



HAL
open science

Le risque arboviral au Burkina Faso : caractérisation et surveillance

Bachirou Tinto

► **To cite this version:**

Bachirou Tinto. Le risque arboviral au Burkina Faso : caractérisation et surveillance. Médecine humaine et pathologie. Université de Montpellier, 2022. Français. NNT : 2022UMONT045 . tel-04086681

HAL Id: tel-04086681

<https://theses.hal.science/tel-04086681>

Submitted on 2 May 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 POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie Santé

École doctorale n° 168 Sciences Chimiques et Biologiques pour la Santé (CBS2)

Unité de recherche Pathogénèse et Contrôle des Infections Chroniques et Emergentes (PCCEI)

Le risque arboviral au Burkina Faso : Caractérisation et surveillance

Présentée par Bachirou TINTO

Le 15 décembre 2022

Sous la direction de Sara SALINAS
et de Yannick SIMONIN

Devant le jury composé de

Dorothee MISSÉ, DR, IRD

Nicolas LEVÊQUE, PU-PH, CHU de Poitiers

Stéphan ZIENTARA, DR, Inspecteur général de santé publique vétérinaire

Sylvie PILLET, MCU-PH, CHU de Saint-Etienne

Sara SALINAS, Chargée de recherche, INSERM U1058

Yannick SIMONIN, Maître de conférences, INSERM U1058/Université de Montpellier

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Directrice de thèse

Co-Directeur de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

Puisse mon travail contribuer à améliorer la surveillance et la lutte contre les arboviroses au Burkina Faso.

Remerciements

Je voudrais remercier tous les membres du jury qui ont accepté d'évaluer et juger mon travail malgré leurs multiples occupations. Je remercie le Professeur Nicola Levêque et le Dr Stéphan Zientara pour avoir accepté d'être rapporteurs, le Dr Dorothée Missé et le Dr Sylvie Pillet d'avoir accepté être examinatrices de ce travail. Je remercie également le Dr Ahidjo Ayouba et le Dr Laurence Briant-Longuet pour avoir accepté d'être dans mon comité de suivi de thèse. Merci pour vos conseils et vos encouragements pendant ces trois années de travail.

Je voudrais remercier mes directeurs de thèse Sara et Yannick pour avoir accepté m'accueillir dans votre unité de recherche. Vos qualités humaines, votre simplicité, alliées à votre rigueur scientifique, forcent l'admiration. Je voudrais vraiment vous témoigner ici toute ma reconnaissance pour tout ce que vous avez fait pour moi durant ces années de thèse. Trouvez ici, l'expression de ma profonde gratitude.

Merci à Thérèse et à Dramane ainsi qu'à la Direction du Centre Muraz et de l'INSP pour votre engagement, votre soutien et votre accompagnement dans la réalisation de ce travail. Merci à tout le personnel du Centre MURAZ, particulièrement à Souleymane à qui je souhaite beaucoup de courage pour la suite de sa thèse.

Merci à John, « le couteau suisse » comme on t'a surnommé et à Oriane pour votre accompagnement, votre patience, votre disponibilité et votre gentillesse. Merci pour votre aide inestimable pour les nombreuses séroneutralisations, les titrages et autres. Je vous ai beaucoup embêté souvent pour peu. Ce travail est aussi le vôtre. Je n'oublie pas Marion avec qui j'ai fait mes premiers titrages. Oriane, je te souhaite bon vent pour ton post doc et on se donne rendez-vous prochainement pour le cours sur les arbovirus.

Merci à Jordan pour la collaboration et les discussions enrichissantes que nous avons souvent. Je te souhaite bon courage pour la suite de ta thèse.

Merci au stagiaires qui pendant leur passage à l'unité n'ont pas hésité à me donner un coup de mains dans mon travail. Je pense à Mélissa, Ambre et Laura.

Merci à Karine et Amandine pour leur accompagnement dans la mise au point de certaines techniques moléculaires et sérologiques.

Je remercie le Professeur Philippe Van de Perre pour son implication, son accompagnement, ses conseils et ses encouragements durant toutes ces années ; le Dr Jean Pierre Molès et le Professeur Nicolas Nagot pour leurs conseils et encouragements. Merci aux gestionnaires, Vanessa, Sandrine et Valérie pour leur accompagnement dans les démarches administratives. Merci également à tout le personnel de l'UMR 1058 pour l'ambiance et le climat agréable au sein du laboratoire.

Je voudrais enfin remercier mes parents, mes frères et sœurs, mon épouse Mariam et mes enfants Rayane et Tariq pour votre soutien sans faille pendant les moments les plus difficiles. Le plus dur pour moi a été de vous avoir quitté pour aussi longtemps. Recevez ici, toute mon affection et ma reconnaissance. Je n'oublie pas mon ami et frère Firmin pour ton soutien inestimable et ton humanisme.

Résumé

Les arbovirus sont des virus appartenant à plusieurs familles de virus transmis aux vertébrés par la piqûre de vecteurs arthropodes hématophages tels que les moustiques, les tiques et les phlébotomes. Ils circulent dans les régions tropicales ou subtropicales, principalement en Afrique mais nous observons depuis quelques années une émergence de ces virus dans certaines régions tempérées. L'infection par les arbovirus présente un tableau clinique qui varie en fonction du virus allant d'une forme asymptomatique ou pauci-symptomatique à des formes graves pouvant entraîner la mort. Au cours de ces dernières années, nous assistons à une réémergence des arbovirus en Afrique de l'Ouest dont le Burkina Faso. Notre travail a consisté à évaluer le risque arboviral au Burkina Faso par une surveillance selon une approche globale d'un certain nombre d'arbovirus dont la présence a déjà été identifiée au Burkina Faso, mais aussi des arbovirus dont la circulation n'avait jamais été démontrée et dont nous soupçonnions la circulation. Il s'agit des virus de la dengue, Usutu, du Nil occidental, Zika, O'nyong-nyong et Chikungunya. Dans le cadre d'une approche One Health des échantillons de donneurs de sang, de fièvres d'étiologies inconnues, d'animaux (chevaux, chiens, poulets et pigeons) et de moustiques ont ainsi été collectés et analysés selon des approches moléculaires (RT-PCR) et sérologiques (ELISA, luminex et séroneutralisation). Les résultats obtenus montrent une circulation des virus de la dengue (sérotypes 1, 2, 3 et 4) Usutu, du Nil occidental, Zika, Chikungunya et O'nyong-nyong chez les donneurs de sang. Chez les animaux (chevaux, chiens et pigeons), nous avons mis en évidence la circulation des virus Usutu et du Nil occidental. Nos résultats montrent la nécessité de renforcer le système de surveillance des arbovirus au Burkina Faso.

Mot clés : Arbovirose, circulation, surveillance, virus de la dengue, virus Zika, virus Usutu, virus du Nil occidental, virus Chikungunya, virus O'nyong nyong, Burkina Faso.

Abstract

Arboviruses are viruses belonging to several families and transmitted to vertebrates by the bite of blood-sucking arthropod vectors such as mosquitoes, ticks and sandflies. They circulate in tropical or subtropical regions, mainly in Africa, but in recent years we have observed an emergence of these viruses in certain temperate regions. Infection by arboviruses presents a clinical picture that varies according to the virus, ranging from an asymptomatic or minimally symptomatic form to severe forms that can lead to death. In recent years, we have witnessed a re-emergence of arboviruses in West Africa, including Burkina Faso. Our work consisted of assessing the arboviral risk in Burkina Faso through surveillance using a global approach for a certain number of arboviruses whose presence had already been identified in Burkina Faso, but also for arboviruses whose circulation had never been demonstrated and whose circulation we suspected. These were dengue, Usutu, West Nile, Zika, o'nyong-nyong and Chikungunya viruses. Within the framework of a One Health approach, samples from blood donors, fevers of unknown etiology, animals (horses, dogs, chickens and pigeons) and mosquitoes were collected and screened using molecular (RT-PCR) and serological (ELISA, luminex and serum neutralisation) approaches. The results obtained show the circulation of dengue (serotypes 1, 2, 3 and 4) Usutu, West Nile, Zika, Chikungunya and o'nyong-nyong viruses in blood donors. In animals (horses, dogs and pigeons), we showed the circulation of Usutu and West Nile viruses. Our results show the need to strengthen the surveillance system for arboviruses in Burkina Faso.

Keywords: Arbovirosis, circulation, surveillance, dengue virus, Zika virus, Usutu virus, West Nile virus, Chikungunya virus, O'nyong nyong virus, Burkina Faso.

Table des Matières

Remerciements	ii
Résumé	iv
Abstract	v
Table des Matières	vi
Liste des abréviations	ix
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xi
Publications	xii
1. Article scientifiques.....	xii
2. Revues	xii
3. Autres contributions	xiii
Introduction générale.....	1
Chapitre 1 : Etat de l'art	5
I. Emergence et réémergence des arbovirus	5
II. Circulation des arbovirus en Afrique	6
III. Modes de transmission des arbovirus.....	9
1. Transmission vectorielle	9
2. Transmission non vectorielle	10
3. Les différents vecteurs des arbovirus	11
4. Hôtes et réservoirs des arbovirus	14
IV. Détection des arbovirus et problématique dans les pays à ressources limitées.....	14
1. Méthodes générales de diagnostic des arbovirus	14
2. Problématique du diagnostic des arbovirus dans les pays à ressources limitées.....	17
V. Les Flavivirus.....	19
1. Le virus de la dengue	22
1.1 Epidémiologie en Afrique.....	22
1.2 Virologie	26
1.3 Modes de transmission.....	28
1.4 Manifestations cliniques	30
1.5 Diagnostic biologique du virus de la dengue	33
2. Le virus Zika	35
2.1 Epidémiologie	35
2.2 Virologie	36

2.3	Modes de transmission.....	37
2.4	Manifestations cliniques	41
2.5	Diagnostic biologique du virus Zika.....	42
3.	Le virus Usutu	45
3.1	Epidémiologie	45
3.2	Virologie	49
3.3	Modes de transmission.....	50
3.4	Manifestations cliniques	52
3.5	Diagnostic biologique du virus Usutu.....	52
4.	Le virus du Nil occidental	53
4.1	Epidémiologie	53
4.2	Virologie	58
4.3	Modes de transmission.....	59
4.4	Manifestations cliniques	61
4.5	Diagnostic biologique du virus du Nil occidental.....	62
VI.	Les Alphavirus	64
1.	Le virus Chikungunya	69
1.1	Epidémiologie	69
1.2	Virologie	72
1.3	Modes de transmission.....	73
1.4	Manifestations cliniques	75
1.5	Diagnostic biologique du virus Chickungunya.....	76
2.	Le virus O'nyon-nyong	77
2.1	Epidémiologie	77
2.2	Virologie	79
2.3	Modes de transmission.....	80
2.4	Manifestations cliniques	81
2.5	Diagnostic biologique du virus O'nyong nyong.....	81
VII.	Traitement et prévention contre les arbovirus.....	82
	Chapitre 2 : Objectifs et hypothèses de thèse.....	86
	Chapitre 3 : Résultats - Productions scientifiques.....	88
1.	Circulation des virus Zika et dengue au Burkina Faso.....	88
2.	Circulation des virus WNV et USUV	100
3.	Circulation des virus Chikungunya et O'nyon-nyong.....	116
	Chapitre 4 : Discussion générale-Perspectives.....	117

1. Problématique diagnostic et de surveillance des arbovirus au Burkina Faso	117
2. Circulation des arbovirus chez les humains au Burkina Faso	120
2.1 Le virus de la dengue et le virus Zika	120
2.2 Le virus du Nil occidental et le virus Usutu.....	123
2.3 Le virus Chikungunya et le virus O'nyong nyong.....	126
3. Circulation des arbovirus chez les vecteurs (moustiques) au Burkina Faso	127
4. Les moyens de lutte contre les arbovirus au Burkina Faso	128
5. L'approche « One Health » comme solution pour améliorer la surveillance des arbovirus au Burkina Faso	129
6. Autre arbovirus à surveiller : le virus de la fièvre de la vallée du Rift	130
Conclusion générale	133
Références	134
Annexes	178
Annexes 1 : Revues	178
Annexe 2 : Autres contributions.....	194

Liste des abréviations

ADE	: Facilitation de l'infection par des anticorps
ARN	: Acide ribonucléique
CHIKV	: Virus Chikungunya
DENV	: Virus de la dengue
ECP	: Effet cytopatique
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay
IgG	: Immunoglobuline G
IgM	: Immunoglobuline M
JEV	: Virus de l'encéphalite japonaise
kb	: Kilobase
LAMP	: Test d'amplification isotherme médiée par les boucles
LCR	: Liquide céphalo-rachidien
LNR-FHV	: Laboratoire national de références des fièvres hémorragiques virales
OMS	: Organisation mondiale de la santé
ONNV	: Virus O'nyong nyong
ORF	: Cadre ouvert de lecture
PCR	: Réaction de polymérisation en chaîne
RVFV	: Virus de la fièvre de la vallée du Rift
RT-qPCR	: Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse quantitative
SFV	: Virus de la forêt de Semliki
SINV	: Virus sindbis
TBEV	: Virus de l'encéphalite à tique
USUV	: Virus Usutu
WNV	: Virus du Nil occidental
YFV	: Virus de la fièvre jaune
ZIKV	: Virus Zika

Liste des figures

Figure 1 : Principaux Arbovirus pathogènes chez l'homme	1
Figure 2 : cycle de réplication des Arbovirus.....	10
Figure 3 : Distribution de <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i> en Afrique.....	13
Figure 4 : (a) particule virale des Flavivirus (b) organisation génomique des Flavivirus.....	20
Figure 5 : Distribution de la dengue en Afrique.....	25
Figure 6 : Distribution des sérotypes de la dengue en Afrique de l'Ouest.....	26
Figure 7 : Structure du virus de la dengue.....	28
Figure 8 : Cycles de transmission du virus de la dengue	30
Figure 9 : Chronologie de l'apparition des biomarqueurs de la dengue chez les patients présentant une infection primaire et secondaire	34
Figure 10 : Distribution géographique du virus Zika en Afrique.....	36
Figure 11 : Cycle de transmission du virus Zika.....	41
Figure 12 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques au cours d'une infection par le virus Zika.....	43
Figure 13 : Distribution géographique du virus Usutu en Afrique.....	46
Figure 14 : Cycle de transmission du virus Usutu.....	51
Figure 15 : Distribution du virus du Nil occidental en Afrique	56
Figure 16 : Distribution des lignées du virus du Nil occidental en Afrique.....	57
Figure 17 : Cycle de transmission du virus du Nil occidental.....	61
Figure 18 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques au cours d'une infection au virus du Nil occidental	64
Figure 19 : (a) particule virale des Alphavirus (b) organisation génomique des Alphavirus .	65
Figure 20 : Distribution géographique du virus Chikungunya en Afrique.....	72
Figure 21 : Cycle de transmission du virus Chikungunya.....	74
Figure 22 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques au cours d'une infection par le virus Chikungunya	77
Figure 23 : Distribution du virus O'nyong nyong en Afrique.....	79

Liste des tableaux

Tableau I : Résumé de la circulation des arbovirus majeurs en Afrique de l'Ouest.....	8
Tableau II : Principaux Flavivirus pathogènes pour l'homme	21
Tableau III : Situation épidémiologique de la dengue en Afrique de l'Ouest.....	23
Tableau IV : Situation épidémiologique du virus USUV en Europe.....	47
Tableau V : Principaux Alphavirus pathogènes pour l'homme	67

Publications

1. Article scientifiques

B. Tinto, D. Patindé, A. Kaboré, D. Kania, T. Samdapawindé Kagoné, A. Kiba-Koumaré, L. Pinceloup, G. Thaurignac, P. Van De Perre, R.K. Dabire, T. Baldet, S. Guitierrez, P. Gil, A. Ayoub, S. Salinas, Y. Simonin, **Serological Evidence of Zika Virus Circulation in Burkina Faso**, *Pathogens*. 2022, Vol. 11, Page 741.

B. Tinto, D. Patinde, A. Kaboré, T. Samdapawindé Kagoné, O. Constant, J. Barthelemy, A. Kiba-Koumaré, P. Van De Perre, R.K. Dabiré, T. Baldet, S. Gutierrez, P. Gil, D. Kania, Y. Simonin, **Screening of Circulation of Usutu and West Nile Viruses: A One Health Approach in Humans, Domestic Animals and Mosquitoes in Burkina Faso, West Africa**, *Microorganisms*. 10 (2022) 2016.

2. Revues

B. Tinto, D. Kania, T. Samdapawindé Kagone, A. Dicko, I. Traore, N. De Rekeneire, B.W. Bicaba, H. Hien, P. Van de Perre, Y. Simonin, S. Salinas, **Dengue virus circulation in West Africa: An emerging public health issue**, *Medecine/Sciences*. 38 (2022) 152–158.

B. Tinto, S. Salinas, A. Dicko, T.S. Kagone, I. Traore, N. De Rekeneire, B.W. Bicaba, H. Hien, N. Meda, P. Van De Perre, D. Kania, Y. Simonin, **Spreading of SARS-CoV-2 in West Africa and assessment of risk factors**, *Epidemiology and Infection*. 148 (2020) 1–29.

