Within the flavivirus-positive birds, we found 43% (28/65) with nAb against JEV. We also observed the expected cross-reactivity between JEV and WNV, by identifying 18.5% double-positive birds that had higher titers of nAb than single-positive birds. Additionally, seven domestic birds (10.7%) showed only nAb against WNV and no nAb against JEV. Our study provides evidence for an intense JEV circulation in domestic birds in Cambodia, and the first

serological evidence for WNV presence in Southeast Asia since decades. These findings mark the need for a re-definition of areas at risk for JEV and WNV transmission, and the need for further and intensified surveillance of mosquito-transmitted diseases in domestic animals.

**Keywords:** Japanese encephalitis virus, West Nile virus, domestic birds, poultry, Cambodia, serology

## INTRODUCTION

Japanese encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV) are the most common encephalitic flaviviruses. The family of *Flaviviridae* contains more than 70 members that were originally distinguished based on the cross-reactivity of the antibodies they induce. Early investigations with polyclonal antisera revealed the antigenic relationships and allowed the separation of the mosquito-borne flaviviruses into seven subgroups, called serocomplexes (1, 2). Members of the same serocomplex are defined by the cross-neutralization of the antibodies they induces. JEV and WNV belong to the JEV serocomplex together with other viruses like Murray Valley encephalitis virus (MVEV), St Louis encephalitis virus (SLEV), and Usutu virus (USUV).

Both JEV and WNV share some ecological similarities as they maintain an enzootic transmission cycle with several bird families as natural reservoirs and mosquitoes of the *Culex* species as main vectors (3, 4). Humans and horses are generally considered dead-end hosts, as they do not develop a viremia high enough to infect mosquitoes. An exception are pigs, as they serve as amplification hosts for JEV because they develop sufficient viral titers to support further infection of mosquitoes (5–7). Although the role of ardeid birds as reservoir hosts for JEV is admitted (8, 9), the role of domestic birds as potential amplifying hosts has been little investigated so far. Several surveys implemented in different continents suggest the involvement of domestic birds, especially ducks, in WNV epidemiological cycle, either as an amplifying host or as a reservoir (10–13). With regards to JEV, two experimental studies suggest that young ducks and chickens might produce a sufficient viremia to infect mosquitoes when biting (14, 15). Because of their close association to humans, and the varying levels of seroprevalence observed in domestic birds, their role in the epidemiological cycle as secondary reservoirs may be of importance (16–18).

JEV is mainly found across Eastern, Southern, and Southeastern Asia where it is the most commonly identified pathogen for encephalitis cases in humans (19). Despite the availability of several vaccines since the 1990s, Japanese encephalitis (JE) is still a clinically important disease with around 70,000 cases per year, causing 10,000–15,000 deaths (20–22) and leaving ~30–50% of the survivors with definitive neurological or psychiatric sequelae (4). WNV is nearly globally distributed even if human outbreaks are sporadically reported because fewer than 1% of human WNV infections develop into severe disease (1, 23). However, the impact of WNV on human and animal health increased dramatically during the last two decades, particularly in the United States of America, with more than 2,000 deaths between 1999 and 2018 (24), and in Europe

(25, 26). Human WNV cases were also reported in several Asian countries (27–30) but little is known about its epidemiology and its potential impact on health in this continent.

JEV is endemic in Cambodia and the major cause of central nervous system infections leading to encephalitis and other severe clinical outcomes in children (31). In 2007, the estimated clinically-declared JE incidence in the country was 11.1 cases per 100 000 children under 15 years of age (32). A better knowledge of JE epidemiology and areas at risk would help focusing preventive measures, such as vaccination, in the future. Regarding WNV in Cambodia, there is little known besides sporadic findings in the 1960s of WNV and its subtype Kunjin virus (33).

As part of a large research program on JE epidemiology in Cambodia (ComAcross project <http://www.onehealthsea.org/comacross>), this study aimed to investigate the exposure to JEV and WNV of domestic birds sampled in three different rural provinces in Cambodia. The collected serum samples were analyzed for flavivirus antibodies by hemagglutination inhibition assay (HIA) and subsequently JEV and WNV specific antibodies by foci reduction neutralization test (FRNT).

## MATERIALS AND METHODS

### Study Design

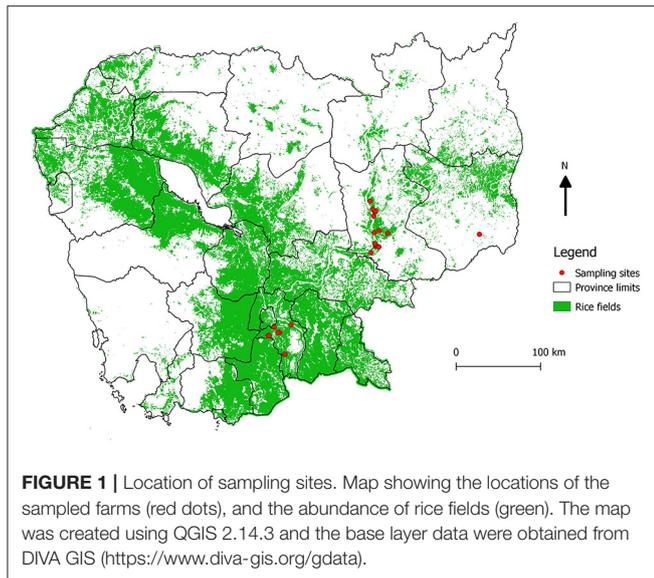
Three geographical areas of Cambodia were selected to get three ecologically contrasted areas according to their landscape characteristics (abundance of rice fields), in addition with their accessibility (distance to Institut Pasteur's laboratory in Phnom Penh) and the ability to provide sufficient number of samples. The fieldwork was conducted in three different provinces in March 2016: Kandal, being a rural area dominated by rice fields, Mondulkiri, mainly dominated by forests and Kratie as an intermediate landscape (**Figure 1**). The objective was to collect samples from at least ten farms per area to get as much representativity as possible. In each farm, animals were randomly selected and according to the owner agreement.

### Ethics Statement

During this study, we followed the World Animal Health Organization (OIE) guiding principles on animal welfare included in the OIE Terrestrial Animal Health Code (34). All sampling campaigns were implemented with the supervision of the National Animal Health and Production Research Institute (NAHPRI), and local veterinary services.

### Sample Collection

Only chickens and ducks born in the sampling area were included in the study. Blood samples were taken from the ulnar or



metatarsal vein. The blood was transferred into serum tube, stored on ice and at 4°C, and centrifuged later (within the sampling day or up to 5 days after sampling depending on the province) to acquire the respective serum sample. Characteristics of the farm and the GPS coordinates of each farm were collected. If known, the age of the birds was given by the farmers.

## Cells and Viruses

Vero cells (ATCC CCL-81) were used for the detection of neutralizing antibodies via FRNT. They were cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA) and 100 U/ml penicillin-streptomycin (Gibco) at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. All viruses were grown in C6/36 *Aedes albopictus* cells and harvested from the supernatant. The mosquito cells were cultured in Leibovitz-15 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (Gibco), 10% tryptose-phosphate (Gibco) and 100 U/ml penicillin-streptomycin at 28°C.

The HIA was performed with the following flavivirus strains: JEV Nakayama (Genbank EF571853), Dengue 2 (DENV-2) strain New Guinea C (Genbank AF038403), Dengue 3 (DENV-3) H87 (Genbank M93130), and Zika (ZIKV) HD78788 (Genbank KF383039, KF383084, KF383047). The FRNT was performed with the above-mentioned JEV reference strain Nakayama and the WNV lineage 1 isolate EG101 (Genbank AF260968).

## Hemagglutination Inhibition Assay (HIA)

The presence of antibodies in the serum samples was analyzed with the HIA using antigen originated from the above-mentioned JEV, DENV-2, DENV-3, and ZIKV strains. The assay followed the protocol previously described (33) adapted to 96 well microtiter plate.

## Foci Reduction Neutralization Test (FRNT)

Due to the high cross-reactivity of the HIA, we aimed to characterize the flavivirus antibodies with a more virus-specific assay. Therefore, we analyzed a subset of 65 sera (39 chicken,

26 duck samples) by foci reduction neutralization tests (FRNTs) against JEV and WNV. The respective samples were chosen because (i) there was sufficient sera volume remaining to perform the FRNT, and (ii) the sample was formerly positive in the HIA for at least one of the tested viruses (JEV, DENV-2, DENV-3, and ZIKV).

The FRNT micro-neutralization assay using reference viruses for JEV and WNV determined the level of neutralizing antibodies and was performed as described previously (35). Briefly, heat inactivated serum samples were analyzed using Vero cells (ATCC CCL-81) seeded in 96 well plates. Serum samples were serially diluted and mixed with equal volume of virus. Virus-serum mixtures were incubated for 1 h at 37°C, and then used for inoculation of Vero cell monolayers. After 1 h of incubation at 37°C on Vero cells, the virus-serum mixtures were replaced by a semi-solid overlay containing 1.6% carboxymethyl cellulose (Sigma-Aldrich) in DMEM medium supplemented with 3% FBS. The plates were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere, and stained the following day. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) in phosphate buffered saline (PBS) for 30 min. Afterwards, the plates were incubated sequentially with 0.5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in PBS for 20 min and with 10% FBS in PBS, polyclonal anti-JEV or anti-WNV mouse hyperimmune ascites fluids (IPC, Cambodia) and anti-mouse IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (Bio-Rad, Marnes La Coquette, France) for 1 h each. Finally, the infected cells were visualized with TrueBlue peroxidase substrate (KPL, Gaithersburg, MD, USA). The amount of neutralizing antibodies (nAb) is expressed as the reciprocal serum dilution that induces 50% reduction of infection visualized as foci (FRNT<sub>50</sub>) compared to the controls (flavivirus-negative control serum and virus dilution without added serum) and was calculated via log probit regression analysis (SPSS for Windows, Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). FRNT<sub>50</sub> titers below 10 were considered negative.

## Statistical Analysis

All FRNT titer calculations were performed as log probit regression by using SPSS for Windows, version 23.0. The statistical analyses were performed using R 3.6.0 (36). The arithmetic means of antibody titers were used for comparative analysis. Given the different diagnostic tests used, we considered the results from the HIA test for flavivirus prevalence, which has been carried out on all samples. Association between seroprevalence and species, age and province was first tested on the whole dataset ( $n = 620$ ) using a Chi-square test. Age was categorized in 3-month increments (Table 1): 1–3 months old, 4–6 months old, 7–9 months old, and 10 months or older. The age was not precisely known for 128 domestic birds, however 22 of these birds which were adults, were categorized as 10 months or older.

A generalized linear model (glm) was used to assess the link between seroprevalence and age, species and province. Animals for which the exact age was unknown, including all sampled in Mondulhiri, were excluded from the multivariate analysis, and age was used as a discrete variable (age in months). Due to the sampling frame and potential overdispersion, the province (Kandal and Kratie), was incorporated in the model, either as a

**TABLE 1 |** Flavivirus seroprevalence based on hemagglutination inhibition assay ( $n = 620$ ).

	Samples tested $n$ (%)	HIA positive* $n$ (%)		Samples tested $n$ (%)	HIA positive* $n$ (%)
Total	620	180 (29.0)			
<b>Province</b>					
Kandal	296 (47.7)	58 (19.6)			
Kratie	283 (45.6)	98 (34.6)			
Mondulkiri	41 (6.6)	24 (58.5)			
<b>Species</b>					
Chicken	417 (67.3)	99 (23.7)			
Duck	203 (32.7)	81 (39.9)			
<b>Age mean (95% CI)</b>	7.93 (7.19–8.67)		<b>Age groups</b>		
1 month	11 (1.8)	2 (18.2)	1–3 month	195 (31.5)	33 (16.9)
2 months	105 (16.9)	20 (19.0)			
3 months	79 (12.7)	11 (13.9)			
4 months	96 (15.5)	23 (24.0)	4–6 months	144 (23.2)	29 (20.1)
5 months	18 (2.9)	2 (11.1)			
6 months	30 (4.8)	4 (13.3)			
7 months	10 (1.6)	2 (20.0)	7–9 months	28 (4.5)	6 (21.4)
8 months	17 (2.7)	4 (23.5)			
9 months	1 (0.2)	0 -			
10 months	8 (1.3)	4 (50.0)	≥10 months#	147 (23.7)	75 (51.0)
11 months	1 (0.2)	0 -			
12 months	32 (5.2)	18 (56.3)			
18 months	9 (1.5)	4 (44.4)			
24 months	57 (9.2)	35 (61.4)			
27 months	2 (0.3)	0 -			
30 months	10 (1.6)	0 -			
36 months	6 (1.0)	2 (33.3)			
Unknown #	128 (20.6)	49 (38.3)	Unknown	106 (17.1)	37 (34.9)

\*HIA titer  $\geq 80$  in at least one of the tested flaviviruses (JEV, DENV-2, DENV-3, ZIKV).

#Including 22 birds with an estimated age of <12 months.

HIA Hemagglutination inhibition assay; JEV Japanese encephalitis virus; WNV West Nile virus, DENV dengue virus, ZIKV Zika virus.

fixed or a random effect (glmm). The best model was selected according to the Akaike Information Criteria (AIC).