3. Autres contributions

O. Constant, P. Gil, J. Barthelemy, K. Bolloré, V. Foulongne, C. Desmetz, A. Leblond, I. Desjardins, S. Pradier, A. Joulié, A. Sandoz, R. Amaral, M. Boisseau, I. Rakotoarivony, T. Baldet, A. Marie, B. Frances, F. Reboul Salze, **B. Tinto**, P. Van de Perre, S. Salinas, C. Beck, S. Lecolinet, S. Gutierrez, Y. Simonin, **One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020**, *Eurosurveillance*. 27 (2022).

Introduction générale

Les arbovirus (Arthropod-borne virus) sont un groupe de virus qui sont transmis aux vertébrés par la piqûre de vecteurs arthropodes hématophages tels que les moustiques, les tiques et les phlébotomes [1,2]. Chez les arthropodes, en plus de la transmission horizontale qui se produit d'un homme ou d'un animal infecté à un vecteur ou d'un vecteur à un homme ou à un animal via la salive pendant un repas de sang, il existe une transmission verticale c'est-à-dire transmission du virus d'un vecteur femelle infecté à sa progéniture [3]. Les arbovirus transmissibles à l'Homme font partie de plusieurs familles de virus que sont les *Flaviviridae*, les *Nairoviridae*, les *Peribunyaviridae*, les *Phenuiviridae*, les *Reoviridae*, les *Rhabdoviridae* et les *Togaviridae* [1,4] (Figure 1).

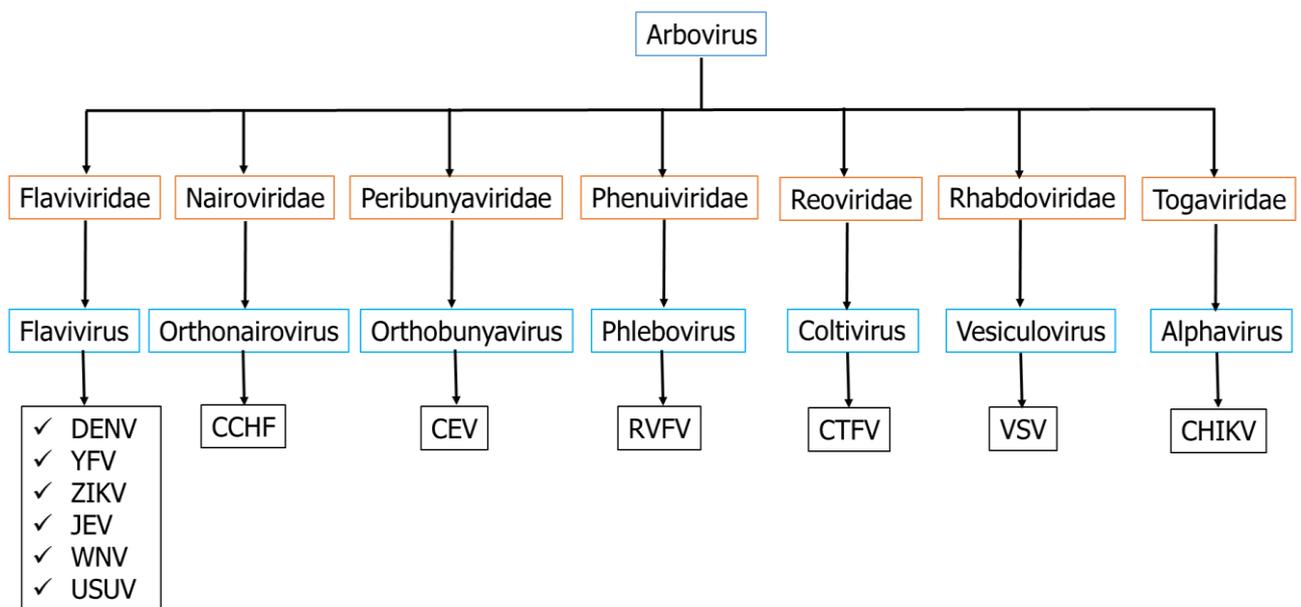


Figure 1 : Principaux arbovirus pathogènes chez l'homme

DENV: virus de la dengue; *YFV*: virus de la fièvre jaune; *ZIKV*: virus Zika; *JEV*: virus de l'encéphalite japonaise; *WNV*: virus du Nil occidental; *USUV*: virus Usutu; *CCHFV*: virus de la fièvre hémorragique Crimée Congo; *CEV*: virus de l'encéphalite de Californie; *RVFV*: virus de la fièvre de la vallée du Rift; *CTFV*: Virus de la fièvre à tiques du Colorado; *VSV*: Virus de la stomatite vésiculaire; *CHIKV*: Virus Chikungunya.

Toutes ces familles de virus sont des virus à ARN, ce qui leur confère un taux de mutation élevé leur permettant ainsi de s'adapter rapidement à l'évolution de l'environnement [1,3]. Par ailleurs il existe une large gamme d'espèces d'arthropodes capables de transmettre les arbovirus, principalement des moustiques ou des tiques, mais également d'autres arthropodes comme les culicoïdes ou les phlébotomes. On estime ainsi à près de 300, les types de moustiques capables de transmettre les arbovirus avec une prédominance des genres *Aedes* et *Culex* [5]. Aussi, environ 116 espèces de tiques et 25 espèces de moucherons ont été identifiées comme pouvant transmettre les arbovirus [6].

Les signes cliniques observés lors des infections par les arbovirus peuvent être confondus avec d'autres maladies telles que le paludisme et la fièvre typhoïde [7]. Bien que la majorité des infections aux arbovirus soient asymptomatiques, on peut observer souvent un tableau clinique allant d'une fièvre légère à un syndrome hémorragique parfois mortel en fonction des virus [8–10]. Plusieurs arbovirus peuvent présenter un tableau clinique similaire si bien qu'il est difficile de les différencier par rapport aux signes cliniques observés. Le diagnostic biologique reste le seul moyen pour différencier ces infections [9,11]. Des complications à type de fièvres hémorragiques sont observées avec des arbovirus tels que le virus de la fièvre jaune (YFV) et le virus de la dengue (DENV). Le virus Chikungunya (CHIKV), le DENV, le virus du Nil occidental (WNV), le virus Usutu (USUV) et les virus des encéphalites (virus de l'encéphalite équine de l'Est, virus de l'encéphalite équine de l'Ouest, virus de l'encéphalite équine Vénézuélienne) sont responsables de complications à type de méningo-encéphalite. Des polyalgies fébriles sont observées avec le DENV, le CHIKV et le virus O'nyong nyong (ONNV).

Les arbovirus circulent dans les régions tropicales ou subtropicales, principalement en Afrique mais nous observons depuis quelques années une émergence de ces virus dans certaines régions tempérées [12]. C'est le cas par exemple du sud de la France qui connaît depuis 2014

des cas autochtones d'infection au DENV, au CHIKV et au WNV [13]. En 2016, le premier cas humain de l'infection par l'USUV en France a par ailleurs été identifié chez un patient Montpelliérain atteint de paralysie faciale [14]. La dengue est aujourd'hui endémique dans plus de 100 pays en Afrique, en Asie et en Amérique [15]. Certains arbovirus ont été introduits dans des régions du monde où ils n'existaient pas. C'est le cas du YFV qui a été exporté en Asie en 2016 par des voyageurs internationaux créant un risque majeur de santé publique, la population asiatique n'étant pas vaccinée contre le YFV [16]. Le virus CHIKV circule désormais en Amérique latine et dans les Caraïbes. Le WNV s'est rapidement propagé en Amérique du Nord et du Sud depuis son introduction aux Etats-Unis en 1999 [16].

Le nombre de virus émergents potentiels est considérable[17]. On estime à plus de 530 le nombre d'arbovirus connus, la plupart étant très peu étudiés [18]. Au cours de ces dernières années, nous assistons à une réémergence des arbovirus en Afrique de l'Ouest. Ainsi entre 2010 et 2020 des flambées de cas d'infection au DENV ont été rapportés au Burkina Faso, en Côte d'Ivoire et au Sénégal [19] ; des cas d'infection au CHIKV au Sénégal [20]; des cas d'infection au virus Zika (ZIKV) au Cap Vert [21]; des cas de fièvre de la vallée du Rift (RVF) au Niger et au Sénégal [22,23].

Les autorités sanitaires et politiques, en particulier en Afrique, ne sont pas toujours préparées pour faire face à l'émergence de nouvelles épidémies. L'épidémie de la maladie à virus Ebola en Afrique de l'ouest en 2014-2016, l'épidémie du ZIKV en Asie et en Amérique du Sud et plus récemment la pandémie de la COVID-19 en sont des illustrations parfaites [24–26]. La mise en place ou le renforcement des systèmes de surveillance sont d'une importance capitale pour que les pays puissent faire face à la survenue d'éventuelles épidémies. Etant donné que l'émergence et la réémergence des infections virales font intervenir plusieurs facteurs (environnementaux, humains et climatiques) les surveillances intégrées selon des approches « One Health » ou « Santé Globale » doivent être privilégiées. Nos travaux de thèse s'inscrivent

dans cette logique. Nous avons évalué le risque arboviral au Burkina Faso par une surveillance selon une approche « One Health » d'un certain nombre d'arbovirus dont la présence avait déjà été identifiée au Burkina Faso, mais aussi des arbovirus dont la circulation n'avait jamais été démontrée et dont nous soupçonnions la circulation.

Le Burkina Faso, en plus d'être endémique pour la dengue notifie chaque année des cas sporadiques de Fièvre jaune. Le pays dispose depuis 2014 d'un laboratoire national de référence des fièvres hémorragiques virales (LNR-FHV) qui est chargé de la surveillance des virus responsables de fièvres hémorragiques y compris les arboviroses. Les techniques utilisées dans ce laboratoire sont essentiellement des tests moléculaires alors que de nombreux arbovirus ont des temps de virémies courts rendant souvent la détection des cas positifs par RT-PCR difficile. Au vu de cela, des tests sérologiques peuvent s'avérer importants pour évaluer la circulation des arbovirus dans le pays.

Notre travail de thèse s'articulera autour de 4 chapitres :

- Le chapitre 1 qui va concerner l'état de l'art dans lequel nous parlerons de l'émergence et de la réémergence des arbovirus, de la circulation des arbovirus en Afrique, de la problématique diagnostic des arbovirus en Afrique et des généralités sur les Flavivirus et les Alphavirus ;
- Le chapitre 2 où nous présenterons nos objectifs et hypothèses de travail ;
- Le chapitre 3 où nous présenterons nos résultats et nos productions scientifiques ;
- Le chapitre 4 où nous ferons une discussion générale sur l'ensemble de notre travail et les perspectives associées.

Nous terminerons par une conclusion générale.

Chapitre 1 : Etat de l'art

I. Emergence et réémergence des arbovirus

Les problématiques liées aux maladies infectieuses émergentes se sont beaucoup développées au cours de ces dernières décennies [27]. Il est difficile de prédire quel virus peut émerger dans un territoire donné ou si tel ou tel agent pathogène franchira la barrière qui sépare son réservoir naturel des populations humaines et déclencher une épidémie, d'autant plus que le nombre de virus émergents potentiels est considérable [28,29]. L'émergence et la réémergence des arbovirus sont des phénomènes naturels amplifiés par l'empreinte de l'Homme sur son environnement. Elles peuvent être liées à l'évolution et à l'adaptation des espèces, au développement du commerce international, au changement climatique, à l'urbanisation et la croissance démographique incontrôlée, à la migration des oiseaux [3,30–33].

Le changement du comportement humain et l'écologie constituent des facteurs qui influencent fortement l'émergence des maladies infectieuses [34]. Les mouvements de populations, l'agriculture et la déforestation ont ainsi favorisé l'émergence de certains virus [35,36]. En effet, les arbovirus circulent parmi les animaux sauvages dans un cycle enzootique et l'Homme à travers certaines activités telles que l'agriculture et ou l'élevage se trouve ainsi en contact étroit avec les réservoirs zoonotiques. Ce qui va favoriser une transmission des virus de la faune sauvage aux humains [34,37]. La prévalence des maladies à transmission vectorielle a considérablement augmenté ces dernières années, en raison notamment de l'intensification des voyages internationaux. Le nombre de cas a augmenté dans les régions endémiques, mais nous assistons également à une émergence de certains virus dans de nouvelles régions où les virus n'avaient jamais circulé auparavant [30,38–40]. C'est le cas de certaines zones tempérées en Europe [41,42]. Ce phénomène s'explique d'une part par la présence de vecteurs compétents tels que les moustiques et d'autre part par l'introduction des virus par des voyageurs revenant

de zones tropicales endémiques ou par les migrations des réservoirs aviaires de certains de ces virus (l'USUV et le WNV) [43,44]. Plusieurs pays européens sont devenus endémiques pour certains arbovirus [45]. De plus, le contrôle et la prévention des maladies à transmission vectorielle sont rendus difficiles à cause du développement de résistance des moustiques aux insecticides [46].

Dans les pays en développement comme c'est le cas en Afrique de l'Ouest, le développement de l'agriculture et de l'élevage, l'augmentation de la densité de la population, le transport accru des humains et des marchandises commerciales, l'urbanisation mal contrôlée et la déforestation ont fortement contribué à l'émergence et à la réémergences des arbovirus dans ces régions [31,38,47–49].

C'est l'exemple du Burkina Faso où de nombreux arbovirus connus ont ré-émergé récemment, notamment les virus de la fièvre jaune (YFV), ou de la dengue (DENV). Ce dernier a été impliqué en 2016 et 2017 dans des épidémies urbaines majeures déclenchant l'inquiétude des autorités sanitaires [50,51].

II. Circulation des arbovirus en Afrique

L'Afrique est le continent le plus touché par la circulation des arbovirus. En effet la majorité des arbovirus ont émergé pour la première fois en Afrique et certains sont devenus endémiques dans plusieurs régions [52]. La circulation des arbovirus en Afrique est probablement largement sous-estimée à cause d'un manque de système de surveillance dans de nombreux pays où les arboviroses peuvent être souvent confondues à d'autres maladies.

La circulation des arbovirus est intimement liée à la distribution des arthropodes, vecteurs de ces virus et aux facteurs environnementaux et climatiques [53]. Ces dernières années plusieurs pays africains ont rapporté des cas d'émergences et de réémergence d'arbovirus. Le ZIKV, le DENV, le YFV, le CHIKV et le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV)

semblent être les virus qui circulent le plus en Afrique [54] (Tableau I). Plusieurs pays ont rapporté des preuves moléculaires ou sérologiques de la circulation de ces virus chez l'homme, chez l'animal et/ou chez les vecteurs. Ainsi, la circulation du ZIKV a été identifiée dans 14 pays africains essentiellement les pays d'Afrique subsahariennes (Burkina Faso, Sénégal, Nigéria, Cameroun, République centrafricaine, Gabon, Angola, etc.) et un pays d'Afrique du nord (Egypte) ; le DENV dans 36 pays africains notamment l'Afrique subsaharienne (Burkina Faso, Mali, Sénégal, Nigéria, Bénin, Togo, Afrique du sud, Madagascar, Mozambique, Zambie, Tanzanie, Namibie, Gabon, République démocratique du Congo, etc.). Le YFV quant à lui a été détecté dans 30 pays africains majoritairement les pays d'Afrique Centrale (Angola, Cameroun, Gabon, République centrafricaine, République démocratique du Congo, Tchad, etc.) et de l'Ouest (Burkina Faso, Niger, Nigéria, Mali, Côte d'Ivoire, Mauritanie, Sénégal, etc.). On retrouve le CHIKV dans 26 pays principalement d'Afrique subsaharienne (Burkina Faso, Sénégal, Nigéria, Cameroun, République centrafricaine, République démocratique du Congo, Ouganda, Gabon, Afrique du Sud, Zimbabwe, Madagascar, etc.). Le RVFV a été identifié dans 36 pays, quasiment tous les pays de l'Afrique Subsaharienne à l'exception de quelques pays d'Afrique de l'Ouest (Côte d'Ivoire, Togo, Bénin, Liberia et Sierra Leone) et l'Egypte [54–56]. La circulation du WNV a été mise en évidence dans plusieurs pays africains parmi lesquels on peut citer l'Algérie, la République centrafricaine, la République démocratique du Congo, l'Ethiopie, le Gabon, le Ghana, le Kenya, Madagascar, le Mali, le Maroc, la Mozambique, la Namibie, le Nigéria, le Sénégal, la Sierra Leone, la Tanzanie, la Tunisie, l'Ouganda et la Zambie [57]. L'ONNV est endémique en Afrique Subsaharienne avec une circulation dans les pays comme l'Ouganda, le Kenya, la Tanzanie, le Nigéria, le Sénégal, le Ghana, la Sierra Leone, la République démocratique du Congo, la République centrafricaine, le Cameroun le Malawi et la Mozambique [58].

Tableau I : Résumé de la circulation des arbovirus majeurs en Afrique de l'Ouest

Virus	Famille	Distribution
Virus Zika	<i>Flaviviridae</i>	Burkina Faso, Bénin, Guinée Bissau, Mali, Nigéria, Sénégal.
Virus de la dengue	<i>Flaviviridae</i>	Burkina Faso, Bénin, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Libéria, Mali, Nigéria, Niger, Sénégal, Sierra Leone, Togo.
Virus de la Fièvre jaune (Amaril)	<i>Flaviviridae</i>	Burkina Faso, Bénin, Côte d'Ivoire, Gambie, Ghana, Guinée, Guinée Bissau, Libéria, Mali, Mauritanie, Nigéria, Niger, Sénégal, Sierra Leone, Togo.
Virus Chikungunya	<i>Alphaviridae</i>	Burkina Faso, Bénin, Côte d'Ivoire, Guinée, Nigéria Sénégal, Sierra Leone.
Virus de la Fièvre de la vallée du Rift	<i>Phenuiviridae</i>	Burkina Faso, Gambie, Ghana, Guinée, Mali, Mauritanie, Niger, Nigéria, Sénégal.
Virus du Nil occidental	<i>Flaviviridae</i>	Côte d'Ivoire, Ghana, Mali, Nigéria, Sénégal, Sierra Leone.
Virus O'nyong nyong	<i>Alphaviridae</i>	Côte d'Ivoire, Ghana, Nigéria, Sénégal, Sierra Leone.

D'autres arbovirus moins bien connus circulent également en Afrique avec des incidences moindres par rapport à ceux cités plus haut. Parmi ces arbovirus on distingue le virus Sindbis (SINV) qui a une circulation qui s'étend de l'Afrique du Sud à l'Afrique de l'Ouest avec des cas rapportés en Ouganda, au Kenya, au Cameroun et en Egypte [52] ; un autre Alphavirus, le

virus Semliki (SFV) isolé pour la première fois en 1942 en Ouganda a une circulation limitée en Afrique du Sud, au Mozambique, au Cameroun en république Centrafricaine, en république démocratique du Congo, au Nigéria, au Sénégal et en Ouganda [52]. L'USUV est l'un des arbovirus pour lesquels nous avons le moins d'information sur sa circulation en Afrique avec des cas identifiés dans seulement 14 pays dont 6 pays d'Afrique de l'Ouest : Burkina Faso, Côte d'Ivoire, Guinée, Mali, Nigéria et Sénégal [59,60].

III. Modes de transmission des arbovirus

1. Transmission vectorielle

Les arbovirus sont des virus zoonotiques qui circulent suivant 2 cycles (Figure 2) : un cycle sylvatique et un cycle urbain ou domestique. Le cycle sylvatique se produit entre les vecteurs arthropodes et les hôtes sauvages (primates non humains, rongeurs, oiseaux, etc.) et le cycle urbain ou domestique se produit entre les vecteurs et les humains ou les animaux domestiques [61]. Les arbovirus transmis par les tiques tels que le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) circulent entre les tiques et les petits vertébrés (rongeurs et certains carnivores) [62]. Les arbovirus transmis par les moustiques tels que l'USUV, le WNV et le JEV circulent entre les moustiques et les petits mammifères mais aussi les oiseaux et parfois les reptiles [63–65]. L'Homme à travers certaines activités (agricultures, élevage) va se retrouver à proximité du réservoir animal et s'infecter par la pique des vecteurs sauvages. Les habitations à proximité des zones forestières constituent des zones d'émergence où le virus circule entre les humains et certains vecteurs. L'homme à travers ses déplacements va introduire le virus en zone urbaine où les vecteurs urbains vont assurer la transmission et potentiellement créer ainsi des épidémies (Figure 1).

Après le repas sanguin sur un hôte virémique, les arbovirus vont se répliquer dans l'épithélium de l'intestin moyen du moustique. Lors de la piqûre d'un individu sain, le

moustique infecté va déposer le virus au niveau des tissus cutanés. Le virus va ensuite se répliquer au niveau des cellules musculaires et des cellules de Langerhans pour ensuite se retrouver au niveau des ganglions lymphatiques et au niveau du sang [66].

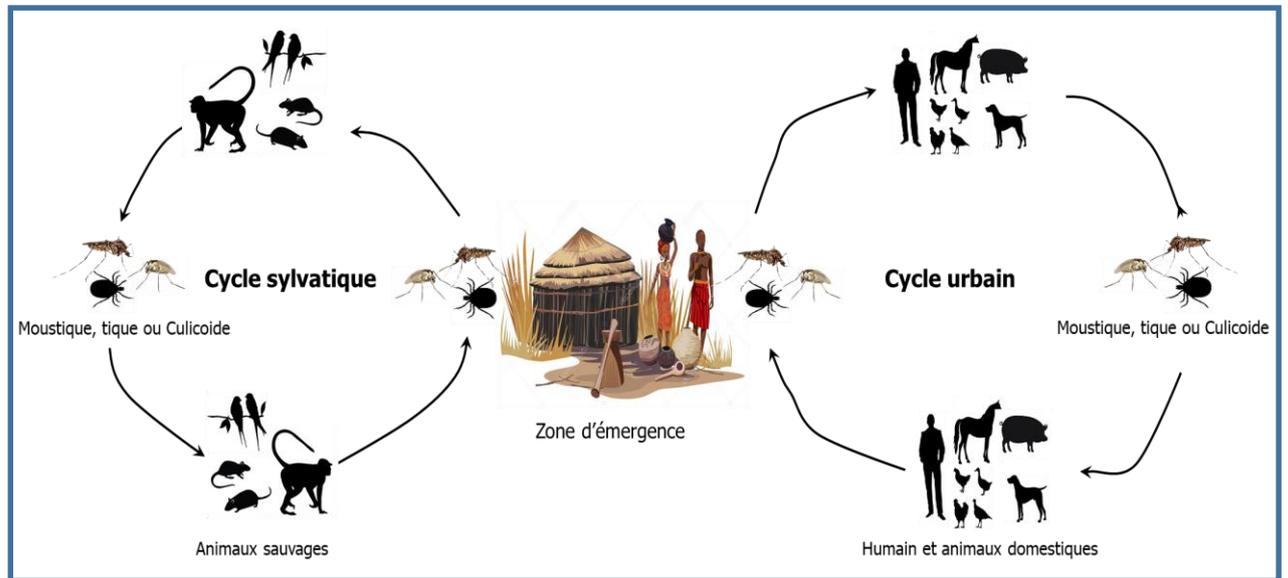


Figure 2 : cycle de réplication des arbovirus

i) Le cycle sylvatique se produit en zone forestière où les arbovirus circulent entre les hôtes sauvages les vecteurs ; iii) la zone d'émergence est constituée par les villages se trouvant à proximité des forêts ; iii) le cycle urbain se produit en zone urbaine où on a une circulation des Flavivirus entre les vecteurs et les humains ou les animaux domestiques.

2. Transmission non vectorielle

Chez les humains et les animaux, il existe des voies de transmissions non vectorielles (transmission par voie sexuelle et transmission par transfusion sanguine ou transplantation d'organes chez les humains, transmission mère-enfant chez les humains et les animaux) pour certains arbovirus ; chez certaines espèces de moustiques et de tiques, on observe également

une transmission transovarienne pendant laquelle la femelle infectée transmet le virus à sa progéniture [67].

3. Les différents vecteurs des arbovirus

Les arbovirus sont transmis par quatre groupes d'arthropodes essentiellement : les moustiques, les tiques, les phlébotomes et les culicoïdes. En plus d'être des vecteurs, les arthropodes constituent également des réservoirs des arbovirus puisqu'après infection par un arbovirus, ils restent infectés toute leur vie [68].

Parmi les arthropodes, ce sont les moustiques qui sont les plus impliqués dans la transmission des arbovirus. Certains moustiques tels que les *Aedes* sont capables de transmettre presque tous les arbovirus circulant en Afrique. C'est le cas des Flavivirus tels que le YFV, le DENV, le WNV, l'USUV ; des Phenuivirus tels que le RVFV ; mais aussi des Alphavirus tels que le SFV, le SINV et le CHIKV[54]. L'ONNV est l'un des rare Alphavirus qui est transmis par le moustique Anophèle, également vecteur du paludisme [69]. Les moustiques *Aedes* sont aujourd'hui présents dans presque tous les pays africains [54] (Figure 3). *Aedes aegypti* vit à proximité des humains, pond ses œufs dans des conteneurs artificiels créé le plus souvent par l'Homme et se repose à l'intérieur des maisons [70]. Les *Culex* sont également impliqués dans la transmission de plusieurs arbovirus parmi lesquels on retrouve le CHIKV, le WNV, l'USUV et le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEE pour Western equine encephalitis virus).

Les tiques sont impliquées dans la transmission du TBEV et le virus de la forêt de Kyasanur (KFDV pour Kyasanur Forest disease virus) entre autres [71]. Certains arbovirus transmis par les moustiques ont été occasionnellement isolés chez des tiques : il s'agit du WNV, du YFV, du CHIKV et du SINV. Le WNV a été isolé en Egypte chez *Argas lieirinann* [72] ; le YFV a été isolé en République centre Africaine chez *Amblyoinina variegatuni* [73] ; Le CHIKV a été

isolé au Sénégal chez *Ornithodoros sonrai* [74]. Le SINV a été isolé en Italie chez *Hyalomma marginntztm marginatum* [75]. Cependant il n'a pas été démontré que ces tiques pouvaient être considérées comme des vecteurs de ces différents virus.

Le virus Oropouche est l'un des rare arbovirus transmis par un culicoïde (*Culicoides paraensis*). C'est un virus de la famille des *Peribunyaviridae* du genre *Orthobunyavirus* [4].

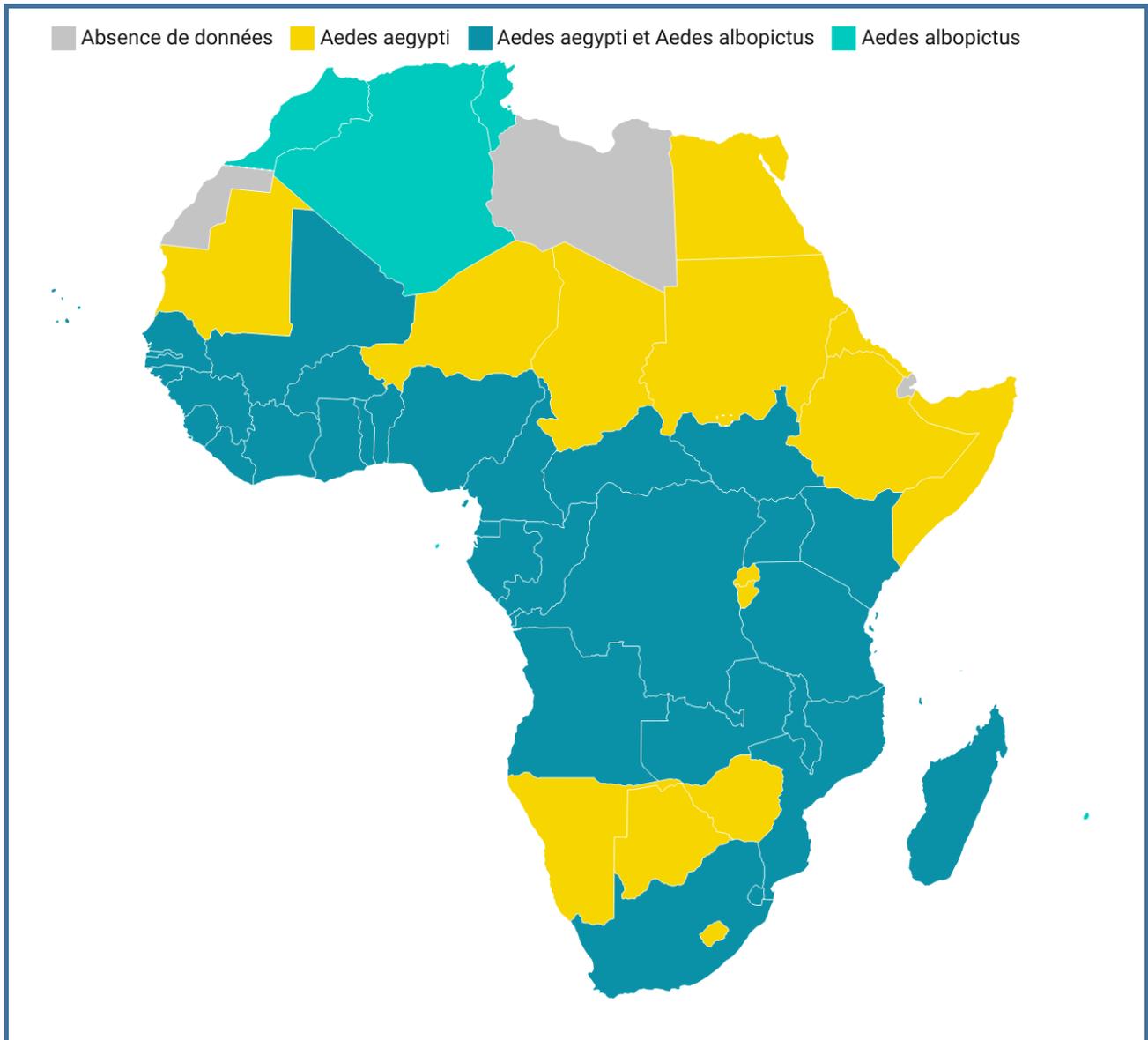


Figure 3 : Distribution de *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* en Afrique

La couleur jaune représente les pays où Aedes aegypti est présent, la couleur vert clair représente les pays où Aedes albopictus est présent ; la couleur vert foncé représente les pays où Aedes aegypti et Aedes albopictus sont présents.

4. Hôtes et réservoirs des arbovirus

Les arbovirus ont la capacité de se multiplier chez diverses espèces animales. Parmi ces animaux, on distingue les réservoirs chez lesquels une infection par le virus ne provoque pas de maladie et les hôtes chez lesquels une infection par le virus peut provoquer une maladie apparente.

Les petits mammifères, les marsupiaux, les reptiles, les oiseaux les primates non humains sont les principaux hôtes ou réservoirs vertébrés des arbovirus à transmission vectorielle [10,76]. Certains animaux de plus grande taille, tels que les cerfs, les chèvres, les moutons et les chevaux peuvent servir également d'hôtes de façon accessoire. Les hôtes accessoires ou « cul de sac » épidémiologique sont des espèces chez lesquelles la virémie est de courte durée et de faible concentration ne permettant pas d'infecter d'autres vecteurs et de maintenir un cycle de transmission : c'est le cas du WNV et de l'USUV chez l'Homme [77]. Dans certaines situations, l'homme comme hôte participe pleinement à dissémination et à l'amplification des arbovirus : c'est le cas par exemple du DENV et du CHIKV [76].

IV. Détection des arbovirus et problématique dans les pays à ressources limitées

1. Méthodes générales de diagnostic des arbovirus

Il faut recourir aux diagnostics de laboratoire pour confirmer une infection par les arbovirus. Le diagnostic biologique des arbovirus s'effectue soit par isolement du virus en culture ou détection directe de l'ARN génomique viral dans les liquides biologiques (sang, urine, liquide céphalo-rachidien) en fonction des virus pendant la phase aiguë de l'infection, ou dans le cerveau suite à une encéphalite mortelle [66], soit par capture et détection de la protéine NS1 sécrétée ou à travers la réponse immunitaire de l'hôte (cas du DENV). Le diagnostic peut se

faire également par la détection des anticorps IgM pendant la phase aigüe d'infection ou par la détection des anticorps IgG entre la phase aigüe de l'infection et la convalescence [66,78].

Plusieurs techniques de diagnostic existent en fonction des marqueurs recherchés : l'isolement du virus consiste à l'observation des effets cytopathiques produits sur les cellules infectées. Pour la détection du virus, des techniques de RT-PCR sont utilisées. Enfin, la détection des anticorps peut se faire principalement par des techniques ELISA [79]. Des tests de diagnostic rapides existent pour certains arbovirus tels que le DENV, le CHIKV et le WNV. Ces tests rapides permettent de détecter les anticorps ou les antigènes de ces virus. Cependant, ils souffrent d'un manque de sensibilité et de spécificité [80].

Bien qu'il existe de nombreux tests PCR commerciaux, la plupart des tests sont développés en interne et manque souvent de standardisation.

Un test peu coûteux ayant une très bonne spécificité et sensibilité a été développé. C'est le test d'amplification isotherme médiée par les boucles (LAMP) qui est une technique d'amplification de l'ADN. La RT-LAMP combine l'amplification isotherme médiée par les boucles et une étape de transcription inverse comme dans le cas de la RT-PCR [81]. Dans ce test, la séquence cible est amplifiée à une température constante de 60 et 65°C par utilisation de 4 amorces (2 amorces externes et 2 amorces internes). Ce test à l'avantage de ne pas utiliser de thermocycleur [81,82].

Il existe de nombreux tests sérologiques aussi bien commerciaux que des tests dit « maisons ». Cependant, ces tests sont difficiles à interpréter dans les pays d'Afrique de l'Ouest où l'on observe une circulation de plusieurs arbovirus et pour lesquels, on observe des réactions croisées. En effet il existe des réaction croisée entre les Flavivirus liées à la protéine E [83] mais aussi entre les Alphavirus [84]. Par exemple le sérum d'une personne qui a déjà été infecté par le DENV peut réagir lorsqu'il est testé pour la recherche d'anticorps contre le ZIKV ou le WNV.

Ces réactions croisées peuvent être à l'origine de résultats faussement positifs. Le test de séroneutralisation ou test de neutralisation par réduction de plaque reste une bonne alternative pour remédier au problème de réactions croisées même si ces tests manquent souvent de standardisation et nécessitent du personnel très bien formé et un équipement adéquat [7,85]. Ces tests de séroneutralisation nécessitent également des laboratoires de haut niveau de biosécurité 2 ou 3 en fonction de la classification du virus. Très peu de pays africains disposent de laboratoires de niveau de sécurité 3 donc la séroneutralisation des virus de classe 3 tels que le WNV, le CHIKV et le DENV ne peuvent pas être réalisée dans ces pays.