## RESULTS

### Sample Collection

In total, 620 samples were collected (Table 1) in 41 backyard farms with an average of 15 samples per farm. The collection contained 417 (67.3%) blood samples collected from chickens (*Gallus gallus domesticus*) and 203 (32.7%) from ducks (*Anas platyrhynchos domesticus*). In detail, 296 samples (47.7%) were collected in the Kandal province, 283 samples in Kratie (45.6%) and 41 samples (6.6%) in Mondulkiri. The age of the 492 (79.4%) domestic birds could be obtained, and ranged from one to 36 months (mean 7.93 months; 95% CI 7.19–8.67; Supplementary Table 1).

**TABLE 2 |** Results of the univariate analysis ( $\chi^2$ ) between seroprevalence and other factors ( $n = 620$ ).

Variable	Df	P-value
Species	1	3.20e-5
Province	2	3.35e-8
Age group	3	4.79e-12

### Flavivirus Seroprevalence Based on HIA

Overall, 180 samples (29%) were detected positive by HIA for at least one of the flaviviruses tested (JEV, DENV-2, DENV-3, and ZIKV) (Table 1). The univariate analysis (Table 2) revealed a significant higher proportion of ducks (39.9%, 81/203 samples) with anti-flavivirus antibodies compared to the amount of positive tested chickens (23.7%; 99/417). The observed flavivirus seroprevalence was also different for the investigated provinces with the lowest seroprevalence in Kandal (19.6%, 58/296 samples), and the highest for Mondulkiri (58.5%; 24/41 samples). Additionally, the seroprevalence rate increased with the age of the birds as antibodies were found in 16.9% (33/195 samples) of young birds (1–3 months old) rising to 51.0% (75/147 samples) in birds that were 10 months or older. For 22.3% (138/620) of the samples, JEV hemagglutinating antibodies were detected (Supplementary Table 1). Also, 157 samples (25.3%) were tested positive for antibodies against DENV-2 and/or DENV-3, and 63 samples (10.2%) against ZIKV. Most of the HIA positive samples showed a positive reaction against more than one of the tested viruses (Table 4), as 76.6% (138/180) of the positive samples had antibodies against JEV, and 87.2% (157/180) against DENV-2 and/or DENV-3.

Regarding the HIA titers for the individual domestic birds, the mean HIA titers differ significantly between the investigated viruses (Supplementary Figure 1). The mean JEV HIA titer was 83.47 (95% CI 58.5–108.5) and therefore significantly lower than for DENV-3 (mean 263.4; 95% CI 146.1–380.8;  $p = 0.0006$ ; Friedman test with Dunn’s multiple comparison test). The DENV-3 HIA titers were also significantly higher than for DENV-2 (mean 177.2; 95% CI 111.1–243.4;  $p < 0.0001$ ). Overall, the mean ZIKV HIA was significantly lower than for the other three viruses (mean 39.97; 95% CI 25.28–54.65;  $p < 0.0001$ ). The JEV HIA titers correlated moderate with the HIA titers against the other flaviviruses (DENV-2  $r = 0.62$ ; DENV-3  $r = 0.59$ ; ZIKV  $r = 0.65$ ; Supplementary Figure 2). The DENV-2 and DENV-3 titers correlated strongly ( $r = 0.90$ ) but less so with the closely related ZIKV (DENV-2  $r = 0.53$ ; DENV-3  $r = 0.49$ ).

According to AIC (AICglm = 553 vs. AICglmm = 558), the best generalized linear model with the flavivirus serological status based on HIA as outcome, and age, species and province as explanatory variables, incorporated the province as a fixed effect. This model confirmed the results of the univariate analysis: the seroprevalence rate is significantly higher in ducks compared to chickens (OR = 3.01, 95%CI: 1.97–4.63) and slightly increased with age (OR = 1.04, 95% CI: 1.0–21.07; Table 3, Figure 2). Domestic birds were also more exposed in Kratie than in Kandal (OR = 2.01, 95%CI: 1.31–3.09).

## JEV- and WNV-Specific Seroprevalence Based on FRNT

Among all the HIA-positive samples ( $n = 180$ ), we analyzed a subset of 65 sera by foci reduction neutralization tests (FRNTs) against JEV and WNV based on criteria previously exposed (see Materials and Methods). The comparison of FRNT and HIA results showed that from the 65 samples tested positive for flavivirus hemagglutinating antibodies, only 35 had

detectable levels of nAb for JEV and/or WNV (Table 4). From this subset, 28 samples showed nAb against JEV, including 12 sera that additionally had detectable levels of WNV nAb (Figure 3A). Interestingly, seven bird samples had nAb only against WNV and not against JEV. Most samples with detected nAb also showed HIA antibodies against more than one of the tested viruses (Table 4). Only one adult duck from Kandal with nAb against WNV was HIA positive exclusively against ZIKV.

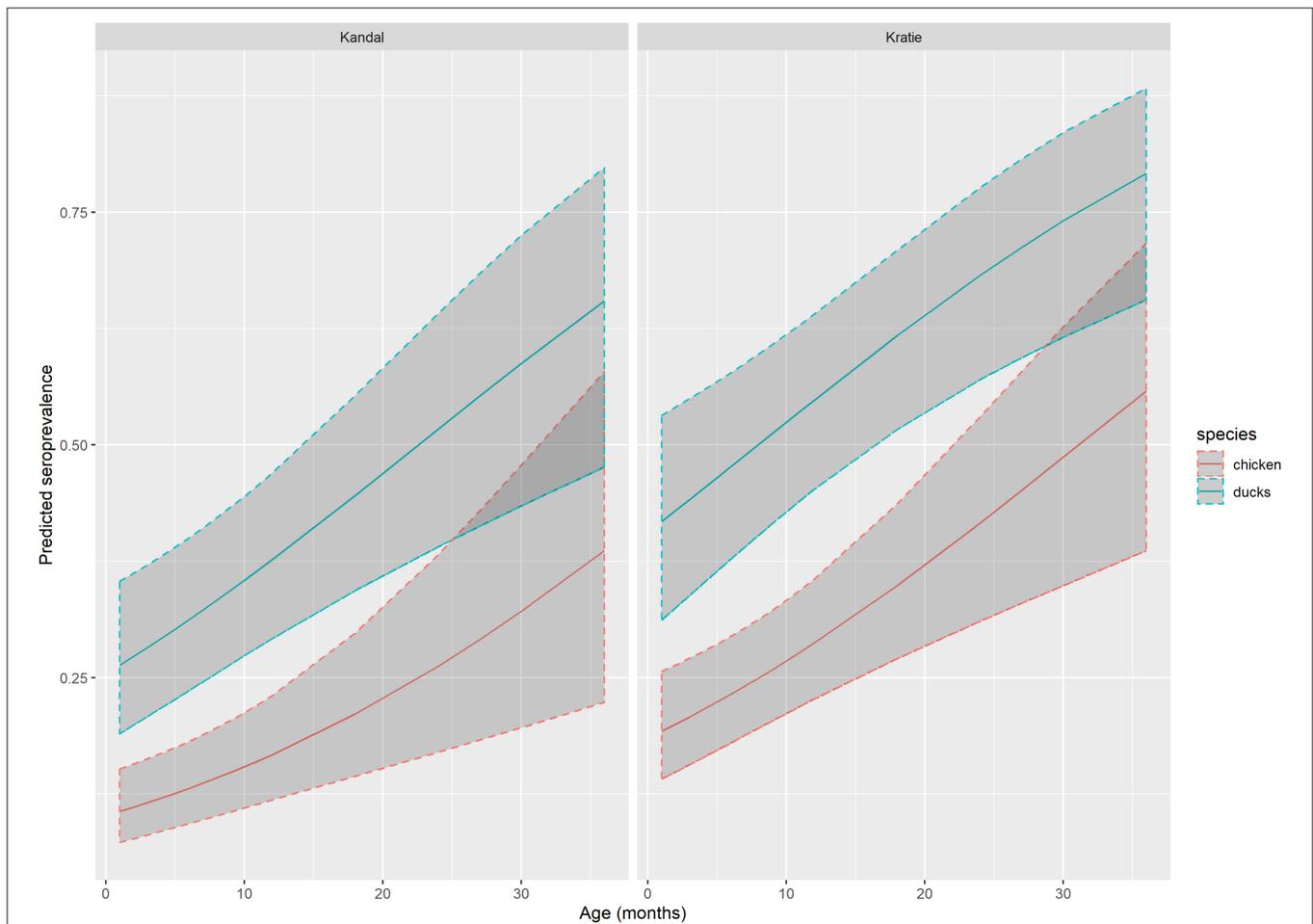
The mean FRNT<sub>50</sub> titer of JEV nAb (21.14; SD 35.08; 95% CI 12.45–229.83) was similar to the mean WNV FRNT<sub>50</sub> titer (19.43; SD 46.89; 95% CI 7.81–31.05). The number of FRNT positive birds (Supplementary Table 2) and the levels of nAb (Supplementary Figure 3) did not significantly differ between poultry species or province of origin. Also, the nAb titers were significantly higher in the birds that were tested double positive for both JEV and WNV nAb compared to single positive sera (JEV  $p = 0.002$ ; WNV  $p = 0.014$ ; Mann-Whitney, Supplementary Figure 3C). We observed a weak correlation of the nAb titers

**TABLE 3** | Results of generalized linear model ( $n = 492^*$ ).

Explanatory variable	P-value	OR [IC 95%]
Intercept	<2e-16	0.11 [0.07–0.17]
Species (ref=chicken)	3.89e-7	3.01 [1.97–4.63]
Province (ref=Kandal)	1.39e-3	2.01 [1.31–3.09]
Age	7.29e-5	1.05# [1.02–1.07]

\*Birds with unknown or only estimated age (e.g., ">12 months") were removed from the analysis.

#Odds ratio of being seropositive for an additional month of age is 1.04.



**FIGURE 2** | Flavivirus seroprevalence predicted by GLM. Predicted flavivirus seroprevalence in Kandal and Kratie provinces, for chicken (red line) and ducks (blue line) by age with 95% confidence interval (dark gray area) based on the generalized linear model.

**TABLE 4** | Comparison of HIA and FRNT results.

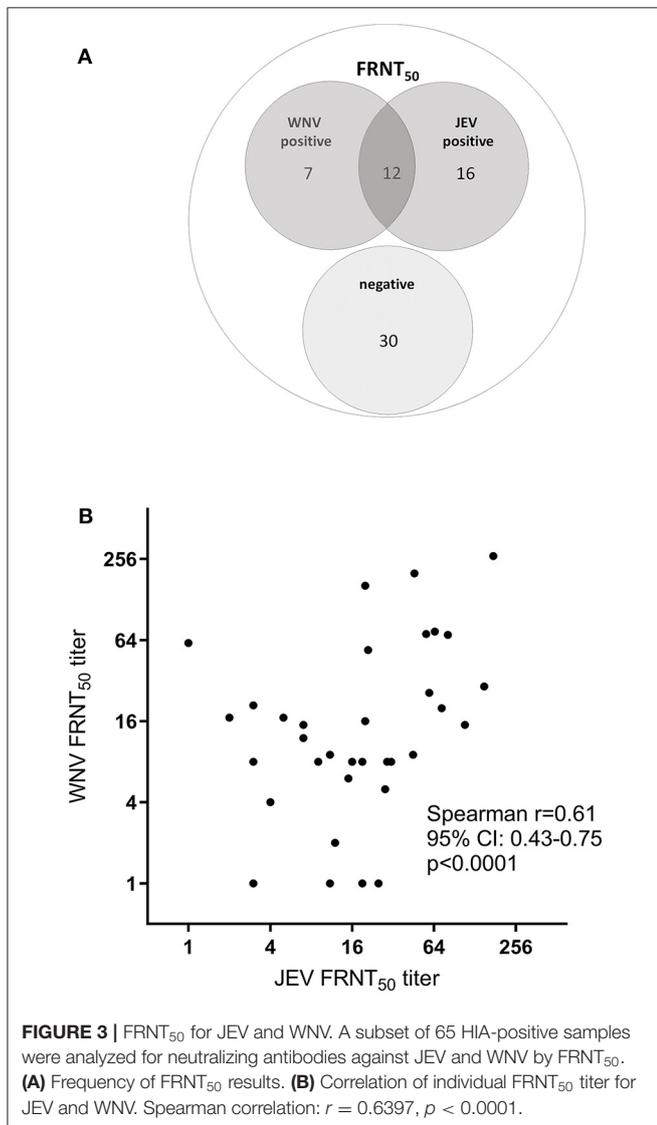
Number of positive results*	1		2		3		4		6		7	
	Flavivirus HIA	JEV HIA	DENV # HIA	ZIKV HIA	JEV FRNT <sub>50</sub> <sup>§</sup>	WNV FRNT <sub>50</sub> <sup>§</sup>	Flavivirus HIA	JEV HIA	DENV # HIA	ZIKV HIA	JEV FRNT <sub>50</sub> <sup>§</sup>	WNV FRNT <sub>50</sub> <sup>§</sup>
1	Flavivirus HIA	180	138	157	63	28	19					
2	JEV HIA	138		118	60	21	18					
3	DENV HIA <sup>#</sup>	157		118	53	26	15					
4	ZIKV HIA	63		60	53	8	5					
5	JEV & WNV FRNT <sub>50</sub>	35		27	31	10	19					
6	JEV FRNT <sub>50</sub> <sup>§</sup>	28		21	26	8	12					
7	WNV FRNT <sub>50</sub> <sup>§</sup>	19		18	15	5	-					

<sup>§</sup> FRNT tested subset of 65 sera.  
<sup>\*</sup> HIA titer ≥80, FRNT<sub>50</sub> titer ≥10.  
<sup>#</sup> HIA for DENV-2 and/or DENV-3.

### DISCUSSION

Our study found an overall flavivirus seroprevalence of 29% in domestic birds. This high percentage of seropositive poultry is highly likely due to the fact that JEV is endemic in Cambodia (31). This is similar to the findings of other JEV seroprevalence studies in Southeast Asia. In Bali (Indonesia) 20.6% of ducks and 36.7% of chickens were tested positive (37), and a study in Malaysia found 28.9% of the tested domestic birds positive for JEV antibodies (38). In addition, several experimental studies showed that domestic birds can be infected with JEV (5, 14, 15) and might even act as JEV reservoirs (39, 40). However, it is controversially discussed if they develop a sufficient viremia to infect mosquitoes (14, 41–43). In our study, ducks were more likely to be seropositive when they are 10 months or older than chickens (87.1% of ducks seropositive compared to 33.3% of chickens of that age). This could be due to feeding behavior of certain mosquitoes, different exposure due to distinct housing conditions or simply because ducks are usually kept longer before slaughtering than chickens.

Flavivirus detection in animals and humans especially in prevalence studies is mainly done serologically, as the viremic phase is rather short (44), e.g., JEV viremia lasts <1 week in chicks and ducklings (14). Yet, the co-circulation of several flaviviruses poses a diagnostic challenge due to the broad antibody cross-reactivity within and across the different serocomplexes (45). Indeed, extensive cross-reactivity is known for JEV and WNV even leading to reports of cross-protection (46, 47). Despite intensive attempts to develop specific diagnostic assays, the neutralization test is still considered to be the gold standard for the serological differentiation of flaviviruses (3). Due to the cross-reactivity, retrospective seroprevalence studies for flaviviruses are challenging in regions where more than one of these viruses circulate. The HIA is characterized by a high cross-reactivity which generally only allows a qualitative conclusion about the presence of flavivirus antibodies (48–51). Our HIA analysis and the moderate correlation of HIA titers among all viruses also demonstrated a high cross-reactivity especially between the two DENV serotypes 2 and 3 (Spearman  $r = 0.8999$ ). In contrast, the correlation between the DENV HIA titers and the



between both viruses (Figure 3B;  $r = 0.64$ ;  $p < 0.0001$ ; Pearson correlation).

other viruses was less pronounced. This could be a consequence of the degree of antigenic similarities between the viruses (52), as the closely related DENV serotypes showed a high degree of correlation whereas JEV belongs to a different serocomplex than DENV and ZIKV. Additionally, DENV infection is not reported in poultry and therefore the antibodies measured against DENV might be the result of a non-specific immune response after a JEV infection. As a consequence of the endemicity of several flaviviruses in Cambodia, we chose a high threshold of  $\geq 80$  for HIA positivity. For the much more specific neutralization assay (FRNT), we chose the less stringent criteria for positivity by using the FRNT<sub>50</sub> titer instead of FRNT<sub>90</sub> and a threshold of  $\geq 10$  for positivity. This strategy was also used in other flavivirus seroprevalence studies in birds (48, 53, 54).

A limitation of our study is the uneven sample distribution regarding species, age and province of the animals. There were much less birds sampled in Monduliri province and ducks were overall underrepresented in the study cohort. We also had proportionally more samples from young chickens (1–3 months old) and older ducks ( $\geq 10$  months; see **Supplementary Table 1**). Furthermore, we did not include WNV in the HIA because WNV is not endemic in Cambodia and therefore this virus is not part of our routine serological testing. Moreover, not all HIA positive samples could be tested with FRNT because of insufficient sera volume. Additionally, this assay is time- and labor-consuming. However, the samples analyzed with FRNT were not significantly different from the samples not tested with FRNT and from all samples that were tested positive for any flavivirus HIA (**Supplementary Table 2**), even if the HIA titers are slightly lower for the subset of FRNT samples compared to all HIA positive samples.

To our knowledge, this is the first serological evidence of WNV circulation in Cambodia, where the virus was last found before the 1980s (4). However, with our study we were only able to trace nAb against WNV in 7 domestic birds in the absence of JEV nAb. The direct detection of WNV in poultry, humans or mosquitoes as thorough evidence is still missing. The global distribution of WNV in tropical and temperate regions of Europe, Africa, the Americas, Western and central Asia is well-documented (17, 18, 55). In Southeast Asia, the main encephalitic flavivirus is still JEV (56). However, concerns about the ability of WNV to spread along bird migration routes are appropriate based on the recent expansion of WNV circulation in Eurasia (57) and the explosive dissemination of WNV in the Americas since the New York city outbreak in 1999 (58, 59). Importantly, despite their high serological cross-reactivity and virological similarities, JEV and WNV show distinct ecological and epidemiological specificities. Despite that both can be transmitted by *Culex* mosquitoes, the main vector of JEV is *Culex tritaeniorhynchus*, even as it was found in over 30 other mosquito species (9), whereas WNV is mainly transmitted by females of the *Culex pipiens* complex and their hybrids. For the endemic circulation of JEV, pigs play an important role as amplification hosts (60). In contrast, WNV can exclusively replicate in birds, especially in Passerines (61, 62).

Overall, recent studies investigated intensely the role of pigs in the JEV epidemiology as these are well-known amplification hosts for the virus. However, the contribution of poultry to the

circulation of JEV remains understudied. Our study provides confirmation of a high seroprevalence for JEV in poultry as well as the first evidence of the circulation of WNV in domestic birds in the region. These findings may have consequences for the definition of areas at risk for JEV transmission, as the JEV might be able to circulate in areas with low densities of pigs or no pigs. This emphasizes the need for further and intensified surveillance of mosquito-transmitted diseases where backyard animals serve as potential amplification hosts.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

Ethical review and approval was not required for the animal study because there is no national (Cambodian) animal ethics committee. We followed the World Animal Health Organization (OIE) guiding principles on animal welfare included in the OIE Terrestrial Animal Health Code. All sampling campaigns were implemented with the supervision of the National Animal Health and Production Research Institute (NAHPRI), and local veterinary services. We provided the respective letter of approval from NAHPRI to the editorial office. Written informed consent was obtained from the owners for the participation of their animals in this study.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

PD, JC, and VC: conceived and designed the study, the laboratory investigations and wrote the paper (comment and editing). A-SR and VC: sample collection and epidemiological analysis. HA, SI, and SM: performed the laboratory investigations. HA, A-SR, VD, and VC: analyzed the data. SS, ST, SI, VD, PD, and VC: contributed field work, reagents, materials, and analysis tools. HA, A-SR, and HL: wrote the paper (original draft).

## FUNDING

This work was partial funded by ComAcross project (<http://www.onehealthsea.org/comacross>) and the Virology Unit of Institut Pasteur du Cambodge. The postdoctoral fellowship of HA was supported by the Calmette and Yersin Programme of the Institut Pasteur Department of International Affairs.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank all farmers who participated in the study and allowed the sampling of their animals.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2020.00015/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Calisher CH, Karabatsos N, Dalrymple JM, Shope RE, Porterfield JS, Westaway EG, et al. Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol.* (1989) 70:37–43. doi: 10.1099/0022-1317-70-1-37
- De Madrid AT, Porterfield JS. The flaviviruses (group B arboviruses): a cross-neutralization study. *J Gen Virol.* (1974) 23:91–6. doi: 10.1099/0022-1317-23-1-91
- van den Hurk AF, Ritchie SA, Mackenzie JS. Ecology and geographical expansion of Japanese encephalitis virus. *Annu Rev Entomol.* (2009) 54:17–35. doi: 10.1146/annurev.ento.54.110807.090510
- Chancey C, Grinev A, Volkova E, Rios M. The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res Int.* (2015) 2015:1–20. doi: 10.1155/2015/376230
- Gresser I, Hardy JL, Hu SM, Scherer WF. Factors influencing transmission of Japanese B encephalitis virus by a colonized strain of *Culex tritaeniorhynchus* Giles, from infected pigs and chicks to susceptible pigs and birds. *Am J Trop Med Hyg.* (1958) 7:365–73. doi: 10.4269/ajtmh.1958.7.365
- Hurlbut HS. The Pig-Mosquito Cycle of Japanese Encephalitis Virus in Taiwan. *J Med Entomol.* (1964) 1:301–307. doi: 10.1093/jmedent/1.3.301
- Ladreyt H, Durand B, Dussart P, Chevalier V. How central is the domestic pig in the epidemiological cycle of Japanese Encephalitis Virus? A review of scientific evidence and implications for disease control. *Viruses.* (2019) 11:949. doi: 10.3390/v11100949
- Buescher EL, Scherer WF, McClure HE, Moyer JT, Rosenberg MZ, Yoshii M, et al. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. IV. Avian infection. *Am J Trop Med Hyg.* (1959) 8:678–88. doi: 10.4269/ajtmh.1959.8.678
- Scherer WF, Moyer JT, Izumi T, Gresser I, McCown J. Ecologic studies of Japanese encephalitis virus in Japan. VI. Swine infection. *Am J Trop Med Hyg.* (1959) 8:698–706. doi: 10.4269/ajtmh.1959.8.698
- Wojnarowicz C, Olkowski A, Schwan-Lardner K. First Canadian outbreak of West Nile virus disease in farmed domestic ducks in Saskatchewan. *Can Vet J.* (2007) 48:1270–1. Available online at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2081995/pdf/cvj48pg1270.pdf>
- Maquart M, Boyer S, Rakotoharinome VM, Ravaomanana J, Tantely ML, Heraud J-M, et al. High prevalence of West Nile Virus in Domestic Birds and Detection in 2 new mosquito species in Madagascar. *PLoS ONE.* (2016) 11:e0147589. doi: 10.1371/journal.pone.0147589
- Monastiri A, Mechri B, Vázquez-González A, Ar Gouilh M, Chakroun M, Loussaief C, et al. A four-year survey (2011–2014) of West Nile virus infection in humans, mosquitoes and birds, including the 2012 meningoencephalitis outbreak in Tunisia. *Emerg Microbes Infect.* (2018) 7:28. doi: 10.1038/s41426-018-0028-y
- Meece JK, Kronenwetter-Koepel TA, Vandermause MF, Reed KD. West Nile Virus Infection in Commercial Waterfowl Operation, Wisconsin. *Emerg Infect Dis.* (2006) 12:1451–3. doi: 10.3201/eid1209.051648
- Cleton NB, Bosco-Lauth A, Page MJ, Bowen RA. Age-related susceptibility to Japanese encephalitis virus in domestic ducklings and chicks. *Am J Trop Med Hyg.* (2014) 90:242–6. doi: 10.4269/ajtmh.13-0161
- Dhanda V, Banerjee K, Deshmukh PK, Ilkal MA. Experimental viraemia and transmission of Japanese encephalitis virus by mosquitoes in domestic ducks. *Indian J Med Res.* (1977) 66:881–8.
- Chhour YM, Ruble G, Hong R, Minn K, Kdan Y, Sok T, et al. Hospital-based Diagnosis of Hemorrhagic Fever, Encephalitis, and Hepatitis in Cambodian Children. *Emerg Infect Dis.* (2002) 8:485–9. doi: 10.3201/eid0805.010236
- Horwood PF, Duong V, Laurent D, Mey C, Sothy H, Santy K, et al. Aetiology of acute meningoencephalitis in Cambodian children, 2010–2013. *Emerg Microbes Infect.* (2017) 6:e35. doi: 10.1038/emi.2017.15
- Turner P, Suy K, Van Tan L, Sar P, Miliya T, Hong NTT, et al. The aetiologies of central nervous system infections in hospitalised Cambodian children. *BMC Infect Dis.* (2017) 17:806. doi: 10.1186/s12879-017-2915-6
- Solomon T. Control of Japanese Encephalitis — Within Our Grasp? *N Engl J Med.* (2006) 355:869–71. doi: 10.1056/NEJMp058263
- Solomon T, Dung NM, Kneen R, Gainsborough M, Vaughn DW, Khanh VT, et al. Japanese encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* (2000) 68:405–15. doi: 10.1136/jnnp.68.4.405
- Hills SL, Van Cuong N, Touch S, Mai HH, Soeung SC, Lien TTH, et al. Disability from Japanese encephalitis in Cambodia and Viet Nam. *J Trop Pediatr.* (2011) 57:241–4. doi: 10.1093/tropej/fmp133
- Campbell G, Hills S, Fischer M, Jacobson J, Hoke C, Hombach J, et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis. *Bull World Health Organ.* (2011) 89:766–74. doi: 10.2471/BLT.10.085233
- Mansfield KL, Horton DL, Johnson N, Li L, Barrett ADT, Smith DJ, et al. Flavivirus-induced antibody cross-reactivity. *J Gen Virol.* (2011) 92:2821–9. doi: 10.1099/vir.0.031641-0
- Centers for Disease Control and Prevention. *Final Cumulative Maps & Data for 1999–2018.* (2019) Available online at: <https://www.cdc.gov/westnile/statsmaps/cumMapsData.html>
- European Centre for Disease Prevention and Control. *Epidemiological Update: West Nile Fever in Europe - Number of Infections So far Exceeds the Total Number in the Previous Five Years.* (2014) Available online at: <https://ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-fever-europe-number-infections-so-far-exceeds-total>
- Holt E. West Nile virus spreads in Europe. *Lancet Infect Dis.* (2018) 18:1184. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30616-9
- Cao L, Fu S, Lu Z, Tang C, Gao X, Li X, et al. Detection of West Nile Virus Infection in Viral Encephalitis Cases, China. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* (2019) 19:45–50. doi: 10.1089/vbz.2018.2275
- Balakrishnan A, Thekkakare R, Sapkal G, Tandale B. Seroprevalence of Japanese encephalitis virus & West Nile virus in Alappuzha district, Kerala. *Indian J Med Res.* (2017) 146:70. doi: 10.4103/ijmr.IJMR\_1638\_15
- Khatun T, Chatterjee S. Emergence of West Nile virus in West Bengal, India: a new report. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* (2017) 111:178–84. doi: 10.1093/trstmh/trx033
- Cao L, Fu S, Lv Z, Tang C, Cui S, Li X, et al. West Nile virus infection in suspected febrile typhoid cases in Xinjiang, China. *Emerg Microbes Infect.* (2017) 6:1–4. doi: 10.1038/emi.2017.27
- Touch S, Hills S, Sokhal B, Samnang C, Sovann L, Khieu V, et al. Epidemiology and burden of disease from Japanese encephalitis in Cambodia: results from two years of sentinel surveillance. *Trop Med Int Heal.* (2009) 14:1365–73. doi: 10.1111/j.1365-3156.2009.02380.x
- Mackenzie JS, Williams DT. The Zoonotic Flaviviruses of Southern, South-Eastern and Eastern Asia, and Australasia: the potential for Emergent Viruses. *Zoonoses Public Health.* (2009) 56:338–56. doi: 10.1111/j.1863-2378.2008.01208.x
- Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am J Trop Med Hyg.* (1958) 7:561–73. doi: 10.4269/ajtmh.1958.7.561
- OIE. Use of Animals in Research and Education. In: *OIE Terrestrial Animal Health Code.* Available online at: [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmlfile=chapitre\\_aw\\_research\\_education.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmlfile=chapitre_aw_research_education.htm)
- Auerswald H, de Jesus A, Seixas G, Nazareth T, In S, Mao S, et al. First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. *Parasit Vectors.* *BioMed Central.* (2019) 12:103. doi: 10.1186/s13071-019-3357-3
- R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing.* R Foundation for Statistical Computing (2008).
- Ayu Mirah Adi AA, Astawa NM, Asri Damayanti PA, Kardena IM, Krisna Erawan IGM, et al. Seroepidemiological evidence for the presence of Japanese encephalitis virus infection in ducks, chickens, and pigs, Bali-Indonesia. *Bali Med J.* (2016) 5:189. doi: 10.15562/bmj.v5i3.343
- Kumar K, Arshad SS, Selvarajah GT, Abu J, Toung OP, Abba Y, et al. Prevalence and risk factors of Japanese encephalitis virus (JEV) in livestock and companion animal in high-risk areas in Malaysia. *Trop Anim Health Prod.* (2018) 50:741–52. doi: 10.1007/s11250-017-1490-6
- Liu W, Gibbons RV, Kari K, Clemens JD, Nisalak A, Marks F, et al. Risk factors for Japanese encephalitis: a case-control study. *Epidemiol Infect.* (2010) 138:1292–7. doi: 10.1017/S0950268810000063
- Keiser J, Maltese MF, Erlanger TE, Bos R, Tanner M, Singer BH, et al. Effect of irrigated rice agriculture on Japanese encephalitis, including challenges and opportunities for integrated vector management. *Acta Trop.* (2005) 95:40–57. doi: 10.1016/j.actatropica.2005.04.012