La séroneutralisation permet de quantifier le titre d'anticorps neutralisant spécifique dirigés contre le virus [86]. Son interprétation peut cependant être difficile chez les patients ayant des antécédents de vaccination contre certains arbovirus en particulier les Flavivirus ou ayant déjà été infectés par d'autres arbovirus [86,87].

De nombreux efforts ont été consentis par l'OMS ces dernières décennies afin d'améliorer la surveillance et le contrôle de certains arbovirus à travers la mise à disposition des acteurs de la santé des différents pays de nouvelles stratégies et de nouveaux outils de lutte [88]. En Afrique de l'Ouest, certains pays ont mis en place des laboratoires nationaux de référence pour la surveillance et le diagnostic des arbovirus tels que la dengue. C'est le cas par exemple du Burkina Faso avec la création du LNR-FHV qui a en charge la surveillance et le diagnostic de la dengue, des icères fébriles et les autres maladies apparentées. A travers ce laboratoire le pays a mis en place en 2017 un système de surveillance par site sentinelle des arboviroses y compris la dengue.

2. Problématique du diagnostic des arbovirus dans les pays à ressources limitées

Le continent africain fait face à la circulation de plusieurs pathologies ayant parfois des symptomatologies similaires. Parmi ces maladies on peut citer le paludisme qui est endémique dans plusieurs régions, la grippe, la rougeole, la dengue, la fièvre jaune, le Chikungunya, la fièvre Lassa, la fièvre typhoïdes, les méningites bactériennes, la leptospirose, etc. [89]. Toutes ces maladies peuvent avoir des présentations cliniques similaires si bien qu'il est impossible de les différencier en se basant uniquement sur l'examen clinique. Les infections dues aux arbovirus peuvent donc être confondues avec d'autres pathologies, ce qui peut conduire à des erreurs thérapeutiques dans la prise en charge des patients. En effet il existe des contre-indications dans l'utilisation de certains médicaments dans la prise en charge de certaines arboviroses. C'est le cas par exemple de la dengue où l'utilisation des anti-inflammatoires peut augmenter le risque de survenue des formes hémorragiques [90]. Il est donc impératif de diagnostiquer correctement ces maladies et cela passe indéniablement par le diagnostic de laboratoire. Les tests de laboratoires comprennent les tests moléculaires (détection de l'ARN viral par RT-PCR), les tests antigéniques et les tests sérologiques (recherche des anticorps par ELISA) [89]. La réalisation de ces tests requiert des équipements de qualité et un personnel bien formé; ce qui n'est pas toujours le cas des pays à faible revenu où souvent les laboratoires nationaux manquent d'équipements. Aussi les pénuries d'eau et le manque d'électricité dans certaines régions impactent considérablement la qualité des analyses de laboratoire.

En Afrique on note également une consultation tardive des patients dans les hôpitaux donc hors de la fenêtre virémique de la plupart des arboviroses rendant la détection de l'ARN viral et de l'antigène viral difficile. A cela s'ajoute les bulletins d'examen mal renseignés où parfois la date du début des symptômes n'est pas mentionnée rendant le choix du test à réaliser

compliqué. La combinaison des tests moléculaires et sérologiques semble être le meilleur moyen pour un diagnostic fiable dans ces cas de figure.

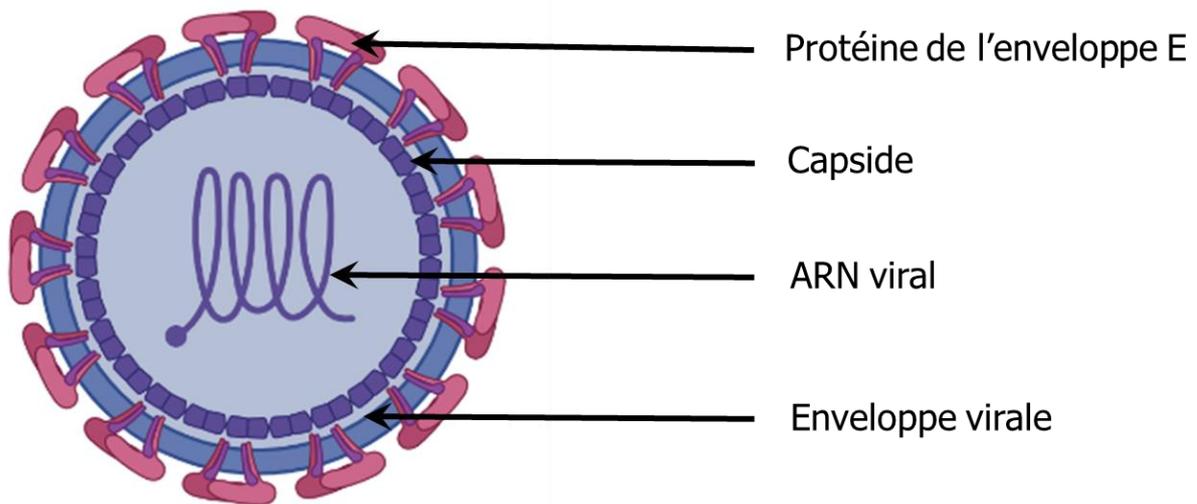
Le diagnostic des arbovirus n'est pas réalisé en routine dans de nombreux pays africains en raison de l'existence d'autres maladies prioritaires telles que le paludisme et la tuberculose. C'est uniquement lors des épidémies que le diagnostic est réalisé dans les laboratoires.

Certains pays africains disposent de laboratoires de références capables d'effectuer le diagnostic des arbovirus. Cependant ces laboratoires sont situés dans les grandes villes alors que la plupart des épidémies surviennent en zones rurales avant de se propager dans les grandes villes. En cas de survenue d'épidémies en zone rurale, les échantillons doivent être collectés puis acheminés dans les laboratoires en ville pour être analysés. Le manque de chaîne de froid dans la plupart de ces zones et le retard dans l'acheminement des échantillons lié à l'inaccessibilité de certaines zones peuvent avoir un impact sur la qualité des échantillons analysés. En effet certaines zones rurales en Afrique sont inaccessibles en raison de l'état des routes et/ou de l'insécurité. Pour pallier à ces problèmes, les pays africains devraient opter pour des laboratoires mobiles capables d'être déployés près des foyers épidémiques. En Afrique de l'Ouest, un réseau de biosûreté des pays du sahel a été mise en place en 2017. Ce réseau coordonné par la fondation Mérieux et l'institut de microbiologie de la Bundeswehr a permis aux 5 pays membres du réseau (Burkina Faso, Mali, Mauritanie, Niger et Tchad) de se doter de laboratoires mobiles capables d'être déployés dans des zones rurales ou forestières où les ressources sont limitées [91]. Récemment le Sénégal a utilisé un laboratoire mobile capable de réaliser des tests d'amplification par polymérase recombinante pour le diagnostic des arbovirose dans un contexte de ressources limitées [92].

V. Les Flavivirus

De nombreux arbovirus sont des Flavivirus. Ce sont des virus d'environ 50 nm de diamètre appartenant à la famille des *Flaviviridae*. Ce sont des virus à ARN monocaténaire enveloppés, de sens positif d'environ 11 kilobases avec une structure en coiffe en 5' dépourvue de queue poly A en 3' [93]. Leur génome est constitué d'un seul cadre de lecture (ORF) et code pour une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés. Après clivage cette protéine va libérer 3 protéines structurales (capside C, pré-membrane prM et enveloppe E) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) [94] (Figure 4). La nucléocapside est entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte. La protéine C est responsable de l'encapsidation et intervient dans la protection du matériel génétique. La protéine PrM est impliquée dans la formation de l'enveloppe virale et joue un rôle important dans le maintien de la structure spatiale de la protéine E. Les protéines prM et E forment la structure de la surface des virions. La protéine E participe à la fusion membranaire entre le virus et la cellule hôte. Les protéines non structurales interviennent dans la réplication virale, l'assemblage, la protéolyse, la maturation et la régulation de l'immunité de l'hôte [95].

a)



b)

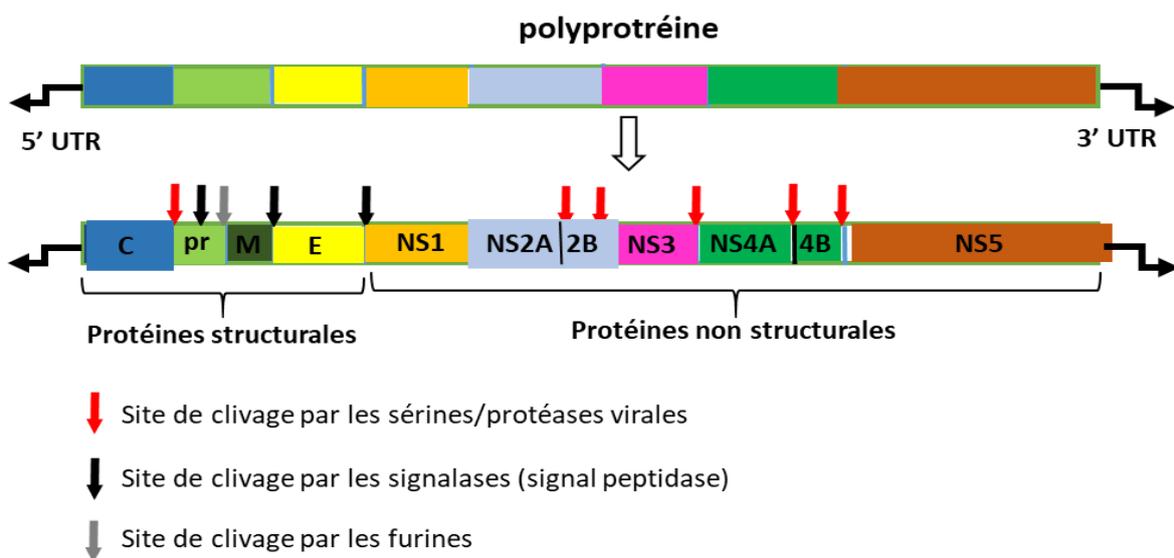


Figure 4 : (a) particule virale des Flavivirus (b) organisation génomique des Flavivirus

La figure (a) représente la structure de la particule virale des Flavivirus où on peut apercevoir l'ARN viral, la capside, l'enveloppe virale et la protéine de l'enveloppe E. La figure (b) représente le génome des Flavivirus, il code pour une polyprotéine qui après clivage par les protéases vont donner 3 protéines structurales (capside C, pré-membrane prM et enveloppe E) et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5).

Le genre Flavivirus comprend plusieurs arbovirus pathogènes pour l'Homme (Tableau II) parmi lesquels nous pouvons citer : le DENV, le YFV, le ZIKV, le WNV, le USUV, le JEV et le TBEV [96].

Tableau II : Principaux Flavivirus pathogènes pour l'homme

Virus	Vecteur	Réservoir animal	Manifestations cliniques	Distribution géographique
Virus de la Fièvre jaune (YFV)	Moustique Aedes, Haemagogus	Primates non humains	Fièvre, fièvre hémorragique, ictère	Afrique, Asie, Europe, Amériques, Océanie
Virus de la Dengue (DENV)	Moustique Aedes	Humains, primates non humains	Fièvre, rash, fièvre hémorragique	Afrique, Amérique, Asie, Europe, Océanie, Pacifique
Virus Usutu (USUV)	Moustique Culex, Aedes	Oiseaux	Encéphalites, méningites, méningo- encéphalite	Afrique, Europe
Virus du Nil occidental (WNV)	Moustique Culex, Aedes	Oiseaux	Fièvre, Encéphalites, méningites	Afrique, Amérique du Nord, Europe, Moyen-Orient

Virus Zika (ZIKV)	Moustique Aedes	primates non humains	Encéphalites, syndrome de Guillain Barré, microcéphalies	Afrique, Amérique, Asie, Europe, Océanie, Pacifique
Virus de l'encéphalite japonaise (JEV)	Moustique Aedes	Oiseaux, porcs	Fièvre, Encéphalites	Asie, Pacifique
Virus de l'encéphalite à tique (TBEV)	Tique Ixodes	Petits rongeurs	Fièvre, Encéphalites, méningites	Asie, Europe

1. Le virus de la dengue

Adapté de : B. Tinto, D. Kania, T. Samdapawindé Kagone, A. Dicko, I. Traore, N. De Rekeneire, B.W. Bicaba, H. Hien, P. Van de Perre, Y. Simonin, S. Salinas, **Dengue virus circulation in West Africa: An emerging public health issue**, *Medecine/Sciences*. 38 (2022) 152–158. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022007>.

1.1 Epidémiologie en Afrique

La dengue est endémique dans la plupart des régions tropicales et subtropicales dans lesquelles elle constitue l'une des principales causes de maladie [97]. Elle s'est rapidement répandue à travers le monde et plus de la moitié de la population mondiale vit actuellement dans des zones à risque [97]. L'Asie est le continent le plus touché suivi de l'Amérique et plus récemment de l'Afrique [98].

La première épidémie de dengue documentée en Afrique a été celle survenue à Durban en Afrique du Sud en 1927 [99]. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de la dengue en Afrique, les données publiées rapportent que 22 pays africains ont notifié des cas sporadiques ou des épidémies de dengue entre 1960 et 2010 [100]. La maladie est aujourd'hui endémique dans plus de 34 pays africains [101] (Figure 5). Le premier sérotype de dengue isolé en Afrique de l'Ouest est le sérotype 1 isolé en 1964 au Nigéria [99]. Depuis lors, les quatre sérotypes du virus ont été identifiés en Afrique [101] (Tableau III).

Tableau III : Situation épidémiologique de la dengue en Afrique de l'Ouest

Pays	Année	Sérotype	Référence
Burkina Faso	1925, 2007, 2013, 2016, 2017	1, 2, 3, 4	[102–104]
Cote d'ivoire	2006, 2007, 2008, 2017	3, 2	[99,105]
Nigéria	1964-1968, 1972-1975, 2008, 2014	1, 2, 3, 4	[106,107]
Ghana	1932, 1987, 1993, 2002- 2005, 2016-2017	2	[101,108]
Cap vert	2009	3	[101]
Mali	2006	2	[109]
Sénégal	1927, 1928, 2007, 2009	1, 2, 3, 4	[99,101]
Togo	1987, 1993, 1999, 2002	-	[101]
Bénin	1987, 1993,2006	-	[99,101]

Une transmission sylvatique due au sérotype 2 a été rapportée au Sénégal et au Burkina Faso avec la notification de cas sporadiques. Les sérotypes 1 et 2 ont été rapportés comme étant responsables de la majorité des épidémies sur le continent [13] (Figure 6). Cependant à partir des années 2000, le sérotype 3 a également été détecté en Afrique de l'Ouest et notamment au Burkina Faso (en 2003, 2004, 2007 et 2014) et en Côte d'Ivoire en 2008, avant d'être responsable des épidémies survenues simultanément en 2009 au Sénégal [102,105]. Une étude de séroprévalence a montré une circulation de la dengue au Mali en 2006 [109]. Le sérotype 4, qui n'avait jamais été associé à une épidémie en Afrique, a été détecté pour la première fois en Angola et en 1980 au Sénégal [50,99]. Plus récemment en 2016, une épidémie de DENV 1, 2 et 3 avec des manifestations hémorragiques a été notifiée au Burkina Faso [103]. Environ 1300 cas avaient été rapportés [50]. La Côte d'Ivoire a également connu une épidémie de dengue en 2017 et le Ghana a enregistré des cas de dengue entre 2016 et 2017 [108].