41. Karna A, Bowen R. Experimental evaluation of the role of ecologically-relevant hosts and vectors in Japanese encephalitis virus genotype displacement. *Viruses*. (2019) 11:32. doi: 10.3390/v11010032
42. Pant GR. A serological survey of pigs, horses, and ducks in Nepal for evidence of infection with Japanese encephalitis virus. *Ann N Y Acad Sci*. (2006) 1081:124–9. doi: 10.1196/annals.1373.013
43. Simpson DIH, Bowen ETW, Platt GS, Way H, Smith CEG, Peto S, et al. Japanese encephalitis in Sarawak: virus isolation and serology in a land Dyak village. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. (1970) 64:503–10. doi: 10.1016/0035-9203(70)90070-2
44. Domingo C, Patel P, Linke S, Achazi K, Niedrig M. Molecular diagnosis of flaviviruses. *Future Virol*. (2011) 6:1059–74. doi: 10.2217/fvl.11.77
45. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney M-C, Medits I, Sharma A, et al. Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature*. (2016) 536:48–53. doi: 10.1038/nature18938
46. Kuno G. Serodiagnosis of flaviviral infections and vaccinations in humans. In: Chambers TJ, Monath TP, editors. *Advances in Virus Research*. San Diego, CA: Elsevier Academic Press (2003). p. 3–65. doi: 10.1016/S0065-3527(03)61001-8
47. Litzba N, Klade CS, Lederer S, Niedrig M. Evaluation of serological diagnostic test systems assessing the immune response to Japanese encephalitis vaccination. *PLoS Negl Trop Dis*. (2010) 4:e883. doi: 10.1371/journal.pntd.0000883
48. Buckley A. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol*. (2003) 84:2807–17. doi: 10.1099/vir.0.19341-0
49. Michel F, Fischer D, Eiden M, Fast C, Reuschel M, Müller K, Rinder M, et al. West Nile Virus and Usutu Virus Monitoring of Wild Birds in Germany. *Int J Environ Res Public Health*. (2018) 15:171. doi: 10.3390/ijerph15010171
50. Llopis IV, Rossi L, Di Gennaro A, Mosca A, Teodori L, Tomassone L, et al. Further circulation of West Nile and Usutu viruses in wild birds in Italy. *Infect Genet Evol*. (2015) 32:292–7. doi: 10.1016/j.meegid.2015.03.024
51. Csank T, Drzewnioková P, Korytár L, Major P, Gyuranecz M, Pisl J, et al. A Serosurvey of Flavivirus Infection in Horses and Birds in Slovakia. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. (2018) 18:206–13. doi: 10.1089/vbz.2017.2216
52. Heinz FX, Stiasny K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J Clin Virol*. (2012) 55:289–95. doi: 10.1016/j.jcv.2012.08.024
53. Bazanów B, Jansen van Vuren P, Szymanski P, Stygar D, Fracka A, Twardon J, et al. A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses*. (2018) 10:87. doi: 10.3390/v10020087
54. Michel F, Sieg M, Fischer D, Keller M, Eiden M, Reuschel M, et al. Evidence for West Nile Virus and Usutu Virus Infections in Wild and Resident Birds in Germany, 2017 and 2018. *Viruses*. (2019) 11:674. doi: 10.3390/v11070674
55. Srey VH, Sadones H, Ong S, Mam M, Yim C, Sor S, et al. Etiology of encephalitis syndrome among hospitalized children and adults in Takeo, Cambodia, 1999–2000. *Am J Trop Med Hyg*. (2002) 66:200–7. doi: 10.4269/ajtmh.2002.66.200
56. Paz S, Semenza J. Environmental drivers of West Nile fever epidemiology in Europe and Western Asia—A Review. *Int J Environ Res Public Health*. (2013) 10:3543–62. doi: 10.3390/ijerph10083543
57. Petersen LR, Hayes EB. West Nile Virus in the Americas. *Med Clin North Am*. (2008) 92:1307–22. doi: 10.1016/j.mcna.2008.07.004
58. Pearce JC, Learoyd TP, Langendorf BJ, Logan JG. Japanese encephalitis: the vectors, ecology and potential for expansion. *J Travel Med*. (2018) 25:S16–26. doi: 10.1093/jtm/tay009
59. Oliveira ARS, Cohnstaedt LW, Strathe E, Etcheverry L, McVey DS, Piaggio J, et al. Meta-analyses of Japanese encephalitis virus infection, dissemination, and transmission rates in vectors. *Am J Trop Med Hyg*. (2018) 98:883–90. doi: 10.4269/ajtmh.17-0622
60. Casals J, Brown LV. Hemagglutination with arthropod-borne viruses. *J Exp Med*. (1954) 99:429–49. doi: 10.1084/jem.99.5.429
61. Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, et al. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg Infect Dis*. (2003) 9:311–22. doi: 10.3201/eid0903.020628
62. Yaremych SA, Warner RE, Mankin PC, Brawn JD, Raim A, Novak R. West Nile Virus and High Death Rate in American Crows. *Emerg Infect Dis*. (2004) 10:709–11. doi: 10.3201/eid1004.030499

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Auerswald, Ruget, Ladreyt, In, Mao, Sorn, Tum, Duong, Dussart, Cappelle and Chevalier. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Article

# Comparison of Japanese Encephalitis Force of Infection in Pigs, Poultry and Dogs in Cambodian Villages

Hélène Ladreyt <sup>1,2</sup>, Heidi Auerswald <sup>3</sup> , Sothyra Tum <sup>4</sup>, Sreymom Ken <sup>3</sup>, Leangyi Heng <sup>3</sup>, Saraden In <sup>3</sup>, Sokchea Lay <sup>5</sup>, Chakriyouth Top <sup>3</sup>, Sowath Ly <sup>6</sup>, Veasna Duong <sup>3</sup> , Philippe Dussart <sup>3</sup> , Benoit Durand <sup>1</sup>  and Véronique Chevalier <sup>2,6,7,\*</sup>

<sup>1</sup> Epidemiology Unit, Laboratory for Animal Health, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES), University Paris-Est, 14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort, France; helena.ladreyt@anses.fr (H.L.); benoit.durand@anses.fr (B.D.)

<sup>2</sup> International Center of Research in Agriculture for Development (CIRAD), UMR ASTRE, F-34090 Montpellier, France

<sup>3</sup> Virology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, 5 Monivong Boulevard, P.O. Box. 983, Phnom Penh 12201, Cambodia; hauerswald@pasteur-kh.org (H.A.); ksreymom@pasteur-kh.org (S.K.); hleangyi@pasteur-kh.org (L.H.); insaraden@pasteur-kh.org (S.I.); youthtop@yahoo.com (C.T.); dveasna@pasteur-kh.org (V.D.); pdussart@pasteur-kh.org (P.D.)

<sup>4</sup> National Animal Health and Production Research Institute, General Directorate for Animal Health and Production, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Phnom Penh 12201, Cambodia; sothyratum@gmail.com

<sup>5</sup> Immunology Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, 5 Monivong Boulevard, P.O. Box. 983, Phnom Penh 12201, Cambodia; isokchea@pasteur-kh.org

<sup>6</sup> Epidemiology and Public Health Unit, Institut Pasteur du Cambodge, Institut Pasteur International Network, 5 Monivong Boulevard, PO Box 983, Phnom Penh 12201, Cambodia; lsowath@pasteur-kh.org

<sup>7</sup> International Center of Research in Agriculture for Development (CIRAD), UMR ASTRE, Phnom Penh 12201, Cambodia

\* Correspondence: veronique.chevalier@cirad.fr

Received: 31 July 2020; Accepted: 28 August 2020; Published: 1 September 2020



**Abstract:** Japanese encephalitis virus (JEV) is the main cause of human viral encephalitis in Asia, with a mortality rate reaching 30%, mostly affecting children. The traditionally described cycle involving wild birds as reservoirs, pigs as amplifying hosts and *Culex* mosquitoes as vectors is questioned, with increasing evidence of a more complex multi-host system involved in areas where densities of pigs are low, such as in Cambodia. In 2018, we examined pigs, chickens, ducks and dogs from Kandal province, Cambodia, for antibody response against JEV by hemagglutination inhibition and virus neutralization assays. Forces of infection (FOI) for flaviviruses and JEV were estimated per species and per unit of body surface area (BSA). JEV seroprevalence reached 31% (95% CI: 23–41%) in pigs, 1% (95% CI: 0.1–3%) in chickens, 12% (95% CI: 7–19%) in ducks and 35% (95% CI: 28–42%) in dogs. Pigs were most likely to be infected (FOI: 0.09 per month), but the FOI was higher in ducks than in pigs for a given BSA (ratio of 0.13). Dogs had a lower FOI than ducks but a higher FOI than chickens (0.01 per month). For a given BSA, dogs were less likely to be infected than pigs (ratio of 1.9). In Cambodia, the virus may be circulating between multiple hosts. Dogs live in close contact with humans, and estimating their exposure to JEV infection could be a relevant indicator of the risk for humans to get infected, which is poorly known due to underdiagnosis. Understanding the JEV cycle and developing tools to quantify the exposure of humans is essential to adapt and support control measures for this vaccine-preventable disease.