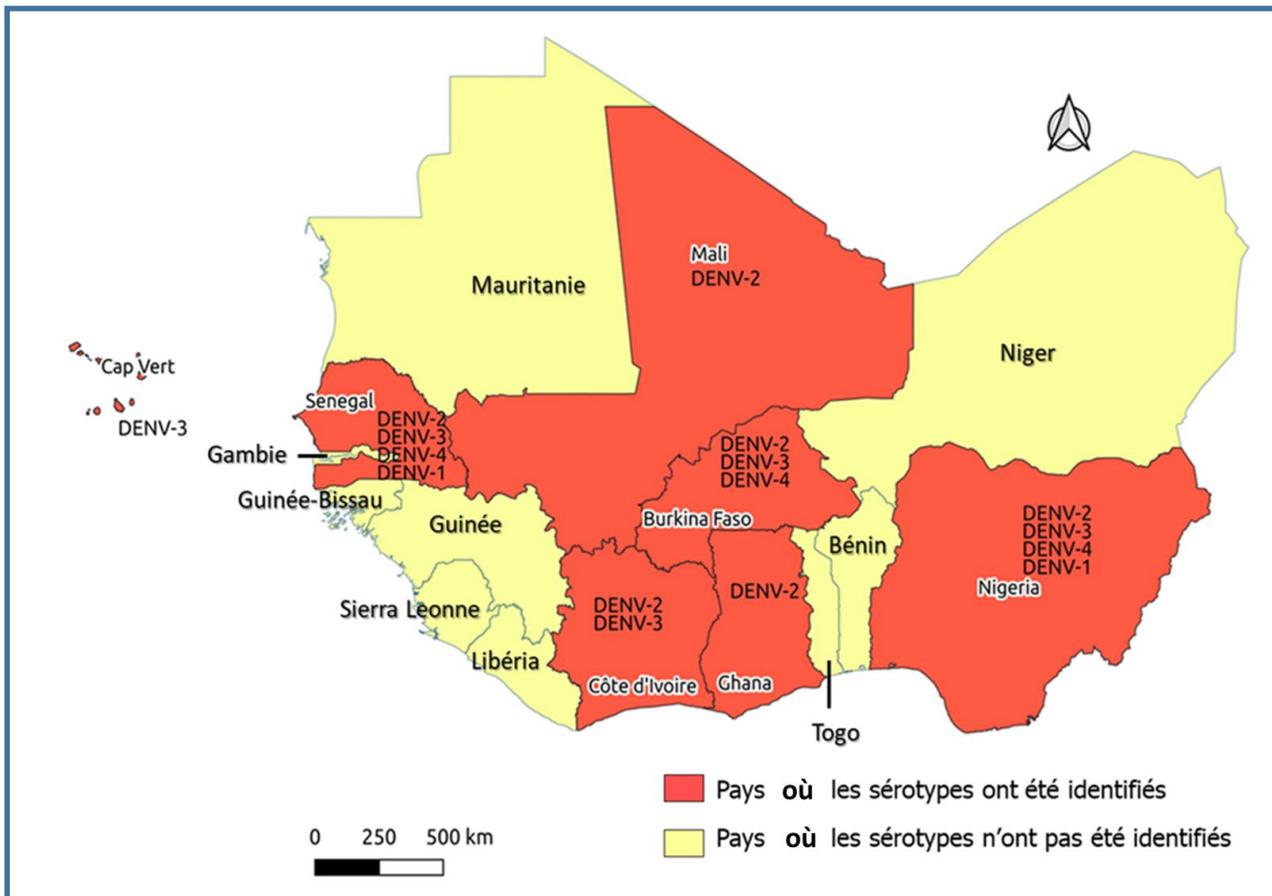


Figure 6 : Distribution des sérotypes de la dengue en Afrique de l'Ouest

La couleur orange représente les pays Ouest africains ayant identifié les sérotypes de dengue circulant ; la couleur jaune représente les pays pour lesquels les sérotypes de dengue n'ont pas été identifiés.

1.2 Virologie

Le virus de la Dengue (*Dengue virus*, DENV) appartient à la famille des *Flaviviridae*, et au genre *Flavivirus*. Il existe quatre sérotypes du virus: DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4. Les sérotypes sont antigéniquement similaires, bien que suffisamment différents pour ne pas conférer une protection croisée à long terme. C'est un virus enveloppé d'un diamètre d'environ 50 nm dont le génome est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 10

700 nucléotides (Figure 7). Le génome code pour 3 protéines structurales formant les composants du virion et 7 protéines non structurales (NS) impliquées dans la réplication de l'ARN viral [111]. Les 3 protéines structurales sont des composants de la particule virale mature et regroupent la protéine membranaire (prM/M), de la protéine d'enveloppe (E) et de la protéine de capsid (C). La glycoprotéine E est impliquée dans la liaison du virus aux récepteurs cellulaires, dans l'hémagglutination des érythrocytes et dans l'induction de la réponse immunitaire de l'hôte viral [111]. Les protéines NS quant à elles sont uniquement exprimées dans la cellule infectée et sont impliquées notamment dans le contrôle de la réplication virale. On retrouve ainsi les protéines NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 [111]. NS1 et NS4B sont associées à la pathogénicité de la dengue. Il existe une corrélation entre la concentration plasmatique de la protéine NS1 et la sévérité clinique de la maladie [112]. Cette protéine virale est décrite comme pouvant interagir avec le système immunitaire de l'hôte et moduler les réponses des lymphocytes T, pouvant être utilisés comme marqueurs diagnostiques de l'infection [24].

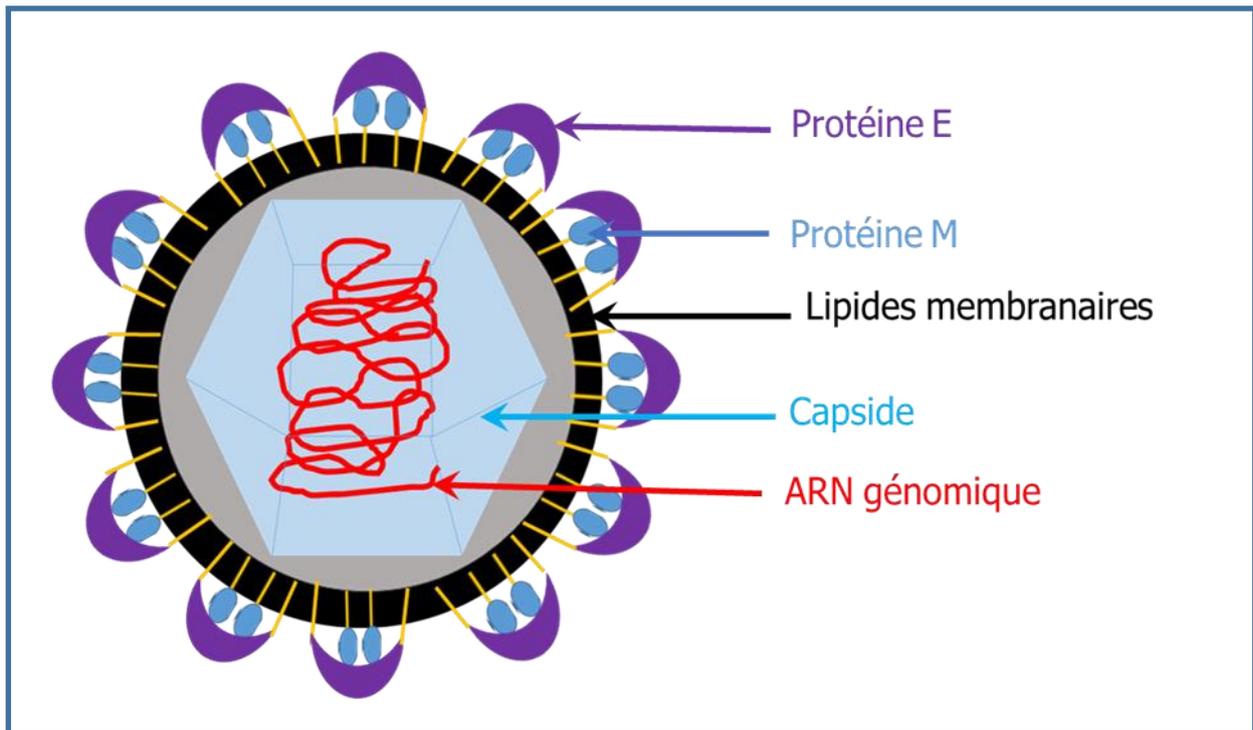


Figure 7 : Structure du virus de la dengue

Figure représentant la structure de la dengue où on peut apercevoir l'ARN génomique entouré de la capside, les protéines structurales M et E et les lipides membranaires.

1.3 Modes de transmission

La dengue est transmise par la piqûre des moustiques du genre *Aedes*, principalement *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* [114]. *Aedes aegypti* est originaire d'Afrique [101] et est présent au Burkina Faso. La transmission de la dengue se fait selon deux cycles: un cycle sylvatique au cours duquel le virus circule entre les primates non humains et les moustiques du genre *Aedes* (*Aedes luteocephalus* et *Aedes furcifer*) et un cycle urbain pour lequel le virus circule entre les humains et les moustiques urbains du genre *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*) [114] (Figure 8). Les moustiques de type *Aedes* ont une activité diurne c'est-à-dire qu'ils prennent leur repas sanguin principalement pendant la journée. Le virus se réplique chez le moustique qui s'infecte à la suite d'un repas sanguin sur des hôtes vertébrés ayant une virémie élevée [88].

La période habituelle de virémie chez l'Homme est d'environ cinq jours [88]. Le virus, une fois chez le moustique, migre du tractus intestinal jusqu'aux glandes salivaires : ce processus appelé phase extrinsèque dure environ 10 jours et peut être accéléré lorsque la température ambiante est élevée [88]. Après cette période d'incubation, le moustique peut infecter l'Homme lors d'un repas sanguin via l'injection de salive chargée de particules virales infectieuses [88].

Bien que le mode de transmission privilégié de la dengue soit par piqûre de moustique, plusieurs autres modes de transmission non vectorielle ont été rapportés. Ainsi, des cas de transmission par transfusion sanguine [115], par accident d'exposition aux liquides biologiques chez les personnels de santé ou transmission nosocomiale [116] et de transmission mère-enfant (transmission verticale) [117], en particulier par l'allaitement maternel [118], ont été notifiés.

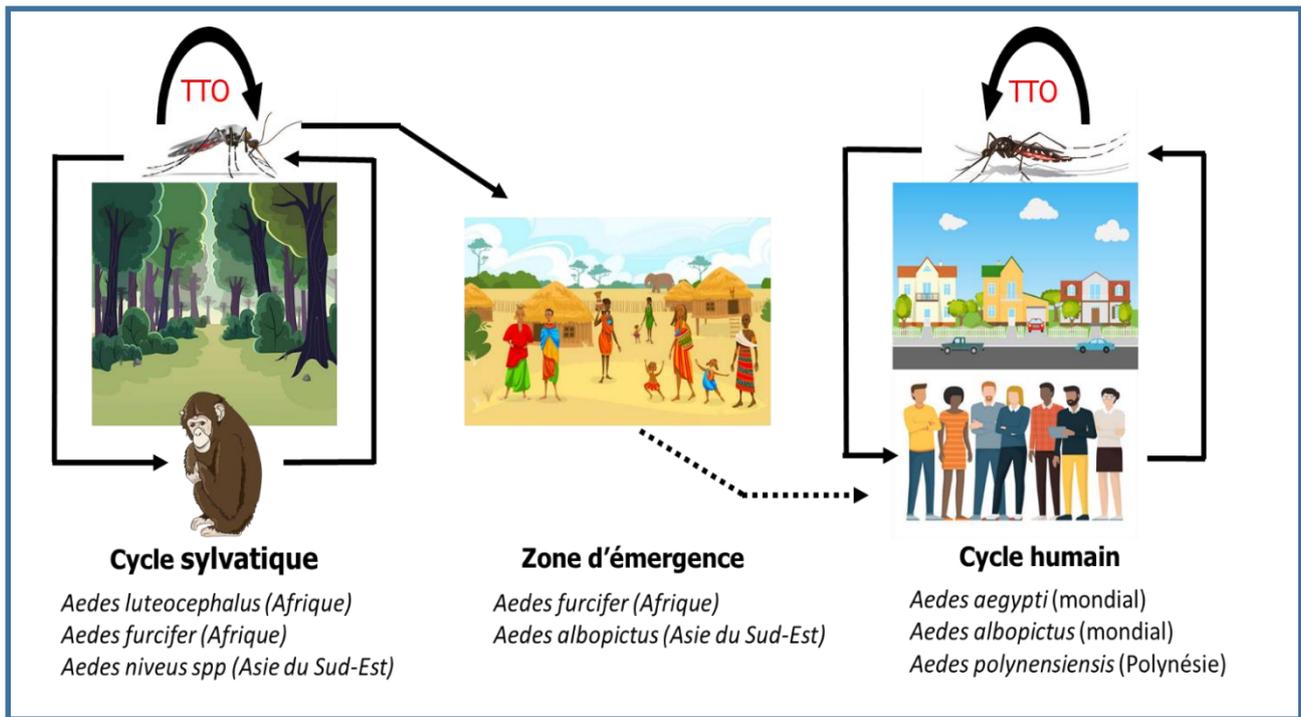


Figure 8 : Cycles de transmission du virus de la dengue

i) Le cycle sylvatique se produit en zone forestière et implique les primates et les moustiques sauvages du genre Aedes ; ii) Zone d'émergence constituée par les habitations à proximité de ces forêts où le virus circule entre les humains et les moustiques du genre Aedes ; iii) Cycle urbain impliquant les humains et les moustiques urbains du genre Aedes ; iv) Transmission transovarienne (TTO) chez le moustique.

1.4 Manifestations cliniques

La période d'incubation de la dengue varie d'une personne à l'autre et est fonction de l'immunité de l'hôte [119]. Elle est de quatre à sept jours pouvant atteindre onze jours chez les personnes partiellement immunisées [119]. En fonction du tableau clinique, l'OMS (Organisation mondiale de la santé) classe la dengue dans deux catégories : la dengue avec ou sans signe d'alerte et la dengue sévère. Après infection, le virus va infecter les cellules dendritiques immatures de la peau par l'intermédiaire des récepteurs non spécifiques tels que

DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*). Après maturation, les cellules dendritiques infectées vont migrer vers les ganglions lymphatiques où les antigènes viraux seront reconnus par les cellules T, déclenchant ainsi les réponses immunitaires cellulaires et humorales [88]. Certaines études ont montré également une réplication importante du virus de la dengue dans les cellules parenchymateuses du foie et dans les macrophages des ganglions lymphatiques du foie et de la rate.

Il existe une diversité génétique importante au sein des différents sérotypes de dengue dont certains sont le plus souvent associés à des formes graves de dengue. Certaines études tendent à montrer que le sérotype 2 serait plus susceptible à provoquer des cas graves [120]. Par ailleurs, une infection séquentielle par différents sérotypes de virus de la dengue augmenterait le risque de complications pouvant entraîner un syndrome de choc (diminution aiguë du volume intravasculaire résultant de la fuite plasmatique ou sanguine) et le décès [83]. Ce phénomène dépendant du processus de facilitation de l'infection par des anticorps préexistants, en anglais ADE (*Antibody-Dependant Enhancement*), stipule que les anticorps, produits par les lymphocytes B mémoires réactivés, ne peuvent pas neutraliser un sérotype viral différent lors d'une infection ultérieure [121]. Ces anticorps formeraient alors des complexes avec les particules virales qui favoriseraient l'infection des cellules du complexe monocyte/macrophage. On observe alors une réplication virale plus importante qui peut entraîner une aggravation de la maladie. Aussi, l'infection des éléments du complexe monocyte/macrophage entraîne une expression d'antigènes viraux et une augmentation des lymphocytes T mémoire à réactivité croisée [122]. Ces lymphocytes produits lors d'une primo infection se multiplient massivement lors d'une seconde infection et sécrètent en abondance de nombreuses cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN γ (interféron gamma) et le TNF α (facteur de nécrose tumorale alpha), ce qui serait à l'origine de la perméabilité capillaire observée lors de la maladie [121]. En effet, en réponse à l'infection, les cellules mononucléaires

vont produire et sécréter des médiateurs vasoactifs qui vont entraîner une augmentation de la perméabilité vasculaire provoquant ainsi un syndrome de perméabilité vasculaire aiguë [123]. La sévérité de ce syndrome est fonction de l'âge et serait plus sévère chez les jeunes enfants [88]. Le mécanisme d'effet ADE a été également observé avec des patients ayant été exposé au virus Zika et ayant contracté la dengue par la suite [124].

La survenue des formes graves pourrait également être liée à des facteurs génétiques. Ainsi, les africains et les personnes d'ascendance africaine pourraient avoir une certaine résistance génétique à la dengue [125]. En effet pour tester l'effet ADE de la dengue, une étude a été réalisée sur deux types de cellules mononucléées périphériques du sang de personnes d'ascendance africaine et de personnes d'ascendance européenne : des cellules avec des anticorps anti-dengue 1 et des cellules sans anticorps anti-dengue. Les cellules ont été infectées par le sérotype 2 du virus de la dengue. Les résultats obtenus ont montré que le virus ne se réplique pas dans les cellules des personnes d'ascendance africaine avec ou sans anticorps anti-dengue 1 alors qu'on observe une augmentation frappante de la multiplication virale dans les cellules des personnes d'ascendance européenne qui avaient des anticorps anti-dengue 1 [125].

Bien que la majorité des cas de dengue soit asymptomatique ou bénin, certains patients peuvent présenter une large gamme de manifestations cliniques allant d'une simple fièvre à des formes graves voire mortelles [83]. La fièvre s'accompagne souvent d'autres symptômes tels que la myalgie, l'arthralgie, l'anorexie, des douleurs rétro-orbitaires, des nausées et vomissements, un mal de gorge, des céphalées, une éruption cutanée. Dans les formes graves, encore appelées dengues hémorragiques, les patients présentent une thrombocytopenie (nombre de plaquettes compris entre 50 000 et 100 000 mm^3), une fuite plasmatique marquée par une augmentation du taux d'hématocrite, un épanchement pleural avec une hypoalbuminémie ou une hypoprotéinémie, une augmentation de la perméabilité vasculaire pouvant entraîner des complications hémorragiques majeures ou mineures avec ou sans syndrome de choc.

On observe également chez certains patients des atteintes neurologiques. Les sérotypes 2 et 3 ont été identifiés comme ceux entraînant le plus de complications neurologiques [126]. Des antigènes viraux de la dengue ont été détectés dans le système nerveux central ainsi que dans le liquide céphalo-rachidien [126]. Certaines études ont rapporté des complications neurologiques à type de syndrome de Guillain Barré, de myélite, d'encéphalites et de méningites [126]. Par ailleurs une étude sur des modèles murins a montré que le virus de la dengue pouvait entraîner une rupture des jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalique et causer un œdème cérébral vasogénique. Ce phénomène qui semble se produire également chez l'homme est provoqué par une réponse immunitaire cytokinique induite par l'infection [127].