**Keywords:** Japanese encephalitis virus; multi-host; dog; force of infection; Cambodia

## 1. Introduction

Japanese encephalitis virus (JEV) is the major cause of human viral encephalitis in Southeast Asia. JE is also detected in the rest of Asia, from India in the west to China in the north and Japan in the east, as well as in northern Australia. Its annual incidence has been estimated at around 68,000 cases per year, although these figures may be underestimated since the disease occurs mainly in developing countries where access to care and case identification may be limited [1–3]. Approximately three quarters of cases concern children and JE remains a substantial public health issue even in areas where human vaccination programs are implemented [1]. The fatality rate can reach 30%, and up to 50% of survivors suffer neurological or psychiatric sequelae [4].

It is commonly accepted that JEV is transmitted between reservoirs (Ardeid birds) or amplification hosts (pigs) through the bites of *Culex* mosquitoes and probably some *Aedes* mosquitoes [5–7]. Besides humans and horses, other animals, such as dogs, may be susceptible to JEV infection and are, for now, considered to be dead-end hosts. Indeed, JEV-neutralizing antibodies (nAb) have been found in dogs in Japan [8], but experimentally infected dogs ( $n = 3$ ) showed very low viremia [9].

However, the circulation of JEV may occur as a consequence of a more complex epidemiological system than usually described. Although pigs occupy a central position, many questions remain about the existence of secondary reservoirs [10]. Indeed, JEV has been shown to circulate in areas where there are few or no pigs [11]. On the other hand, domestic birds have been shown to be exposed to JEV, and experimental infections demonstrated that they are able to develop sufficient viremia to be infectious for mosquitoes, suggesting that poultry could act as a secondary reservoir [12–14]. A reservoir can be defined as one or more epidemiologically linked populations in which a pathogen is permanently maintained and from which the infection can be transmitted to a target population [15]. Some authors have studied the concept of such maintenance communities, which may be applied to the circulation of JEV, particularly in Cambodia [16]. A comprehensive approach appears to be essential for understanding the JEV epidemiological cycle, which may be based on distinct maintenance communities according to the area of concern.

In Cambodia, JE is recognized as the most common cause of encephalitis, particularly in children and adolescents, although the exact seroprevalence is not known [17]. Between 2010 and 2013, a survey conducted in two Cambodian hospitals showed that a quarter of acute meningoencephalitis was due to JEV infection [18]. In 2018, more than 45% of childhood encephalitis cases treated in one hospital in Phnom Penh were confirmed to be related to JE (Institut Pasteur du Cambodge personal communication). In Cambodia, most of the field studies on JEV infection and circulation focused on humans, pigs and mosquitoes. They indicated that JEV is endemic and widespread in Cambodia. Regarding pigs, a large serological survey implemented between 2006 and 2007 in farms and slaughterhouses showed that more than 60% of the sampled pigs had been infected with JEV [19]. A longitudinal serosurvey performed in sentinel piglets in peri-urban and rural areas suggest (i) a high circulation of JEV, as the majority of the animals seroconverted within 4 months, and (ii) little seasonal variation in JEV circulation among pigs, despite the existence of a monsoon season in Cambodia (force of infection (FOI) per day, rainy season: 0.032 (sd = 0.006 per day), dry season: 0.046 (sd = 0.008 per day)) [20,21].

Quantifying the relative exposure to JEV of each species, particularly pigs and domestic birds, is a first step to document and study a multi-host transmission system. The probability of a susceptible host to become infected by a given pathogen per time unit can be estimated based on seroprevalence data and can be expressed as forces of infection (FOI). In 2018, we conducted a serological survey in pigs, chickens, ducks and dogs in Kandal Province, Cambodia. Since global human exposure is difficult to estimate due to underdiagnosis, it is indeed questionable to what extent dogs, which live in close proximity to humans, could be a good proxy for human exposure. We used serological data to estimate and compare FOI exerted on individuals of these four species. The relative importance of these hosts in the JEV epidemiological cycle, the existence of a complex multi-host JEV epidemiological system, as well as the potential use of dog as sentinels are discussed.

## 2. Results

### 2.1. Description of Samples and Seroprevalence

Out of the 666 sampled animals, seven pigs and eight chickens were excluded because their age was unknown, and three pigs were excluded because there was insufficient serum to undergo a foci reduction neutralization test (FRNT). Overall, 648 animal sera were tested by hemagglutination inhibition assay (HIA) (112 pigs, 128 ducks, 220 chickens and 188 dogs) and 134 samples (21%) were positive for flavivirus antibodies. We observed a flavivirus seroprevalence of 31% for pigs (95% CI: 23–41%), 2% for chickens (95% CI: 1–5%), 15% for ducks (95% CI: 9–22%), and 40% for dogs (95% CI: 33–48%). Among these HIA-positive sera, 125 revealed neutralizing antibodies (nAb) detectable by FRNT. Based on the assumptions of (i) a low or moderate seroprevalence for poultry and dogs and (ii) that secondary host animals have in general lower antibody titers, we used the less stringent FRNT<sub>50</sub> to increase the sensitivity of our survey. The JEV seroprevalence based on the FRNT<sub>50</sub> results (i.e., the proportion of JEV-positive and JEV and dengue virus (DENV) double-positive animals) was 31% for pigs (95% CI: 23–41%), 1% for chickens (95% CI: 0.1–3%), 12% for ducks (95% CI: 7–19%), and 35% for dogs (95% CI: 28–42%) (Table 1).

**Table 1.** Results of serological tests for flavivirus (measured by hemagglutination inhibition assay (HIA)) and Japanese encephalitis virus (JEV) (measured by foci reduction neutralization test (FRNT)) seroprevalence rates.

Species	HIA (Pos/Tested)	FRNT (Pos/Tested)			Seroprevalence Rates		
		JEV <sup>a</sup>	DENV <sup>b</sup>	JEV and DENV <sup>c</sup>	Flavivirus (HIA) <sup>d</sup>	JEV (FRNT) <sup>e</sup>	
<b>Species</b>							
Pigs	35/112	34/35	0/35	1/35	0.31	0.31	
Chickens	4/220	0/4	2/4	2/4	0.02	0.01	
Ducks	19/128	2/19	2/19	13/19	0.15	0.12	
Dogs	76/188	63/76	4/76	2/76	0.40	0.35	
<b>Districts of origin</b>							
Khsach Kandal	112/335	84/112	6/112	15/112	0.33	0.30	
Kean Svay	18/110	14/18	2/18	2/18	0.16	0.15	
Koh Thum	4/168	1/4	0/4	1/4	0.02	0.01	
Angk Snuol	0/30	nd	nd	nd	0	nd	
S'ang	0/5	nd	nd	nd	0	nd	
<b>Age groups *</b>							
Pigs	2–4 months	9/58	9/9	0/9	0/9	0.16	0.16
	>4–5 months	12/28	11/12	0/12	1/12	0.43	0.43
	>5–6 months	14/26	14/14	0/14	0/14	0.54	0.54
Chickens	1–2 months	0/129	nd	nd	nd	0	nd
	>2–3 months	3/59	0/3	2/3	1/3	0.05	0.02
	>3–24 months	1/32	0/1	0/1	1/1	0.03	0.03
Ducks	1–2 months	2/65	1/2	0/2	0/2	0.03	0.02
	>2–5.5 months	6/40	1/6	0/6	4/6	0.15	0.13
	>5.5–15 months	11/23	0/11	2/11	9/11	0.48	0.39
Dogs	1.5–24 months	30/103	21/30	3/30	1/30	0.29	0.21
	>24–48 months	26/45	25/26	0/26	0/26	0.58	0.56
	>48–108 months	20/40	17/20	1/20	1/20	0.50	0.45

pos: positives; JEV: Japanese encephalitis virus; DENV: Dengue virus (DENV-3 explicitly). \* For all species, age groups were determined based on the quartiles of their age distribution; <sup>a</sup> Only JEV nAb detected or JEV nAb titer four times higher than DENV nAb titer; <sup>b</sup> Only DENV nAb detected or DENV nAb titer four times higher than JEV nAb titer; <sup>c</sup> Both JEV and DENV nAb detected with similar nAb titer (less than a factor four difference); <sup>d</sup> HIA positives/HIA tested; <sup>e</sup> (JEV positives + JEV and DENV double positives)/HIA tested; nd: not done.

In pigs, JEV seroprevalence did not significantly differ between farms and backyards with 26% (95% CI: 14–40%) and 35% (95% CI: 24–48%), respectively (Fisher’s test  $p = 0.3$ ). In chickens, 1% of the animals were JEV-positive in farms (95% CI: 0–6%) and 1% in backyards (95% CI: 0–4%) (Fisher’s test  $p = 1$ ). In ducks, JEV seroprevalence differed significantly between farms and backyards: 41% in farms (95% CI: 25–59%) against 1% in backyards (95% CI: 0–6%) (Fisher’s test,  $p < 10^{-4}$ ), although ducks were older in farms than in backyards (median age of 6 and 2 months, respectively). Indeed, JEV seroprevalence significantly increased with the age group (Fisher’s test, pigs:  $p = 0.0005$ ; ducks:  $p < 10^{-4}$ ; dogs:  $p < 10^{-4}$ ), except for chickens (Fisher’s test,  $p = 0.17$ ).

## 2.2. Multivariate Analysis

Based on HIA and FRNT results, we analyzed the risk of flavivirus and JEV infection, respectively (Table 2). Animals from Angk Snuol and S’ang districts ( $n = 35$ ) were excluded from the dataset as no positive sample were found. Compared to pigs, JEV seropositivity risk was significantly lower in chickens (OR = 0.03, 95% CI: 0.01–0.12), and in dogs (OR = 0.38, 95% CI: 0.18–0.79). Oppositely, we detected no significant difference of seropositivity risk between ducks and pigs. After controlling the species effect, age increased the JEV seropositivity risk, with an odd ratio of 1.14 (95% CI: 1.06–1.23) for a difference of 6 months. Similar results were obtained for the risk of flavivirus seropositivity, except that the difference between dogs and pigs was not significant (Table 2).

**Table 2.** Results of the multivariate model for flavivirus (measured by HIA) and JEV (measured by FRNT) seroprevalence in pigs, poultry and dogs of Kandal province, Cambodia.

Variable	Value	Flavivirus Seroprevalence (HIA)		JEV Seroprevalence (FRNT)	
		OR (95% CI)	<i>p</i> -Value	OR (95% CI)	<i>p</i> -Value
Species	Pigs	ref.	-	ref.	-
	Chickens	0.07 (0.02–0.19)	<0.0001	0.03 (0.01–0.12)	<0.0001
	Ducks	0.69 (0.31–1.49)	0.34	0.50 (0.22–1.11)	0.09
	Dogs	0.62 (0.31–1.25)	0.18	0.38 (0.18–0.79)	0.009
Age	quantitative	1.12 * (1.04–1.2)	0.003	1.14 * (1.06–1.23)	0.0004

\* Odds Ratios (OR) correspond to an age difference of 6 months.

## 2.3. Estimation of the Force of Infection (FOI) for Flaviviruses and JEV in the Sampled Animals

The FOI estimates for JEV were 0.09 per month for pigs, 0.03 per month for ducks, 0.01 per month for dogs, and 0.003 per month for chickens (Table 3); a pig was three times more likely to get JEV infected than a duck, and a duck was ten times more likely to be JEV infected than a chicken. As the confidence intervals of estimated FOI do not overlap, the probability of JEV infection was significantly higher in pigs than in ducks, higher in ducks than in dogs, and also higher in dogs than in chickens. Same results were found for flavivirus FOI. In order to rule out a “district” effect on the estimated FOIs, we estimated the FOIs for Khsach Kandal only, as it was the only district where all four species were sampled (Table S1). Estimated FOIs were similar to those estimated for all districts, except for chickens, which were all found negative in Khsach Kandal.

**Table 3.** Estimated forces of infection (FOI) per month for flaviviruses and JEV by species.

	Flavivirus FOI (HIA)		JEV FOI (FRNT)	
	FOI	95% CI	FOI	95% CI
<b>Pigs</b>	0.09	(0.07–0.11)	0.09	(0.07–0.11)
<b>Ducks</b>	0.04	(0.03–0.06)	0.03	(0.02–0.04)
<b>Dogs</b>	0.02	(0.01–0.02)	0.01	(0.01–0.02)
<b>Chickens</b>	0.007	(0.003–0.014)	0.003	(0.001–0.009)

#### 2.4. Force of Infection per Body Surface Area (BSA)

In the present study, the median weight was 90 kg for pigs (median age of 4 months), 0.8 kg for chickens and ducks (median age of 2 months), and 15 kg for dogs (median age of 25 months). The ratios of FOI per unit of body surface area (BSA) was 0.13 between pigs and ducks, indicating that, for a given BSA, ducks are more likely to get JEV infected than pigs. In contrast, the ratios of FOI per unit of BSA was 1.3 between pigs and chickens, and 1.9 between pigs and dogs, suggesting that both chickens and dogs are less likely to get JEV infected than pigs for a given BSA.

#### 2.5. Comparison of FOI for Poultry in 2016 and 2018

The estimated FOI for flaviviruses was 0.05 per month (95% CI: 0.04–0.07) for ducks and 0.03 per month in chickens (95% CI: 0.02–0.03) sampled in Kandal province in 2016.

### 3. Discussion

JEV is known to be circulating in pigs in almost all Southeast Asian countries [22]. Ducks have been shown to be exposed to JEV (JEV nAb detection) in Cambodia and India, and chickens in Cambodia and Singapore [14,23,24]. Finally, JEV nAb have been detected in dogs in Singapore and Japan [8,24]. Our survey, conducted in 112 pigs, 128 ducks, 220 chickens and 188 dogs from five districts of Kandal province, Cambodia, confirms that Japanese encephalitis circulates in this province and that the four tested species are exposed to JEV to different extents. The observed JEV seroprevalence was similar for dogs (35%) and pigs (31%), whereas the multivariate analysis showed that the seropositivity risk was higher for ducks and pigs. For all four species, the seropositivity risk increased with age.

Overall, the seroprevalence calculated from our samples was lower than that reported in other studies, especially for chickens. This is probably due to the age of the sampled animals; with the exception of dogs, most of the animals we sampled were very young, so the possible exposure period was short. Depending on the studied region (Nepal, Bali, Vietnam and Cambodia), flavivirus seroprevalence ranged from 32% to 65% in pigs, from 24% to 37% in chickens, and from 31% to 40% in ducks [14,19,25–27]. In a former JEV seroprevalence study on poultry in Kandal province in 2016 [14], a statistical model of seroprevalence by age predicted a seroprevalence of 5–15% in 3-month-old chickens. We observed a lower flavivirus seroprevalence in chickens with a median age of 3 months (1%, 95% CI: 0.5–4.6%). In the same study, the seroprevalence in 3-month-old ducks was predicted to be 15–35%, which is consistent with the flavivirus seroprevalence we found in ducks (12%, 95% CI: 9.2–22.2%).

The JEV seroprevalence we determined using FRNT could not be directly compared with the above-mentioned cross-sectional studies, as the serological analysis methods differed. In India, authors using microtiter virus neutralization test all the HIA-positive samples and reported a JEV seroprevalence in ducks of 19.1% [23]. A study led in Singapore (using a more stringent interpretation threshold FRNT<sub>80</sub>) showed high seroprevalence levels with 60% of the sampled chickens (n = 20) and 39.6% of the sampled dogs revealing JEV nAb [24].

As expected, pigs had the highest monthly probability of acquiring JEV infection (JEV FOI = 0.09 per month). Interestingly, ducks followed with a JEV FOI of 0.03 per month, then dogs (JEV FOI of

0.01 per month). Chickens were the least likely to be infected, with an estimated JEV FOI of 0.003 per month. Regarding the monthly probability of acquiring flavivirus infection, comparing the flavivirus FOI values of our study (2018) with the ones estimated from the survey led in Kandal in 2016 [14] revealed similar probability of flavivirus infection per month in ducks (0.05 per month in 2016 (95% CI: 0.04–0.07), 0.04 per months in 2018 (95% CI: 0.03–0.06)). This latter result supports the fact that, for ducks, there is little seasonality and little inter-annual variation of the intensity of JE transmission in this province. The FOI for flaviviruses in chickens was higher in 2016 than in 2018 (0.03 per month in 2016 (95% CI: 0.02–0.03), 0.007 per month in 2018 (95% CI: 0.003–0.01)), a difference for which we could not find any plausible explanation given the available data.

The JEV FOI exerted on an individual is related to its exposure to the bites of a competent vector. It depends on the trophic preference of the vector, and on a combination of both host attractiveness and host body surface area (BSA). Reports on host feeding patterns of JEV vectors showed that *Culex* species are often opportunistic. In China and Senegal, *Cx. tritaeniorhynchus*, a major vector of JEV, was shown to feed on multiple hosts, such as swine, poultry, dog, cattle and human, in different proportions [28,29]. In India, some studies confirmed that host availability plays an important role in the feeding behavior of *Cx. tritaeniorhynchus* [30,31]. Concerning FOI per host BSA unit, the ratio we calculated between pigs and ducks was less than one, suggesting that, for a given BSA, ducks were more likely to get infected than pigs. Since ducks develop viremia high enough to infect back mosquitoes [13,32], further studies should be implemented to better understand their role in JEV epidemiological cycle and decipher the relative contribution of pigs and ducks in JEV circulation. Oppositely, the ratios of FOI per BSA unit for chickens and dogs in relation to pigs were greater than 1, suggesting that pigs are more exposed than chickens and dogs for a given BSA. Under experimental conditions, infected chickens seem to develop a lower viremia than ducks, suggesting that they would be a less efficient reservoir for JEV transmission [13]. However, density estimates of the different species in the study area of Kandal suggest that there are about ten times more chickens than ducks (unpublished data, field observation: about 10,000 chickens and 900 ducks in an average village of Kandal province). In addition, chickens are slaughtered when they are around 6 months old, unlike ducks, which are reared for meat until they are over 2 years old. Thus, the abundance and high population renewal (hence frequent introduction of naïve hosts) of chickens could compensate for the lower FOI and make them an important link in the JEV epidemiological cycle.

Our study confirms the central role of pigs for maintaining JEV transmission. In countries where pigs are housed far away from human housing, or in countries with little to no pig farming, the use of pigs as sentinels for JEV circulation may be limited. Therefore, other domestic animals that are housed in close proximity to humans should be investigated as a suitable sentinel. Previous studies showed that dogs could be good sentinels for West Nile virus [33,34], Lyme disease [35] and other arthropod-borne diseases [36]. In addition, exposure of dogs to JEV has already been observed in Singapore and Japan [8,24]. The present study is the first evidence of exposure of dogs to JEV in Cambodia. Experimental JEV infections in dogs showed that they developed a long-lasting immunity but no clinical signs and a low viremia [9]. In addition, it is much easier to obtain samples from dogs than from pigs or poultry, as owners are much less reluctant to participate in studies because dogs have a lower economic value. In Cambodia, dogs are numerous with an estimated dog/human ratio as high as 1:3 in some areas (V. Chevalier, personal communication) and live in close proximity to humans even when they are free roaming. Dogs could therefore be a good proxy for human exposure to JEV. Even though JE is known to be endemic and widespread in Cambodia, the spatial and temporal distribution of the disease is not well known, as studies are focused on the capital, Phnom Penh, and neighboring Kandal province. Therefore, using dogs as sentinels would help investigating the high circulation level of the virus and identifying the main risk areas. This highlights the need to invest more in JEV surveillance, research and vaccination in Cambodia. Sentinel dogs may also be a relevant choice for establishing surveillance in a country where JEV circulation follows an epidemic pattern, or even serve as an early warning system for JEV introduction in a country free of the disease.

As others have done before [12,37], we challenge the dogma that limits the JEV transmission cycle to the involvement of pigs, vectors and wild birds. Our study demonstrates the circulation of JEV in a broader, multi-host system involving several domestic animal species. Haydon et al. (2002) defined a reservoir as one or more epidemiologically connected populations or environments in which the pathogen can be permanently maintained and from which infection is transmitted to a defined target population [15]. In our case, host diversity may explain why JEV circulates intensively even in an ecosystem where the density of its main host, pigs, is relatively low. The maintenance of JE could be facilitated not by a single reservoir species but by a maintenance community composed of pigs, ducks, chickens and vectors. Roberts and Heesterbeek (2020) pointed out that the reservoir capability of a (group of) species may be subject to changes in the ecosystem [16]. Depending on environmental conditions, a given species may be more or less involved in the epidemiological cycle. Our next step will be to develop a mathematical model of JEV circulation in Kandal province to decipher and quantify the respective roles of the different host species in JEV transmission. Additional, transmission studies should investigate the vector competence of local *Culex* species and the potential involvement of poultry and dogs in the JEV transmission cycle. This may help to better understand the dynamics of JEV circulation in the maintenance community, under various contexts, which is necessary to better monitor, estimate the risk of infection in humans, and thus reduce the impact of JE on human health, especially in children.

#### 4. Materials and Methods

##### 4.1. Study Area

Kandal is a large province (3179 km<sup>2</sup>), encompassing 11 districts and surrounding Phnom Penh, the capital of Cambodia. The province consists of a typical plain wet area, dominated by cultivated fields and a mosaic of rural and peri-urban areas. The climate is warm and humid, with monsoon season between May and October. In this area, pigs and poultry are raised either in backyards (traditional farming system where animals are raised often in low densities within the confines of the family home) or in farms (so-called modern breeding system in specific installations).

The region is characterized by a low pig density. Even though pig farming in Cambodia is undergoing profound changes due to the arrival of industrial farming, driving meat price down, traditional pig raising in backyards still predominates. Pig production is concentrated in the provinces around Phnom Penh, including Kandal. In 2004, FAO estimated a pig density in Kandal province of about 50 animals per square km [38,39]. As a comparison, the density of pigs reared in Bretagne region, France, is more than 250 per square km [40]. The districts and villages were selected according to their accessibility (breeder's willingness and access to farms and backyards).

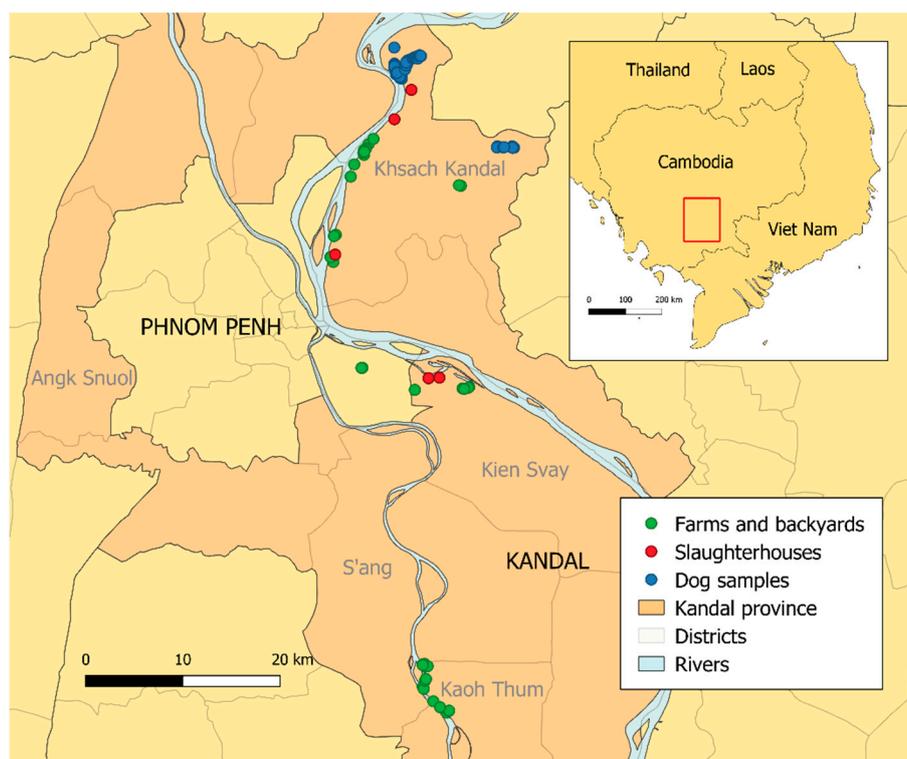
##### 4.2. Dog Samples

Dog sera were acquired during the research project "Man's best friend: A cross border transdisciplinary One Health approach to rabies control in dogs in Southeast Asia" that started in March 2018. A systematic and comprehensive door-to-door visit was conducted in 10 villages of Khsach Kandal district in Kandal province. Each encountered dog was individually identified and data related to the age, sex, mode of confinement, and relations with the family were recorded. Each dog was vaccinated against rabies. Among 2200 recorded dogs, 800 were blood sampled. Overall, 188 samples were included based on a sufficient serum volume for rabies and JEV serology.

##### 4.3. Samples of Domestic Pigs, Chickens, and Ducks

Between October and December 2018, 122 pigs, 228 chickens and 128 ducks from farms, backyards, and slaughterhouses of 21 villages of Kandal province were sampled (Figure 1). Farms and backyards were recruited based on the willingness of owners. Sampled animals were randomly selected among those over one month of age for poultry, and over two months of age for pigs, to avoid interfering

with maternal immunity [20,41]. Since our objective was to study the forces of infection and since we know that seroprevalence is high in pigs and increases with age, we focused on backyard and farm pigs, which are slaughtered before the age of 6 to 7 months. All the animals sampled were selected to maximize age diversity for estimation of the forces of infection. Sera were collected in 35 backyards, seven farms (3 farms for pigs, 2 for ducks and 2 for chickens) and five slaughterhouses (4 for pigs and 1 for chickens), located in the district where the dogs had been sampled (Khsach Kandal) and in two neighboring districts (Kean Svay and Koh Thum). One hundred animals (pigs and chickens) had to be sampled from the slaughterhouse, as breeders were sometimes reluctant to give access to their animals since these ones are often their only source of income. However, these animals had just been delivered (usually the same morning), and the ages and districts of origin were precisely known by the slaughterhouse managers. They originated from the districts of the slaughterhouse, although some of the chickens came from three neighboring districts of Kandal province (Angk Snuol and S'ang,  $n = 35$ ) (Figure 1).