1.5 Diagnostic biologique du virus de la dengue

La réaction en chaîne par polymérase à transcription inverse (RT-PCR) et les tests immuno-enzymatiques de capture d'antigène (ELISA) ont progressivement remplacé l'isolement du virus qui était la méthode de diagnostic traditionnelle pour détecter une infection par le DENV [83].

L'algorithme diagnostic est basé sur la cinétique des marqueurs de l'infection (Figure 9). Au cours d'une infection primaire, le virus et la protéine NS1 peuvent apparaître très tôt au début de la maladie. Les IgM apparaissent autour du troisième jour de la maladie et les IgG vers la fin de la période aiguë c'est-à-dire environ sept jours après les premiers signes cliniques. Lors d'une infection secondaire, ce sont les IgG qui apparaissent au début de la phase aiguë de la maladie avec un délai plus court de détection de NS1 et du virus [83].

La technique de RT-PCR permet la détection de l'ARN viral dès le début de la maladie avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité.

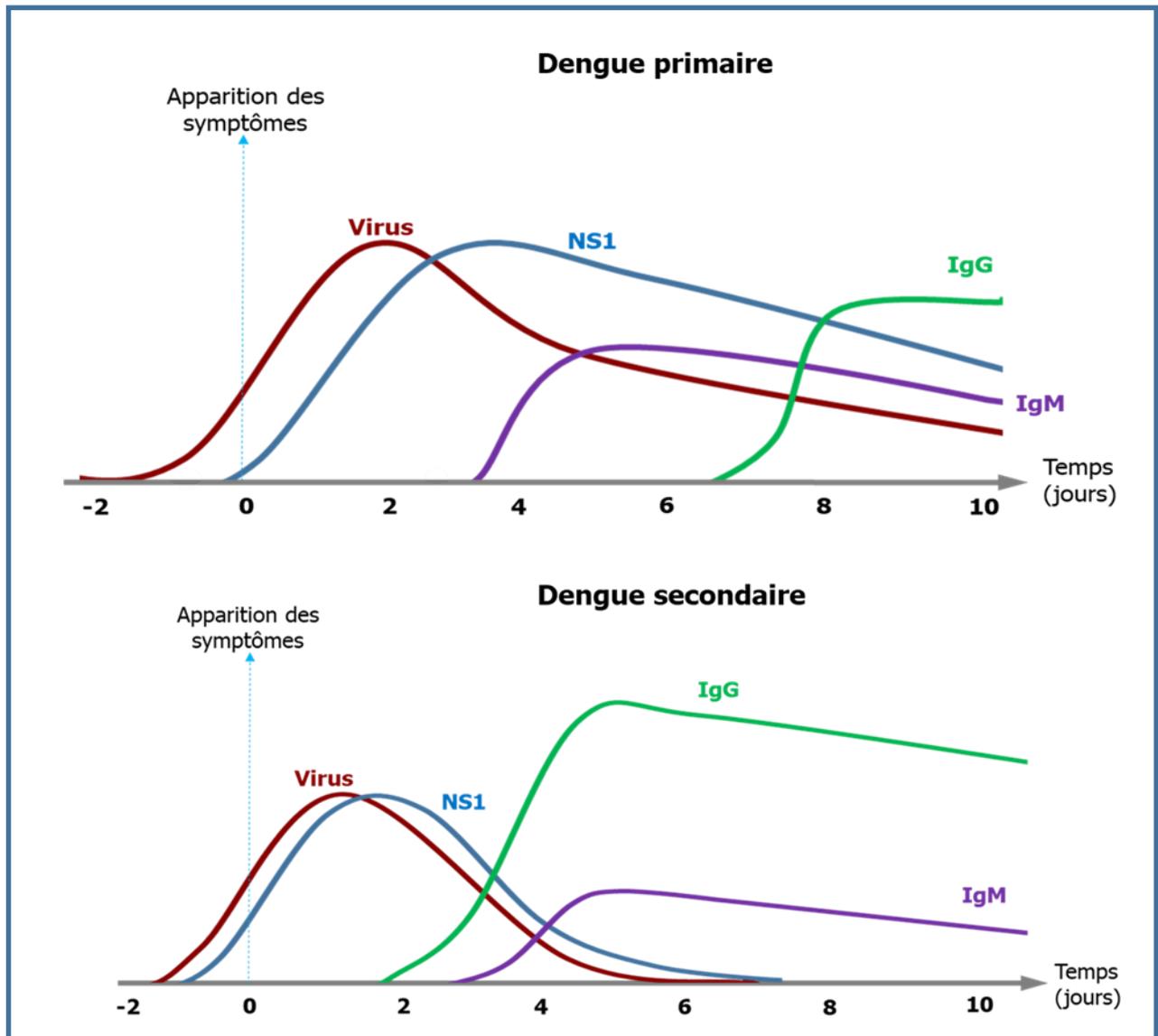


Figure 9 : Chronologie de l'apparition des biomarqueurs de la dengue chez les patients présentant une infection primaire et secondaire

Lors d'une infection primaire, l'ARN et la protéine NS1 apparaissent très tôt au début de la maladie suivit des IgM qui apparaissent autour du troisième jour de la maladie et enfin des IgG vers le septième jour ; lors d'une infection secondaire, les IgG apparaissent au début de la phase aiguë de la maladie avec un délai plus court de détection de NS1 et de l'ARN viral.

Il existe aussi des tests de diagnostic rapide homologués par l'OMS (SD Bioline de Abbott®) pour le diagnostic de la dengue qui pourraient être utilisés pour orienter les cliniciens dans la prise en charge clinique. Ces tests permettent de mettre en évidence la protéine NS1 et les Immunoglobulines M et G avec une spécificité de 98% et une sensibilité de 92%.

2. Le virus Zika

2.1 Epidémiologie

Le ZIKV a été identifié pour la première fois en 1947 chez un singe rhésus dans la forêt Zika en Uganda et le premier cas humain a été rapporté en 1954 au Nigéria [128]. Avec seulement 14 cas humains rapportés avant 2007 [129], le virus est aujourd'hui endémique dans toutes les régions tropicales du monde : Afrique, Amériques, Asie du Sud-Est et Asie du Sud-Est [130]. Entre 2007 et 2008 des épidémies ont été notifiées dans l'île de Yap en Micronésie, au Gabon et au Sénégal [131–133]. Les plus grosses épidémies de la maladie au virus Zika ont été celles survenues entre 2013 et 2016 en Polynésie française, en nouvelle Calédonie, en Colombie, au Cap Vert et au Brésil [134–138]. La Floride a déclaré 1471 cas de ZIKV entre 2016 et 2018 dont 299 chez des femmes enceintes [139]. Des cas autochtones de transmission du ZIKV ont été rapportés en France métropolitaine en 2019 [140].

En Afrique, plusieurs pays ont rapporté des preuves moléculaires ou sérologiques de la circulation du ZIKV chez les humains depuis son apparition [89]. La majorité des cas concerne les anticorps (Figure 10). La circulation du virus ZIKV n'a jamais été clairement établie au Burkina Faso malgré la surveillance des arboviroses mise en place depuis 2016 [141]. Une enquête sérologique en population générale réalisée de 1963 à 1964 avait montré une preuve sérologique de la circulation du virus ZIKV en république de Haute-Volta actuelle Burkina Faso [142].

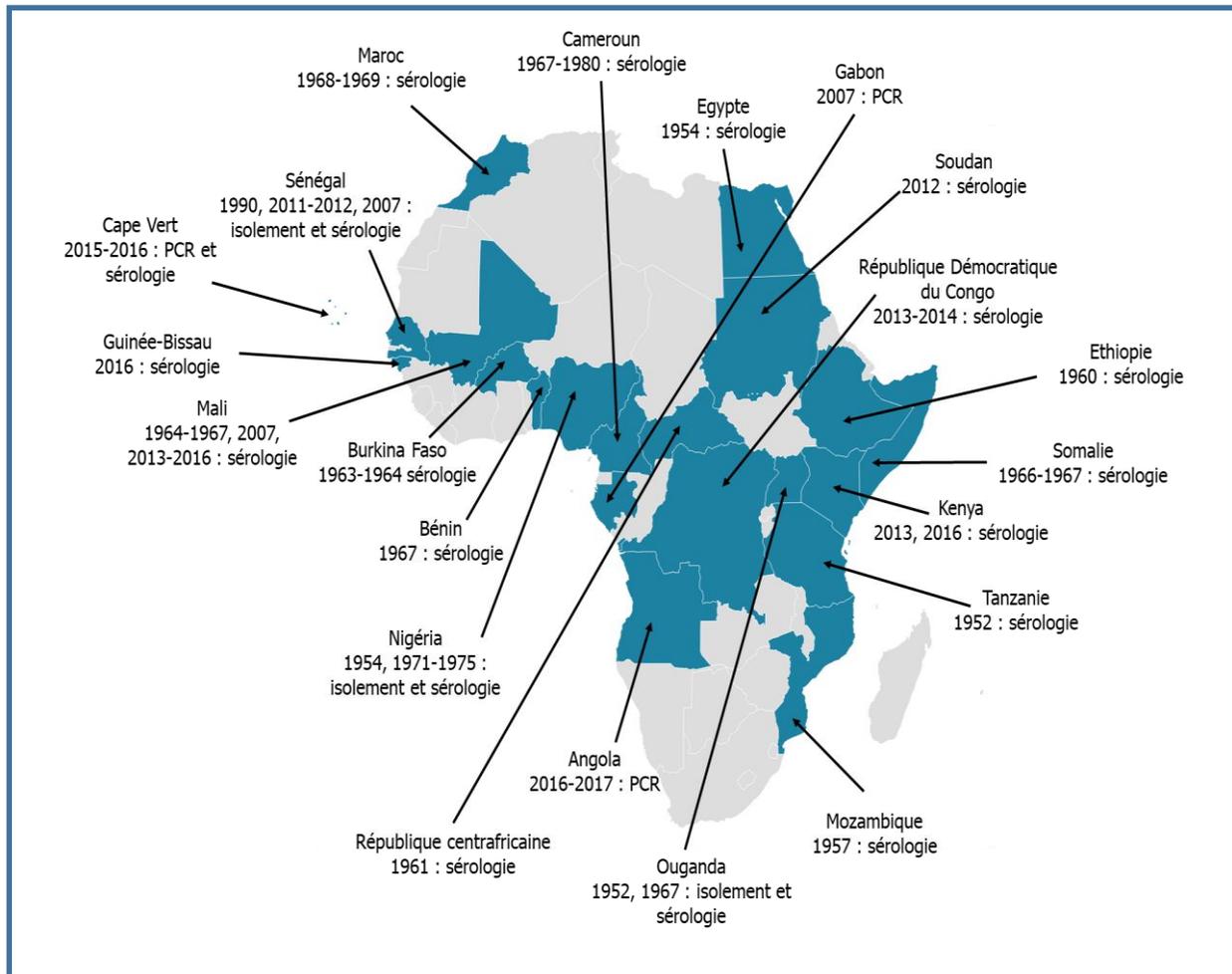


Figure 10 : Distribution géographique du virus Zika en Afrique

La couleur vert foncé représente les pays africains dans lesquels des preuves moléculaires ou sérologiques de la circulation du virus Zika chez les humains ont été rapportées

2.2 Virologie

Le virus Zika (ZIKV) est un virus enveloppé à ARN monocaténaire de polarité positive d'environ 50 nm de diamètre appartenant à la famille des *Flaviviridea* au genre *Flavivirus*. Comme le DENV, son génome d'environ 10,8 kilobases a un seul cadre de lecture (ORF) et code pour 3 protéines structurales (protéine de capsid C, protéine de pré membrane prM et protéine de l'enveloppe E) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) [143]. Les protéines structurales participent à la formation de la particule virale.

La protéine C forme la capsid; la protéine prM est un précurseur de la protéine M qui est intégrée dans la membrane virale ; la protéine E forme l'enveloppe et participe également au cycle viral en favorisant la fixation et la fusion du virus aux cellules de l'hôte. Les protéines non structurales jouent un rôle dans la réplication et à l'encapsidation du génome viral ; elles s'associent aux membranes cellulaires du réticulum endoplasmique où elles forment un complexe de réplication dans lequel la protéine NS5 assure la réplication de l'ARN viral par son activité ARN-polymérase ARN dépendante [144].

Il existe deux lignées du ZIKV : une lignée asiatique et une lignée africaine [145]. Même si la totalité des épidémies rapportées a été associée à la souche asiatique [146], plusieurs études tendent à montrer que la lignée africaine serait dans certaines conditions plus virulente que la lignée Asiatique et incite donc également à la vigilance concernant la circulation de cette lignée [147–150].

2.3 Modes de transmission

Il existe deux principales modes de transmission pour le ZIKV : la transmission vectorielle et la transmission non vectorielle (transmission par transfusion sanguine, par accident d'exposition aux liquides biologiques chez les personnels de santé ou transmission nosocomiale, transmission mère-enfant et transmission sexuelle). Le mode de transmission vectorielle reste cependant le principal mode de transmission.

– Transmission vectorielle

Le virus Zika se transmet à l'homme par la piqûre d'un moustique de genre *Aedes* principalement *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* [151,152]. Le cycle sylvatique est maintenu par les moustiques du genre *Aedes* (*Aedes africanus*, *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*) et les primates non humains. Le cycle urbain est assuré par les moustiques urbains du genre *Aedes* (*Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*) et les humains (Figure 11). L'homme peut servir d'hôte

occasionnel pendant le cycle sylvatique mais aussi d'hôte primaire dans les zones où il n'y a pas de primates non humains. Les anticorps du ZIKV ont été identifiés chez certains mammifères dont certains rongeurs mais leur rôle de réservoir n'a pas été démontré [153].

– **Transmission non vectorielle**

❖ **Transmission par transfusion sanguine**

Des cas probables de transmission du ZIKV par transfusion de plaquettes ont été rapportés au Brésil même si la possible transmission vectorielle n'a pas été complètement exclue [154,155]. Pendant l'épidémie de ZIKV survenue en Polynésie française entre 2013 et 2014, l'ARN viral a été détecté par RT-PCR chez 2,8% (42/1505) des donneurs de sang asymptomatiques [156]. Par ailleurs de l'ARN viral a été détecté chez des donneurs de sang aux USA et à Porto Rico [157,158].

❖ **Transmission par accident d'exposition aux liquides biologiques**

La première suspicion de transmission du ZIKV par accident d'exposition au sang date de 1963 chez une personne travaillant dans un laboratoire en Ouganda [159]. L'hypothèse de ce mode de transmission a été confirmée quelques années plus tard lorsque le ZIKV a été isolé en 1973 chez une personne travaillant dans un laboratoire sur les arbovirus [160]. Trois autres cas d'infections par le ZIKV acquises au laboratoire ont été rapportés en 1980 par « l'American committee on arthropod-borne viruses » [161]. Plus récemment quatre cas de transmission du ZIKV liée aux activités de laboratoire ont été identifiés aux USA entre 2016 et 2019 [162]. Parmi ces quatre cas, deux étaient associés à des blessures par piqûre d'aiguille infectée et pour les deux autres cas, la voie de contamination n'a pas pu être clairement déterminée.

❖ **Transmission par voie sexuelle**

Une probable transmission par voie sexuelle avec le ZIKV a été rapportée en 2008 aux USA [163]. Il s'agissait d'un scientifique américain qui avait séjourné au Sénégal et qui a

probablement transmis le ZIKV à son épouse. En effet, six jours après son retour du Sénégal il a développé des symptômes faisant penser à la maladie ZIKV. Quatre jours plus tard, son épouse avec qui, il a eu des relations sexuelles développait des symptômes similaires alors qu'elle n'avait pas voyagé à l'étranger l'année précédente. Les résultats des tests sérologiques réalisés chez les deux patients étaient positifs au ZIKV. Les tests moléculaires pour la détection de l'ARN viral et les tests d'isolement du virus ont été cependant négatifs.

L'analyse du sperme d'un patient présentant une hémospérmié pendant l'épidémie de ZIKV survenue en Polynésie française en 2013, avait permis l'isolement du virus par culture et la détection d'une charge virale élevée dans le sperme [164].

Même si la plupart des cas de transmission par voie sexuelle s'effectue d'un homme symptomatique à une femme, des cas de transmission sexuelle d'homme asymptomatique à une femme, d'homme à homme, de femme à homme ont été également documentés [165–167]. De nombreuses études rapportent que le ZIKV est détectable dans le sperme par PCR ou par culture virale jusqu'à 24 jours à 69 jours après le début de la maladie [168–170]. Le plus long temps de persistance du virus dans le sperme était de 188 jours après le début de la maladie [171].

L'Organisation mondiale de la santé (OMS) et le Centre pour le contrôle et la prévention des maladies (CDC) recommandent aux hommes infectés par le ZIKV qu'ils soient symptomatiques ou non, de se protéger pendant les rapports sexuels jusqu'à 6 mois après le début de l'infection [172].