**Figure 1.** Locations of the sampling sites.

The age of each sampled animal was recorded, based on farmer's declarations or slaughterhouse staff. Pigs ranged in age from 2 to 6 months, chickens from 1 to 24 months and ducks from 1 to 15 months. Blood samples were taken from the jugular vein in pigs and the ulnar or metatarsal vein in poultry. Specimens were collected on dry blood tubes and kept at 4 °C after sampling, and transported to the Institut Pasteur du Cambodge (IPC), where the serum was separated immediately by centrifugation and was frozen at −80 °C until further analysis.

#### 4.4. Ethic Statement

All samples used in this study were collected following the World Animal Health Organization (OIE) guiding principles on animal welfare included in the OIE Terrestrial Animal Health Code [42]. All sampling campaigns were implemented under the supervision of the Cambodian General Direction of Animal Production and Health (GDAPH), and local veterinary services.

#### 4.5. Laboratory analysis

All samples were analyzed by the Virology unit of the IPC. They were first tested by hemagglutination inhibition assay (HIA). Positive samples were subsequently tested for neutralizing antibodies (nAb) against JEV and dengue virus serotype 3 (DENV-3) by foci reduction neutralization test (FRNT) if a sufficient volume of sera remained. The strategy to test for both JEV and DENV was chosen because DENV is known to be widespread in the region [43,44] and to induce cross-reactions with anti-JEV antibodies [45].

##### 4.5.1. Cells and Viruses

Simian Vero cells (ATCC CCL-81) were used for the detection of neutralizing antibodies via FRNT. These were cultivated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM; Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, Gaithersburg, MD, USA) and 100 U/mL penicillin-streptomycin (Gibco) at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> atmosphere. All viruses were grown in C6/36 *Aedes albopictus* cells. These mosquito cells were cultivated in Leibovitz-15 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FBS, 1% L-glutamine (Gibco), 10% tryptose-phosphate (Gibco) and 100 U/mL penicillin-streptomycin at 28 °C. JEV strain Nakayama (Genbank EF571853) and Dengue 3 (DENV-3) strain H87 (Genbank M93130) were used for HIA and FRNT.

##### 4.5.2. Hemagglutination Inhibition Assay (HIA)

The presence of antibodies in the serum samples was analyzed with HIA using antigen originated from the above-mentioned JEV and DENV-3 strains. The assay followed the protocol previously described [46] adapted to 96 well microtiter plates.

##### 4.5.3. Foci Reduction Neutralization Test (FRNT)

The FRNT determined the level of neutralizing antibodies and was performed as described previously [47], modified by using Vero cells. The titer of neutralizing antibodies (nAb) was expressed as the reciprocal serum dilution that induces 50% reduction of infection visualized as foci (FRNT<sub>50</sub>) compared to the controls (flavivirus-negative serum and virus control) and was calculated via log probit regression analysis (SPSS for Windows, Version 16.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). FRNT<sub>50</sub> titers below 10 were considered negative. FRNT results were classified in four outcomes depending on the neutralizing antibody titer against JEV and DENV: (i) "JEV positive" if only JEV nAb were detected or if JEV nAb titer was four times higher than DENV nAb titer; (ii) "DENV positive" if only DENV nAb were detected or if DENV nAb titer was four times higher than JEV nAb titer; (iii) "JEV and DENV double-positive" if both JEV and DENV nAb were detected with similar nAb titers (less than a factor 4 difference); (iv) "Negative" when no nAb were detected. In the latter case, the conclusion was "Flavivirus positive", as the samples were all HIA positive.

#### 4.6. Statistical Analysis

Samples that could not be tested in FRNT after a positive HIA result (due to an insufficient volume of serum) and those for which the age of the animal was not available were discarded from the analysis.

We used logistic mixed models to analyze the relationship between the seropositivity risk and two variables: the species (pig, duck, chicken or dog) and the age (in months). The effect of possible geographic variations of seropositivity risk was controlled by adding the district of origin as a random effect (to allow model convergence, samples from districts where no positive animal had been observed were excluded from the datasets used). Two logistic mixed models were fitted: one for HIA results and the other for FRNT results. We considered that the animal was seropositive to JEV when the result of the FRNT test was "JEV positive" or "JEV and DENV double-positive", since both cases indicate a previous JEV infection in the sampled animal.

The force of infection (FOI) is the instantaneous probability of a susceptible host to become infected. Because of the relatively small surface of the survey area, and low seasonality of JEV circulation in Kandal province, the FOI was assumed constant [20,21]. Under this assumption, the force of infection for flaviviruses (based on HIA results) and JEV (based on FRNT results) can be estimated by maximizing the joint likelihood of age-specific seroprevalence data. The probability for an animal to be seronegative (1) or seropositive (2) was respectively expressed as:

$$P(neg) = e^{-\lambda\alpha} \quad (1)$$

$$P(pos) = 1 - e^{-\lambda\alpha} \quad (2)$$

With  $\alpha$  the age in months, and  $\lambda$  the FOI by month.

The joint likelihood of the observed data (i.e., the product of the above probabilities on all animals included in the study) was then maximized to obtain the estimate of the FOI. This model was successively fitted for each of the four studied species. The variance-covariance matrix, obtained by inverting the Hessian matrix, allowed for computing the confidence intervals. All analyses were done with R software version 3.6.0 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) [48].

Using the same methodology, we estimated FOI for flaviviruses using a serological dataset of a poultry survey implemented in the same province in March 2016 [14] (File S1).

#### 4.7. Force of Infection per Unit of Body Surface Calculation

The JEV FOI exerted on an animal of a given host species is related to its exposure to the bites of a competent vector. This exposure depends on a combination of both host body surface area (BSA) and attractiveness and on the trophic preference of the vector. A rough estimate of the FOI per unit of host body surface area (BSA) can be computed using the allometric relationship between mass (M) and BSA:  $BSA \sim M^{2/3}$  (where  $\sim$  denotes the proportionality relationship) [49]. This formula was used to calculate the FOI ratio per unit of BSA between each pair of species.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2076-0817/9/9/719/s1>, Table S1: Flavivirus and JEV forces of infection (FOI) by species, in Khsach Kandal district only; File S1: Estimation of the flavivirus forces of infection per month in chickens and ducks sampled in Kandal province in 2016.

**Author Contributions:** Conceptualization, H.L., P.D., B.D. and V.C.; Data curation, H.L., S.T., S.K., L.H., S.I., S.L. (Sokchea Lay), C.T., S.L. (Sowath Ly) and V.D.; Formal analysis, H.L. and H.A.; Funding acquisition, H.L., P.D., B.D. and V.C.; Investigation, H.L. and H.A.; Methodology, H.L., B.D. and V.C.; Project administration, B.D. and V.C.; Supervision, B.D. and V.C.; Writing—original draft, H.L.; Writing—review & editing, H.A., P.D., B.D. and V.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by the French Ministry of Agriculture, the International Center of Research in Agriculture for Development (CIRAD), Institut Pasteur du Cambodge, the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES) and the Swedish Research Council.

**Acknowledgments:** The authors thank all farmers who participated in the study and allowed the sampling of their animals.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Campbell, G.L.; Hills, S.L.; Fischer, M.; Jacobson, J.A.; Hoke, C.H.; Hombach, J.M.; Marfin, A.A.; Solomon, T.; Tsai, T.F.; Tsu, V.D.; et al. Estimated global incidence of Japanese encephalitis: A systematic review. *Bull. World Health Organ* **2011**, *89*, 766–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Erlanger, T.E.; Weiss, S.; Keiser, J.; Utzinger, J.; Wiedenmayer, K. Past, present, and future of Japanese encephalitis. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1–7. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

3. Tarantola, A.; Goutard, F.; Newton, P.; de Lamballerie, X.; Lortholary, O.; Cappelle, J.; Buchy, P. Estimating the Burden of Japanese Encephalitis Virus and Other Encephalitides in Countries of the Mekong Region. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2533. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Fischer, M.; Hills, S.; Staples, E.; Johnson, B.; Yaich, M.; Solomon, T. Japanese Encephalitis Prevention and Control: Advances, Challenges, and New Initiatives. *Emerg. Infect.* **2008**, *8*, 93–124. [[CrossRef](#)]
5. de Wispelaere, M.; Desprès, P.; Choumet, V. European *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* Are Competent Vectors for Japanese Encephalitis Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lord, J.S.; Al-Amin, H.M.; Chakma, S.; Alam, M.S.; Gurley, E.S.; Pulliam, J.R.C. Sampling Design Influences the Observed Dominance of *Culex tritaeniorhynchus*: Considerations for Future Studies of Japanese Encephalitis Virus Transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004249. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Scherer, W.F.; Buescher, E.L.; McClure, H.E. Ecologic Studies of Japanese Encephalitis Virus in Japan. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1959**, *8*, 689–697. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Shimoda, H.; Ohno, Y.; Mochizuki, M.; Iwata, H.; Okuda, M.; Maeda, K. Dogs as Sentinels for Human Infection with Japanese Encephalitis Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2010**, *16*, 1137–1139. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Shimoda, H.; Tamaru, S.; Morimoto, M.; Hayashi, T.; Shimojima, M.; Maeda, K. Experimental infection of Japanese encephalitis virus in dogs. *J. Vet. Med. Sci.* **2011**, *73*, 1241–1242. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Ladreyt, H.; Durand, B.; Dussart, P.; Chevalier, V. How Central Is the Domestic Pig in the Epidemiological Cycle of Japanese Encephalitis Virus? A Review of Scientific Evidence and Implications for Disease Control. *Viruses* **2019**, *11*, 949. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Yap, G.; Lim, X.F.; Chan, S.; How, C.B.; Humaidi, M.; Yeo, G.; Mailepessov, D.; Kong, M.; Lai, Y.L.; Okumura, C.; et al. Serological evidence of continued Japanese encephalitis virus transmission in Singapore nearly three decades after end of pig farming. *Parasites Vectors* **2019**, *12*, 244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Bae, W.; Kim, J.H.; Kim, J.; Lee, J.; Hwang, E.S. Changes of epidemiological characteristics of Japanese encephalitis viral infection and birds as a potential viral transmitter in Korea. *J. Korean Med. Sci.* **2018**, *33*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Cleton, N.B.; Bosco-Lauth, A.; Page, M.J.; Bowen, R.A. Age-Related Susceptibility to Japanese Encephalitis Virus in Domestic Ducklings and Chicks. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2014**, *90*, 242–246. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Auerswald, H.; Ruget, A.S.; Ladreyt, H.; In, S.; Mao, S.; Sorn, S.; Tum, S.; Duong, V.; Dussart, P.; Cappelle, J.; et al. Serological evidence for Japanese encephalitis and West Nile virus infections in domestic birds in Cambodia. *Front. Vet. Sci.* **2020**, *7*, 9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Haydon, D.T.; Cleaveland, S.; Taylor, L.H.; Laurenson, M.K. Identifying reservoirs of infection: A conceptual and practical challenge. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 1468–1473. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Roberts, M.G.; Heesterbeek, J.A.P. Characterizing reservoirs of infection and the maintenance of pathogens in ecosystems. *J. R. Soc. Interface* **2020**, *17*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Touch, S.; Hills, S.; Sokhal, B.; Samnang, C.; Sovann, L.; Khieu, V.; Soeung, S.C.; Toda, K.; Robinson, J.; Grundy, J. Epidemiology and burden of disease from Japanese encephalitis in Cambodia: Results from two years of sentinel surveillance. *Trop. Med. Int. Health* **2009**, *14*, 1365–1373. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Horwood, P.F.; Duong, V.; Laurent, D.; Mey, C.; Sothy, H.; Santy, K.; Richner, B.; Heng, S.; Hem, S.; Cheval, J.; et al. Aetiology of acute meningoencephalitis in Cambodian children, 2010–2013. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e35. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Duong, V.; Sorn, S.; Holl, D.; Rani, M.; Deubel, V.; Buchy, P. Evidence of Japanese encephalitis virus infections in swine populations in 8 provinces of Cambodia: Implications for national Japanese encephalitis vaccination policy. *Acta Trop.* **2011**, *120*, 146–150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Cappelle, J.; Duong, V.; Pring, L.; Kong, L.; Yakovleff, M.; Prasetyo, D.B.; Peng, B.; Choeung, R.; Duboz, R.; Ong, S.; et al. Intensive Circulation of Japanese Encephalitis Virus in Peri-urban Sentinel Pigs near Phnom Penh, Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Di Francesco, J.; Choeung, R.; Peng, B.; Pring, L.; Pang, S.; Duboz, R.; Ong, S.; Sorn, S.; Tarantola, A.; Fontenille, D.; et al. Comparison of the dynamics of Japanese encephalitis virus circulation in sentinel pigs between a rural and a peri-urban setting in Cambodia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Mackenzie, J.S.; Williams, D.T.; Smith, D.W. Japanese Encephalitis Virus: The Geographic Distribution, Incidence, and Spread of a Virus with a Propensity to Emerge in New Areas. *Perspect. Med. Virol.* **2006**, *16*, 201–268.

23. Kalaiyarasu, S.; Mishra, N.; Khetan, R.K.; Singh, V.P. Serological evidence of widespread West Nile virus and Japanese encephalitis virus infection in native domestic ducks (*Anas platyrhynchos* var *domesticus*) in Kuttanad region, Kerala, India. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *48*, 61–68. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Ting, S.H.L.; Tan, H.C.; Wong, W.K.; Ng, M.L.; Chan, S.H.; Ooi, E.E. Seroepidemiology of neutralizing antibodies to Japanese encephalitis virus in Singapore: Continued transmission despite abolishment of pig farming? *Acta Trop.* **2004**, *92*, 187–191. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Adi, A.A.A.M.; Astawa, N.; Ayu Asri Damayanti, P.; Made Kardena, I.; Gusti Made Krisna Erawan, I.; Suardana, I.W.; Putra, I.A.; Matsumoto, Y. Seroepidemiological Evidence for the Presence of Japanese Encephalitis Virus Infection in Ducks, Chickens, and Pigs, Bali-Indonesia. *Bali Med. J.* **2016**, *5*, 189. [[CrossRef](#)]
26. Pant, G.R. A serological survey of pigs, horses, and ducks in Nepal for evidence of infection with Japanese encephalitis virus. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2006**, *1081*, 124–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ruget, A.-S.; Beck, C.; Gabassi, A.; Trevennec, K.; Lecollinet, S.; Chevalier, V.; Cappelle, J. Japanese encephalitis circulation pattern in swine of northern Vietnam and consequences for swine's vaccination recommendations. *Transbound. Emerg. Dis.* **2018**, *65*, 1485–1492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Guo, X.-X.; Li, C.-X.; Wang, G.; Zheng, Z.; Dong, Y.-D.; Zhang, Y.-M.; Xing, D.; Zhao, T.-Y. Host feeding patterns of mosquitoes in a rural malaria-endemic region in hainan island, china. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2014**, *30*, 309–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Fall, A.G.; Diaité, A.; Lancelot, R.; Tran, A.; Soti, V.; Etter, E.; Konaté, L.; Faye, O.; Bouyer, J. Feeding behaviour of potential vectors of West Nile virus in Senegal. *Parasit Vectors* **2011**, *4*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Philip Samuel, P.; Arunachalam, N.; Hiriyan, J.; Tyagi, B.K. Host feeding pattern of Japanese encephalitis virus vector mosquitoes (Diptera: Culicidae) from Kuttanadu, Kerala, India. *J. Med. Entomol.* **2008**, *45*, 927–932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Reuben, R.; Thenmozhi, V.; Samuel, P.P.; Gajanana, A.; Mani, T.R. Mosquito blood feeding patterns as a factor in the epidemiology of Japanese encephalitis in southern India. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1992**, *46*, 654–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Karna, A.K.; Bowen, R.A. Experimental Evaluation of the Role of Ecologically-Relevant Hosts and Vectors in Japanese Encephalitis Virus Genotype Displacement. *Viruses* **2019**, *11*, 32. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rocheleau, J.P.; Michel, P.; Lindsay, L.R.; Drebot, M.; Dibernardo, A.; Ogden, N.H.; Fortin, A.; Arsenault, J. Characterizing environmental risk factors for West Nile virus in Quebec, Canada, using clinical data in humans and serology in pet dogs. *Epidemiol. Infect.* **2017**, *145*, 2797–2807. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Durand, B.; Haskouri, H.; Lowenski, S.; Vachieri, N.; Beck, C.; Lecollinet, S. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: Dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiol. Infect.* **2016**, *144*, 1857–1864. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Goossens, H.A.; van den Bogaard, A.E.; Nohlmans, M.K. Dogs as sentinels for human Lyme borreliosis in The Netherlands. *J. Clin. Microbiol.* **2001**, *39*, 844–848. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Henn, J.B.; Gabriel, M.W.; Kasten, R.W.; Brown, R.N.; Theis, J.H.; Foley, J.E.; Chomel, B.B. Gray foxes (*Urocyon cinereoargenteus*) as a potential reservoir of a Bartonella clarridgeiae-like bacterium and domestic dogs as part of a sentinel system for surveillance of zoonotic arthropod-borne pathogens in northern California. *J. Clin. Microbiol.* **2007**, *45*, 2411–2418. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Lord, J.S.; Gurley, E.S.; Pulliam, J.R.C. Rethinking Japanese Encephalitis Virus Transmission: A Framework for Implicating Host and Vector Species. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004074. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Huynh, T.T.T.; Aarnink, A.J.A.; Drucker, A.; Verstegen, M.W.A. Pig Production in Cambodia, Laos, Philippines, and Vietnam: A Review. *Asian J. Agric. Dev.* **2006**, *3*, 69–90. [[CrossRef](#)]
39. FAO (2004) Review of the livestock Sector in the Mekong Countries. Available online: [http://www.fao.org/docs/eims/upload/153492/lsr\\_mekong.pdf](http://www.fao.org/docs/eims/upload/153492/lsr_mekong.pdf) (accessed on 1 September 2020).
40. Draaf Bretagne (2013) L'élevage en Bretagne, hier, aujourd'hui ... et demain? Available online: [http://draaf.bretagne.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/L\\_elevage\\_en\\_Bretagne\\_cle49c7b6.pdf](http://draaf.bretagne.agriculture.gouv.fr/IMG/pdf/L_elevage_en_Bretagne_cle49c7b6.pdf) (accessed on 1 September 2020).
41. Nemeth, N.M.; Bowen, R.A. Dynamics of passive immunity to West Nile virus in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *76*, 310–317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. OIE. Use of Animals in Research and Education. In *OIE Terrestrial Animal Health Code*; OIR: Paris, France, 2018. Available online: [http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre\\_aw\\_research\\_education.htm](http://www.oie.int/index.php?id=169&L=0&htmfile=chapitre_aw_research_education.htm) (accessed on 1 September 2020).

43. Fox-Lewis, A.; Hopkins, J.; Sar, P.; Sao, S.; Pheaktra, N.; Day, N.P.J.; Blacksell, S.D.; Turner, P. Seroprevalence of Dengue Virus and Rickettsial Infections in Cambodian Children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 635–638. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Ly, S.; Fortas, C.; Duong, V.; Benmarhnia, T.; Sakuntabhai, A.; Paul, R.; Huy, R.; Sorn, S.; Nguon, K.; Chan, S.; et al. Asymptomatic Dengue Virus Infections, Cambodia, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1354–1362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Maeki, T.; Tajima, S.; Ikeda, M.; Kato, F.; Taniguchi, S.; Nakayama, E.; Takasaki, T.; Lim, C.-K.; Saijo, M. Analysis of cross-reactivity between flaviviruses with sera of patients with Japanese encephalitis showed the importance of neutralization tests for the diagnosis of Japanese encephalitis. *J. Infect. Chemother.* **2019**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Clarke, D.H.; Casals, J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1958**, *7*, 561–573. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Auerswald, H.; de Jesus, A.; Seixas, G.; Nazareth, T.; In, S.; Mao, S.; Duong, V.; Silva, A.C.; Paul, R.; Dussart, P.; et al. First dengue virus seroprevalence study on Madeira Island after the 2012 outbreak indicates unreported dengue circulation. *Parasit Vectors* **2019**, *12*, 103. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing: Vienna, Austria, 2005; ISBN 3-900051-07-0. Available online: <http://www.R-project.org>. (accessed on 1 September 2020).
49. Lindstedt, S.L. *Allometry: Body Size Constraints in Animal Design*; National Academies Press (US): Washington, DC, USA, 1987.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).





**Titre :** Modélisation de l'encéphalite japonaise au Cambodge et prédiction des conséquences de son introduction à l'île de La Réunion

Malgré l'existence d'un vaccin, le virus de l'encéphalite japonaise (VEJ) reste la principale cause d'encéphalite humaine en Asie avec un taux de létalité pouvant atteindre 30%. Le cycle épidémiologique traditionnellement décrit de cette zoonose à transmission vectorielle est remis en question avec des preuves croissantes de l'implication de systèmes multi-hôtes plus complexes, dans les régions où les densités de porcs (principaux hôtes amplificateurs) ou d'Ardeidés (réservoir généralement décrit) sont faibles. Les porcs jouent un rôle central dans la transmission du VEJ mais des réservoirs secondaires comme les volailles pourraient exister et participer à la circulation du virus. Au Cambodge, le VEJ pourrait se maintenir dans un système multi-hôtes comprenant des porcs et des volailles comme hôtes compétents, mais aussi des chiens, des bovins et des humains comme hôtes non compétents. Nous avons développé un modèle dynamique de la transmission du VEJ dans un village traditionnel de la province de Kandal au Cambodge. Ce modèle a été calibré avec des données démographiques et sérologiques issues d'une enquête que nous avons réalisée en 2018 sur des porcs, des poulets et des canards, ainsi que des chiens dont les sérums avaient été prélevés lors d'une enquête précédente. Le modèle a permis d'analyser les variations du nombre de reproduction de base ( $R_0$ ), du taux d'incidence annuel des infections humaines et de l'impact clinique associé chez l'homme en fonction de la composition du système multi-hôtes. Dans le village modélisé, la circulation endémique du VEJ pourrait être assurée par un système multi-hôtes complexe où les porcs domestiques sont essentiels à la persistance mais où les volailles pourraient agir comme réservoir secondaire. D'après les simulations, l'augmentation de la proportion d'hôtes compétents induisait une concentration des infections chez les enfants. Enfin, selon les prédictions du modèle, la probabilité annuelle d'exposition humaine était linéairement corrélée à la séroprévalence anti-VEJ canine, suggérant que dans notre zone d'étude, la séroprévalence anti-VEJ canine pourrait être un bon proxy de la probabilité annuelle d'exposition des hommes au VEJ. Les nombreux échanges commerciaux et humains dans l'Océan Indien font craindre une introduction du VEJ à l'île de La Réunion, où les vecteurs potentiels et les hôtes (compétents et non compétents) du VEJ sont présents et pourraient constituer un système multi-hôtes permettant la circulation du virus s'il venait à y être introduit. Nous avons adapté le modèle précédemment développé au contexte réunionnais afin d'analyser le risque de circulation du VEJ à La Réunion en cas d'introduction, en calculant des  $R_0$  autour des zones identifiées comme les plus à risque d'émergence : les élevages de porcs et leurs alentours. Le VEJ pourrait circuler au moins autour de certains élevages de porcs, et le risque d'introduction couplé au risque de circulation du VEJ le cas échéant, pose le problème d'une surveillance de l'EJ à La Réunion.

**Title:** Modelling Japanese encephalitis in Cambodia and predicting the consequences of its introduction to La Reunion Island.

Despite the existence of a vaccine, Japanese encephalitis virus (JEV) remains the leading cause of human encephalitis in Asia with a case fatality rate of up to 30%. The traditionally described epidemiological cycle of this vector-borne zoonosis is being challenged with increasing evidence of the involvement of more complex multi-host systems, in areas with low densities of pigs (the main amplifying host) or Ardeids (the commonly described reservoir). Pigs are central in JEV transmission, but secondary reservoirs such as poultry could exist and participate in virus circulation. In Cambodia, JEV could therefore be maintained in a multi-host system including pigs and poultry as competent hosts, but also dogs, cattle and humans as non-competent hosts (not able to infect back mosquitoes). We developed a dynamic model of JEV transmission in a traditional village in Kandal province, Cambodia. This model was calibrated with demographic and serological data from a survey we conducted in 2018 in pigs, chickens, and ducks, as well as dogs whose sera were collected during a previous survey. The model was used to analyze variations in the basic reproduction number ( $R_0$ ), the annual incidence rate of human infections, and associated clinical impact in humans as a function of the composition of the multi-host system. In the modeled village, endemic JEV circulation could be supported by a complex multi-host system where domestic pigs are essential for persistence but poultry could act as a secondary reservoir. Simulations indicated that increasing the proportion of competent hosts induced a concentration of infections in children. Finally, the model predicted that the annual probability of human exposure was linearly correlated with canine JEV seroprevalence, suggesting that in our study area, canine JEV seroprevalence may be a good proxy for the annual probability of human exposure to JEV. The extensive trade and human exchanges in the Indian Ocean raise concerns about the introduction of JEV to La Reunion Island, where potential vectors and hosts (competent and non-competent) of JEV are present and could constitute a multi-host system allowing the circulation of the virus should it be introduced. We adapted the previously developed model to the Reunion context in order to analyze the risk of circulation of JEV in case of introduction, by calculating  $R_0$  around the areas identified as the most at risk of emergence: pig farms and their surroundings. JEV could circulate at least around some pig farms, and the risk of introduction combined with the risk of JEV circulation, raise the question of JE surveillance in La Reunion.