❖ **Transmission mère-enfant (transmission verticale)**

L'ARN viral du ZIKV a été détecté dans des tissus cérébraux des fœtus avortés et dans le placenta avec un nombre accru d'anomalies neuro développementales néonatales confirmant ainsi la transmission verticale du ZIKV [173,174]. La transmission du ZIKV de la mère infectée au fœtus a des effets néfastes sur le fœtus tels que la microcéphalie et des anomalies oculaires

et squelettiques [175,176]. L'infection pendant la grossesse peut également entraîner des dysfonctionnements placentaires pouvant aboutir à des fausses couches [177]. Une étude réalisée au Brésil rapporte 7% de mort fœtale dans les grossesses où les femmes étaient infectées par le ZIKV [178].

Le risque probable de transmission verticale du ZIKV varie en fonction de l'âge de la grossesse [179]. Ce risque est estimé à 47 % lorsque l'infection de la mère survient au premier trimestre de la grossesse, 28 % au deuxième trimestre et 25 % au troisième trimestre [179].

❖ **Autres modes de transmission potentiels**

Bien qu'il n'existe pas de preuves absolues de transmissions du ZIKV par l'allaitement maternel, une étude a montré la présence de particules virales infectieuses dans le lait maternel [180]. En effet, l'ARN du ZIKV a été détecté dans le lait maternel de neuf femmes allaitantes parmi lesquelles trois présentaient des particules virales infectieuses à la culture [180–183]. Deux nourrissons de deux mères chez qui la culture n'a pas montré de particules infectieuses présentaient des signes d'infection au ZIKV. Au final les données étaient insuffisantes pour conclure à une transmission du ZIKV par allaitement maternel [184]. Sur cette question, l'OMS suggère que les avantages de l'allaitement maternel priment sur les risques de transmission du ZIKV par cette voie [184].

L'ARN du ZIKV a été également identifié dans d'autres fluides corporels tels que les urines, la salive, le liquide amniotique, le liquide céphalo-rachidien, l'humeur aqueuse, le liquide conjonctival et les prélèvements nasopharyngés [185–188]. Cependant il n'existe pas de preuves de transmission du virus via ces fluides.

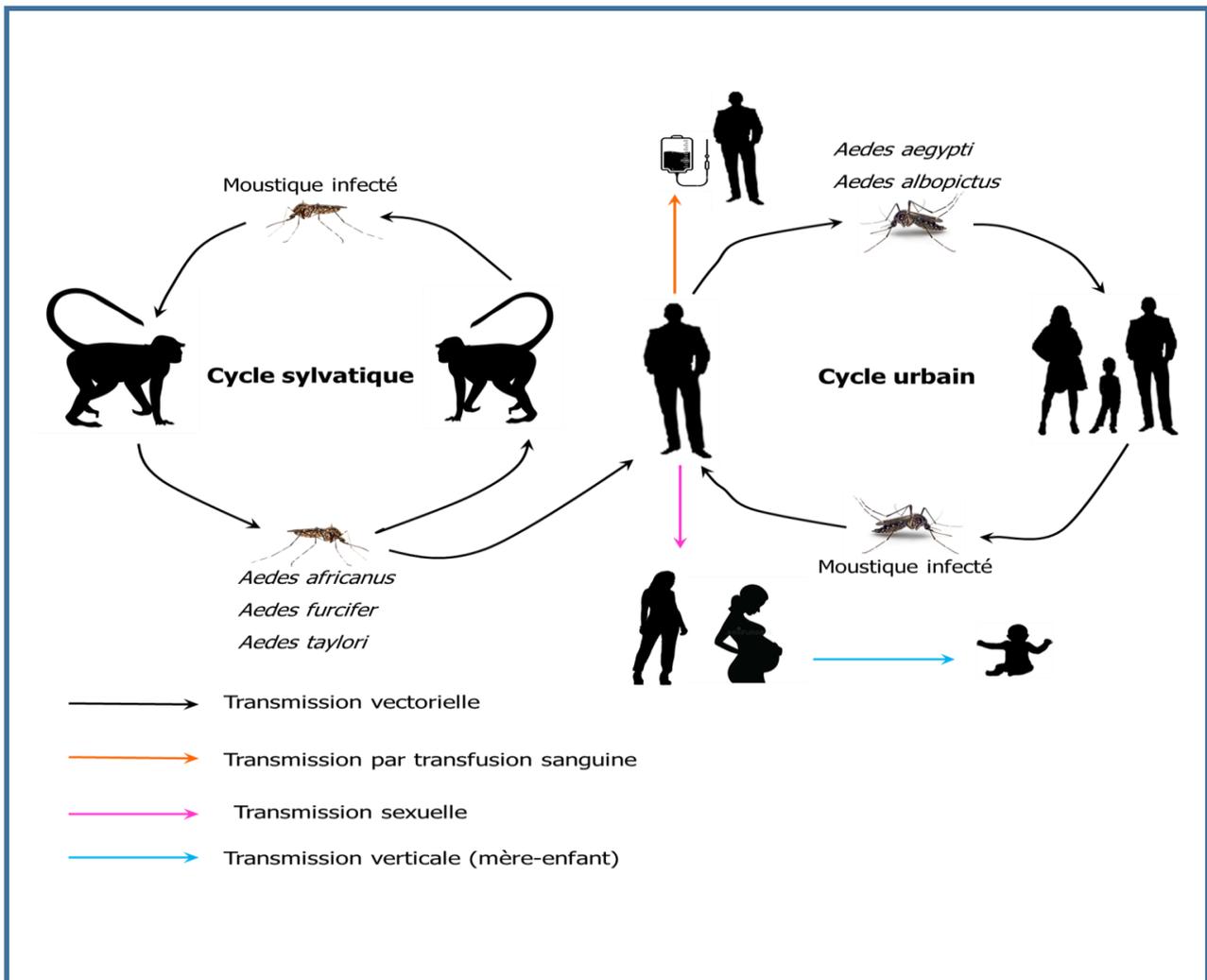


Figure 11 : Cycle de transmission du virus Zika

i) Le cycle sylvatique se produit en zone forestière où le virus circule entre les primates non humains et les moustiques sauvages du genre Aedes ; ii) les humains qui vivent à proximité des forêts peuvent se faire piquer par les moustiques sauvages du genre Aedes ; iii) le cycle urbain se produit en zone urbaine et implique les humains et les moustiques urbains du genre Aedes ; iv) Transmission non vectorielle chez l'homme (transfusion sanguine, relation sexuelle et transmission mère-enfant).

2.4 Manifestations cliniques

La majorité des patients sont asymptomatiques [189]. Le tableau clinique de l'infection par le virus Zika a été correctement établi après les épidémies survenues à Yap et en Polynésie

française. Pendant ces épidémies, les symptômes les plus courants étaient la fièvre, les éruptions cutanées, l'arthralgie et la conjonctivite [131]. Le même tableau clinique a été observé pendant les épidémies de Polynésie française et du Brésil [146,190]. Au cours de ces dernières épidémies, de nombreux cas de complication de type de syndrome de Guillain-Barre et de microcéphalies chez les enfants nés de mères infectées ainsi que d'autres syndromes neurologiques ont été observés [191]. Le Brésil est le pays qui a été le plus touché par le virus Zika avec l'épidémie de 2015/2016 avec plus de 128 000 cas confirmés au cours de laquelle plus de 5400 cas ont été notifiés avec la mention de complications neurologiques [134,192]. La microcéphalie qui est une réduction du périmètre crânien est provoquée par une infection par le ZIKV des cellules souches neurales pendant le premier trimestre de la grossesse [193–195]. Certains enfant sont nés normaux mais ont connus un ralentissement de la croissance de la tête développant ainsi une microcéphalie post naissance [196]. Par ailleurs chez certains enfants des problèmes cognitifs durant leur développement ont été signalés [197].

L'OMS déclarera plus tard en 2016 l'infection par le virus Zika comme étant une urgence de santé publique de portée internationale [198].

2.5 Diagnostic biologique du virus Zika

L'OMS a établi trois définitions de cas pour l'infection au ZIKV [145] :

- Cas suspect : tout patient présentant une éruption cutanée et au moins deux des signes suivants : fièvre, conjonctivite, arthralgie, myalgie et ou œdème péri articulaire.
- Cas probable : tout patient qui répond aux critères d'un cas suspect avec des anticorps IgM Zika, sans preuve d'infection par d'autres Flavivirus.
- Cas confirmé : tout patient qui répond aux critères d'un cas suspect chez qui le laboratoire a confirmé une infection récente par le virus Zika.

Ces tests de confirmations au laboratoire concernent la détection de l'ARN viral dans le sang total, le sérum, les urines, la salive et les tissus ou la détection des anticorps neutralisants par séroneutralisation ou la détection du génome viral dans les échantillons d'autopsie [145].

Le choix du test à réaliser dépend du stade de l'infection au ZIKV (Figure 12) [152].

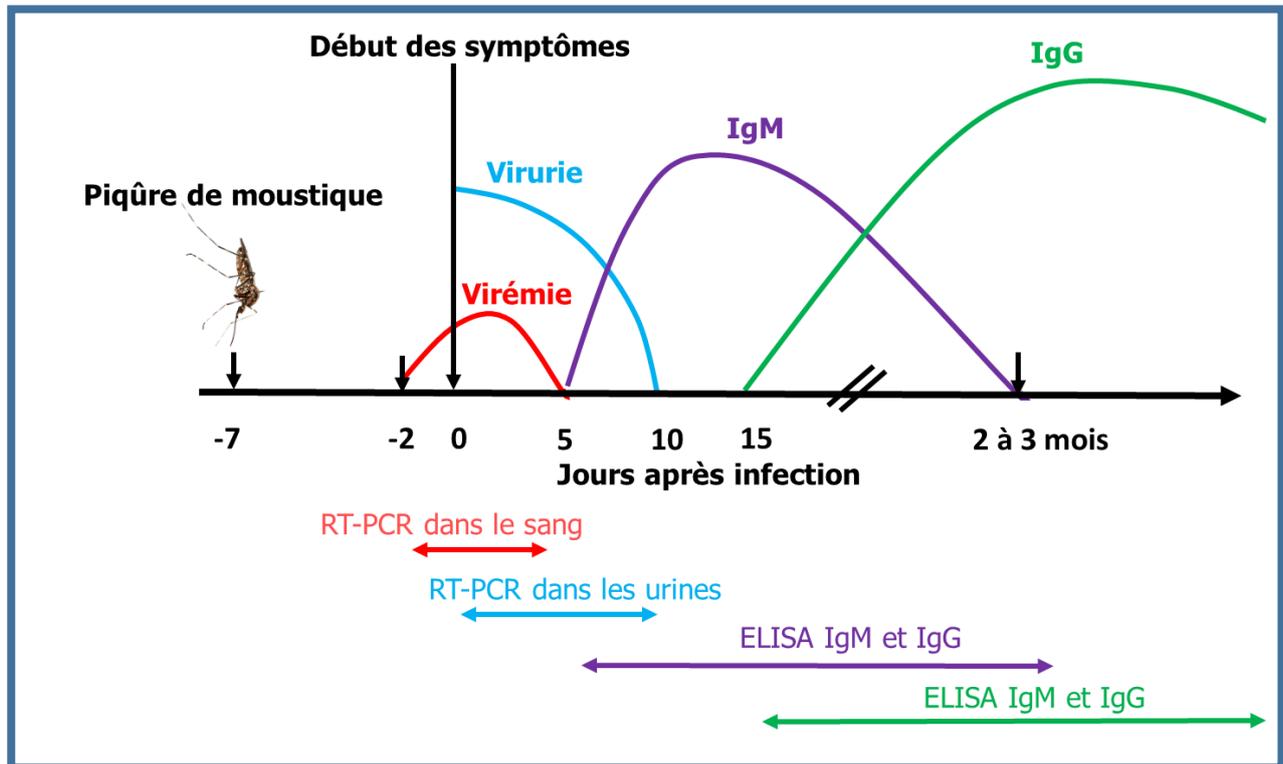


Figure 12 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques au cours d'une infection par le virus Zika.

L'ARN viral est présent dans le sang jusqu'à environ 5 jours après le début des symptômes ; il persiste dans les urines jusqu'à une dizaine de jours après le début des symptômes ; les IgM apparaissent autour du cinquième jour après l'exposition au virus et les IgG apparaissent plus tardivement autour du quinzième jour.

Pendant la phase aiguë de la maladie, c'est la RT-PCR qui est la technique la plus utilisée en raison de sa spécificité et de sa capacité à différencier le ZIKV des autres infections à

Flavivirus [199]. Les techniques de PCR utilisées ciblent les gènes de la protéine NS5 et la protéine de l'enveloppe du ZIKV c'est à dire les régions codant pour la protéine prM/E [164,200]. Ces gènes ont des caractéristiques uniques qui permettent de les différencier des autres Flavivirus. L'utilisation des sondes TaqMan augmenterait la spécificité des tests PCR [201]. Le sang et de sérum sont les échantillons les plus utilisés pour la PCR ; cependant la faible virémie observée chez l'homme lors de l'infection au ZIKV réduit la sensibilité des tests [199,202]. Certaines études ont montré que l'ARN du ZIKV était détectable sur une plus longue durée dans les prélèvements d'urine (virurie plus longue) et de sperme des patients et que l'ARN était plus facilement détectable dans la salive des personnes infectées que dans les prélèvements sanguins [164,203]. L'utilisation des trois types de prélèvement (sang, salive et urines) dans la réalisation des tests PCR augmenterait ainsi la sensibilité des tests surtout dans les situations où le prélèvement est réalisé tardivement au cours de l'infection [203,204]. Aussi, l'utilisation des échantillons de salive et d'urine pourraient être une bonne alternative pour le diagnostic du ZIKV chez les nouveau-nés et les nourrissons [201].

Les tests sérologiques permettent la détection des anticorps IgM et IgG spécifique du ZIKV [205]. Les anticorps IgM sont détectables quelques jours après l'apparition des symptômes et peuvent durer jusqu'à 3 mois après l'apparition des premiers symptômes. Les anticorps IgG sont détectables après l'apparition des IgM et peuvent durer quelques mois à plusieurs années. Le test sérologique le plus utilisé est le test ELISA. Des tests Elisa maison et commerciaux ont été développés.

3. Le virus Usutu

3.1 Epidémiologie

Le virus Usutu a été isolé pour la première fois en 1959 chez un moustique *Culex neavei* collecté près de la rivière Usutu au Swaziland [59]. Il a longtemps été considéré comme un virus d'intérêt africain avant son introduction en Europe en 2001 [206,207]. Depuis sa découverte, le virus a été par la suite isolé dans plusieurs pays Africains tels que le Sénégal, la République Centrafricaine, le Burkina Faso, la Côte d'Ivoire, le Nigéria, le Kenya, l'Afrique du sud et l'Ouganda [206,208] (Figure 13). Les anticorps du virus ont été identifiés chez des oiseaux sauvages au Maroc, au Mali et à Madagascar [209,210] et chez des chevaux en Tunisie [211]. Au Sénégal, le virus a été isolé chez plusieurs espèces de moustique notamment *Culex neavei*, *Culex perfuscus* et *Aedes minutus* et récemment chez des rongeurs [206,212]. Les anticorps contre l'USUV a été récemment détecté chez des chauve-souris au Cameroun, en Guinée et en République démocratique du Congo [60]. L'étude a concerné des échantillons collectés entre 2016 et 2019.

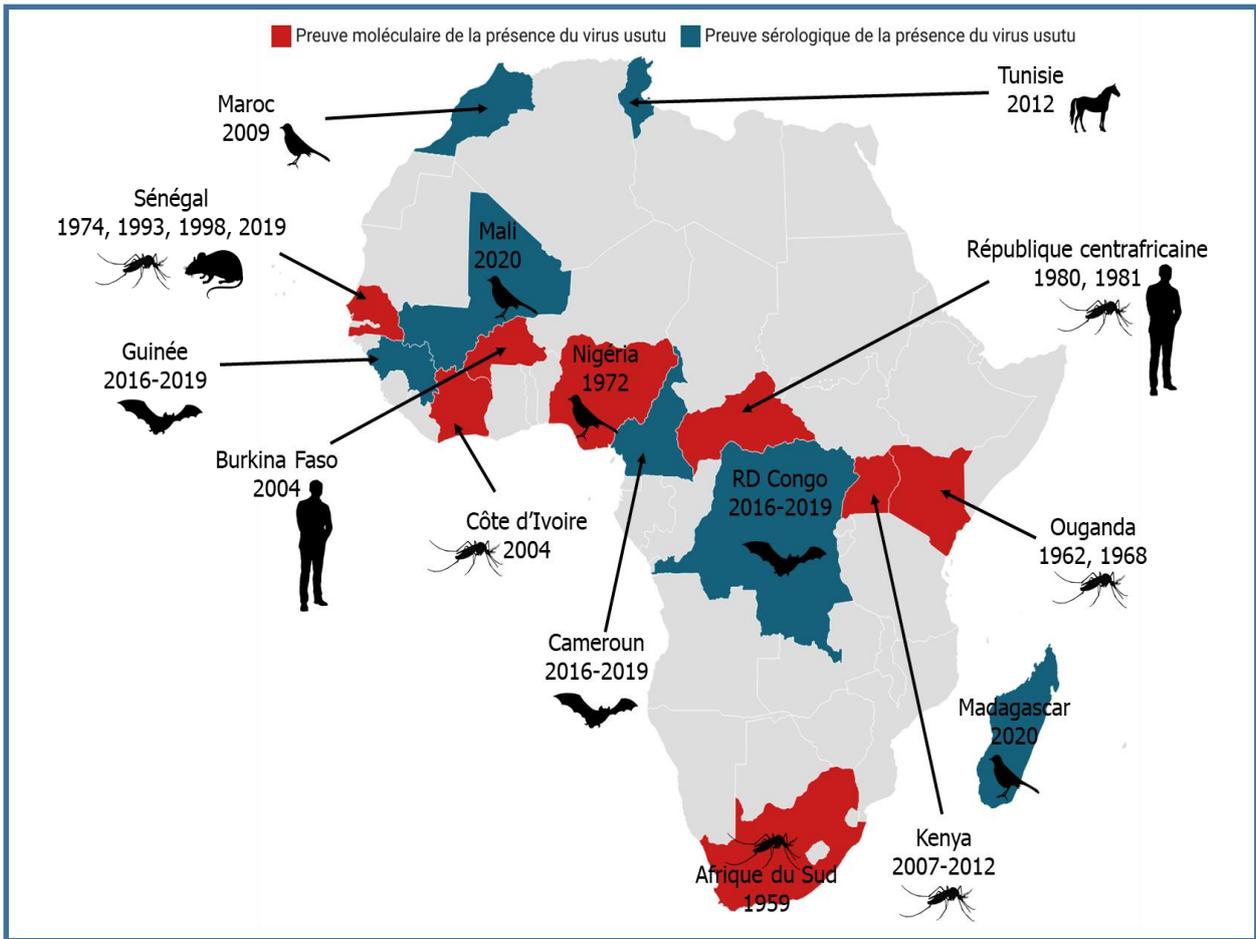


Figure 13 : Distribution géographique du virus Usutu en Afrique

La carte représente les pays africains ayant déjà notifiés la présence de l'USUV chez les humains, les oiseaux, les rongeurs, les chauves-souris ou les moustiques : en rouge nous avons les pays ayant rapporté des preuves moléculaires de la présence du virus et en vert, les pays ayant rapporté des preuves sérologiques.

Même si la propagation du USUV en Europe a été confirmée en 2001, une étude rétrospective effectuée sur des échantillons d'oiseaux en Italie suggère que le virus circulait en Europe depuis les années 1990 [213]. La première grande épidémie du USUV en Europe est survenue en 2001 chez plusieurs espèces d'oiseaux en Autriche [214]. Depuis lors plusieurs pays Européens ont identifié des cas chez des moustiques, des oiseaux, des mammifères et des humains (Tableau

IV). Les premiers cas humains d'USUV en Europe ont été signalés en 2009 chez des patients immunodéprimés en Italie [215,216]. Le virus et/ou les anticorps du virus ont été isolés en Autriche (2001, 2016, 2017, 2018 et 2021) [214,217–222], en Belgique (2012, 2016 et 2017) [223–225], en Croatie (2011, 2012, 2016, 2017, 2018 et 2019) [226–230], en République Tchèque (2004 et 2013) [231,232], en France (2015 et 2016) [14,233,234], en Allemagne (2010, 2011, 2012, 2013 et 2015) [235–239], en Hongrie (2005, 2017 et 2018) [221,240,241], en Italie (1996, 2008, 2009-2014) [213,215,216,242–244], au Pays Bas (2016) [245], en Serbie (2009, 2012, 2014 et 2015) [246–248], en Espagne (2006, 2011 et 2012) [249–253] et en suisse (2006, 2008) [254]. Les anticorps du virus ont été identifiés en Grèce (2010) [255], en Pologne (2006 et 2012) [256,257], en Slovaquie (2010) [258,259] et au Royaume Unie (2011) [260].

L'USUV comprend huit lignées : trois lignées africaines (Africa 1 à 3) et cinq lignées européennes (Europe 1 à 5) [261]. Les trois lignées africaines circulent en Afrique mais aussi en Europe. Le cas humain rapportée en République centre africaine était dû à la lignée Africa 3 ; il a été également isolé dans certains pays européens dont la France [261,262].

Les lignées européennes circulent principalement en Europe (République Tchèque, Italie, Allemagne, Belgique et France). Parmi elles, c'est la lignée Europe 2 qui circule le plus et est identifiée comme étant le plus souvent associé à des complications neurologiques[262].

Tableau IV : Situation épidémiologique du virus USUV en Europe

Pays	Année	Espèce	Test de diagnostic
Allemagne	2012	Homme	Moléculaire
	2011	Oiseau	Moléculaire
	2010	Moustique	Moléculaire
	2013	Chauve-souris	Moléculaire
	2015	Oiseaux	Moléculaire
Autriche	2001	Oiseau	Moléculaire

	2016	Homme	Moléculaire
	2017	Moustique	Moléculaire
		Oiseau	Moléculaire
	2018	Oiseau	Moléculaire
		Moustique	Moléculaire
	2021	Homme	Moléculaire
Belgique	2012	Oiseau	Moléculaire
	2016	Moustique	Moléculaire
	2017	Chauve-souris	Moléculaire
Croatie	2011	Cheval	Sérologie
	2012	Homme	Sérologie
	2016	Moustique	Moléculaire
	2017	Moustique	Moléculaire
	2018	Oiseau	Moléculaire
		Moustique	Moléculaire
2019	Moustique	Moléculaire	
Espagne	2006	Moustique	Moléculaire
	2011	Oiseau	Sérologie
		Cheval	Sérologie
	2012	Oiseau	Moléculaire
France	2015	Oiseau	Moléculaire
		Moustique	Moléculaire
	2016	Homme	Moléculaire
Grèce	2010	Oiseau	Sérologie
Hongrie	2003-2006	Oiseau	Moléculaire
	2017	Oiseau	Moléculaire
	2018	Oiseau	Moléculaire
		Homme	Moléculaire
Italie	1996	Oiseau	Moléculaire
	2008	Cheval	Sérologie
	2009-2014	Homme	Moléculaire
		Moustique	Moléculaire
		Oiseaux	Moléculaire

Pays Bas	2016	Oiseau	Moléculaire
Pologne	2006	Oiseau	Sérologie
	2012	Cheval	Sérologie
République Tchèque	2004	Oiseau	Moléculaire
	2013	Moustique	Sérologie
Royaume Unie	2001	Oiseau	Sérologie
	2009	Cheval	Sérologie
Serbie	2012	Oiseau	Sérologie
	2014	Moustique	Moléculaire
	2015	Homme	Sérologie
	2010	Oiseau	Sérologie
Slovaquie	2010	Oiseau	Sérologie
Suisse	2006	Oiseau	Moléculaire
	2008	Oiseau	Moléculaire

3.2 Virologie

L'USUV est un petit virus enveloppé, sphérique de 40 à 60 nm de diamètre à ARN simple brin de polarité positive. Son génome est constitué de 11064 nucléotides avec une structure en coiffe en 5' sans queue poly A en 3', un seul cadre de lecture ouvert (ORF) et deux régions non traduites (UTR) [263]. La longueur des UTR 5' et 3' varient respectivement entre 95 à 96 nucléotides et 631 à 664 nucléotides en fonction des souches [264]. Les UTR interviennent dans la traduction et la réplication virale. L'ORF code une seule polyprotéine de 3434 acides aminés qui après clivage donne 3 protéines structurales (capside, enveloppe et pré-membrane) et 8 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, 8 NS4A, 2K, NS4B et NS5) [265]. Les protéines structurales sont situées à l'extrémité 5' du génome viral et forme la particule du virion [246,266]. La protéine de capsid (C) forme le noyau central du virion et est associée à l'ARN viral. La glycoprotéine de l'enveloppe (E) intervient dans le cycle viral en favorisant l'entrée du virus dans les cellules hôtes. La protéine pré-membranaire (prM) participe à l'assemblage et

à la maturation des virions en facilitant le repliement de la glycoprotéine d'enveloppe (E) [267,268]. Les protéines non structurales remplissent différentes fonctions lors de l'infection [269]. La protéine NS1 participe à la réplication du génome et à la maturation des virions [270]. Les protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B jouent un rôle dans l'inhibition de la réponse interféron [271]. La protéine NS5 assure la réplication de l'ARN viral par son activité ARN-polymérase ARN-dépendante [263].

3.3 Modes de transmission

L'USUV est transmis principalement par les moustiques ornithophiles du genre *Culex* avec les oiseaux passériformes et strigiformes comme principaux hôtes amplificateurs et l'Homme et le cheval comme hôtes accidentels [59,272] (Figure 14). Plusieurs espèces de moustiques ont été identifiées comme étant impliquées dans le maintien du cycle viral dans l'avifaune [272]. L'USUV a été isolé chez plusieurs espèces de moustiques aussi bien en Afrique qu'en Europe [206,273]. Il s'agissait des moustiques *Aedes albopictus*, *Aedes caspius*, *Anopheles maculipennis*, *Culex quinquefasciatus*, *Culex perexiguus*, *Culex perfuscus*, *Coquillettidia aurites*, *Mansonia africana* et *Culex pipiens* qui est un vecteur très répandu en Europe [274–277].

L'USUV a été détecté chez près de 93 espèces d'oiseaux en Afrique et en Europe [59]. En Afrique le virus a été isolé chez des espèces d'oiseaux tels que le calao, le little greenbul et le merle kurrichane au Nigéria ; et les anticorps du virus ont été détectés chez le merle noir au Maroc [206,278]. En Europe, les anticorps du virus ont été détectés chez des oiseaux sauvages migrateurs tels que le faucon crécerelle, la rousserolle, le busard des roseaux, l'hirondelle rustique, la petite paruline grise, la paruline masquée, la paruline des jardins, l'hirondelle domestique et le moucherolle pie [279]. Les espèces sauvages migratrices telles que le faucon

crécerelle, la fauvette babillarde, la fauvette grise et le gobemouche noir seraient considérées comme responsables de l'introduction de l'USUV en Europe [271].

L'homme et le cheval constituent des hôtes accidentels de l'USUV et des impasses épidémiologiques. Le virus ou les anticorps du virus ont été identifiés chez d'autres espèces animales mais la question sur le rôle de ces espèces dans l'amplification et le cycle du virus reste posée. L'USUV a ainsi été isolé chez des chauves-souris et des rongeurs [212,236,262] ; Les anticorps du virus ont été trouvés chez des chiens et chez certains animaux sauvages tels que le sanglier, le cerf, le daim, le mouflon et le chevreuil [280,281].

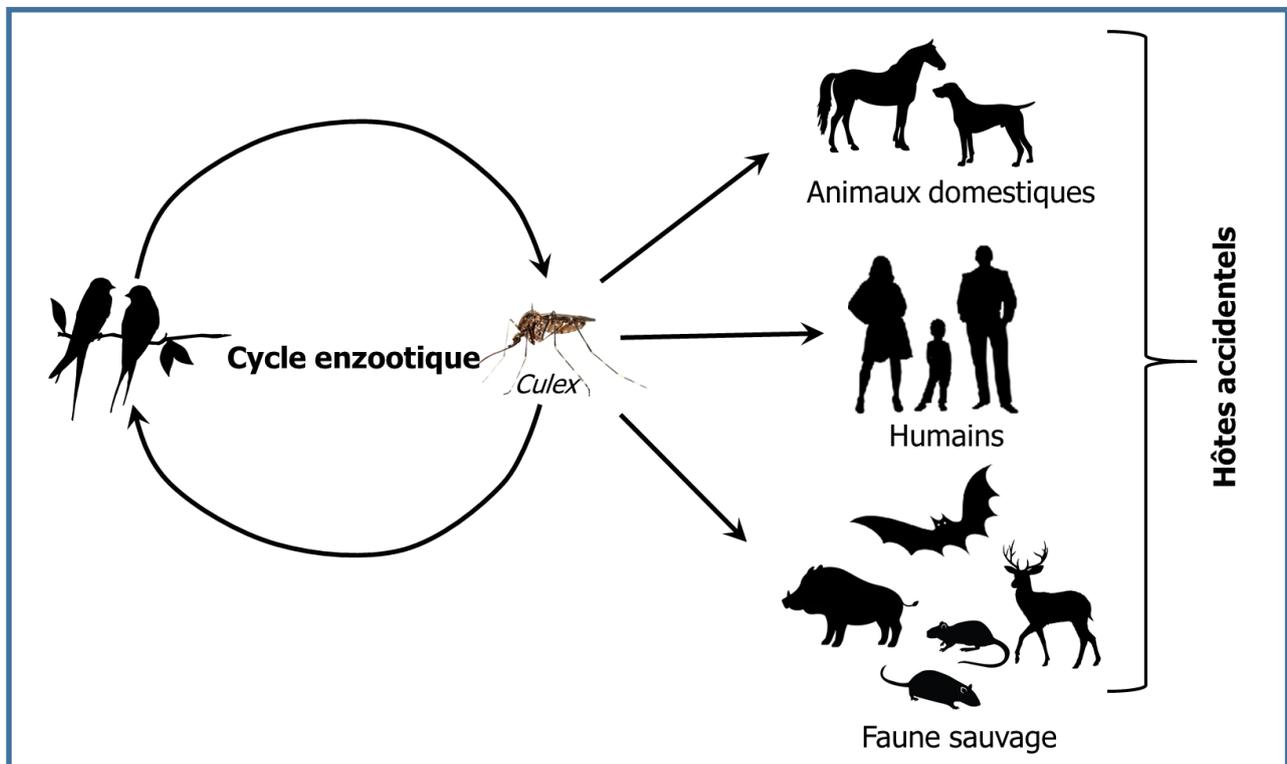


Figure 14 : Cycle de transmission du virus Usutu

- i) Le cycle enzootique se produit entre les moustiques *Culex* (vecteurs) et les oiseaux (réservoirs).
- ii) L'homme et certains animaux domestiques et de la faune sauvage constituent des hôtes accidentels.

3.4 Manifestations cliniques

Depuis la découverte du virus USUV, seulement 2 cas humains ont été rapportés en Afrique. En république centre africaine en 1981 chez un patient fébrile avec éruption cutanée ; et au Burkina Faso en 2004 chez un patient de 10 ans présentant un ictère fébrile [136]. Pour ces deux cas, les signes cliniques notifiés étaient la fièvre et des éruptions cutanées [206]. Par la suite plusieurs cas ont été rapportés dans le reste du monde principalement en Europe. 28 cas d'infections aiguës par le USUV ont été identifiés chez l'homme [272]. De nombreux patients infectés par le USUV en Italie et en Croatie présentaient des atteintes neuro-invasives à type d'encéphalite ou de méningo-encéphalite [216,282–286]. Certains de ces cas étaient associés à d'autres comorbidités et d'autres sont survenus chez des patients immunodéprimés [216,282,284]. Plusieurs études ont montré que l'USUV était neurotrophe. En effet le virus a été détecté dans le cerveau de chauves-souris et d'oiseaux [287,288]. En France un cas de paralysie faciale a frigore a été décrit chez un patient infecté par l'USUV [14]. Cette symptomatologie atypique montre que des études supplémentaires sont nécessaires pour établir un tableau clinique clair de l'infection par l'USUV.

Des cas asymptomatiques ont également été rapportés dans des études réalisées chez des donneurs de sang en Allemagne et en Autriche [289,290]. Ces résultats en plus de ceux des études de séroprévalences du USUV suggèrent que les cas humains ont pu être sous-estimés et que le virus aurait une circulation plus importante avec des formes asymptomatiques ou faiblement symptomatiques [59]. Jusqu'à présent une centaine d'infection aiguë ont été détectées dont une trentaine d'atteintes neurologiques clairement identifiées.

3.5 Diagnostic biologique du virus Usutu

Le diagnostic de l'infection par l'USUV est basé sur la détection de l'ARN viral dans le sang ou dans le liquide céphalo rachidien (LCR), l'isolement du virus par culture cellulaire et

la détection des anticorps IgM ou IgG anti-USUV dans le sang ou le LCR [272]. La cinétique d'apparition des marqueurs biologiques chez l'Homme n'est pas connue. Il n'existe pas de tests commerciaux spécifiques pour le diagnostic d'USUV.

L'isolement du virus par culture cellulaire est le gold standard mais la courte virémie observée lors de l'infection par le USUV rend difficile sa réalisation et il n'est donc pas utilisé en routine pour le diagnostic du USUV [291].

De nombreux tests de RT-PCR ont été développés par les laboratoires de référence [292,293]. La première RT-PCR en temps réel spécifique à l'USUV ciblant le gène NS5 et basée sur des souches européennes a été développé en 2011 [292]. Une RT-PCR en temps réel permettant en une seule réaction de détecter et de différencier le WNV et le USUV a été décrite par la suite [294].

4. Le virus du Nil occidental

4.1 Epidémiologie

Le WNV a été isolé pour la première fois en 1937 dans le district du Nil occidental en Ouganda chez une femme présentant une infection fébrile [295]. Depuis lors il y'a eu très peu d'épidémies rapportées jusqu'aux années 1990 [296]. Le WNV est aujourd'hui présent sur tous les continents.

La première épizootie autochtone de WNV en Europe est survenue en Camargue en 1962 [297]. Des grosses épidémies ont été ensuite rapportées en 1996 et en 1999 respectivement en Roumanie et en Russie [298,299]. Des cas de séroconversion WNV ont été rapportés en Turquie dans les années 1970 et 2000 avant la survenue d'une épidémie en 2010 [300–302]. Les épidémies survenues en Europe étaient causées par des souches de la lignée 1 jusqu'en 2004

[303]. La lignée 2 quant à elle est apparue en Europe pour la première fois en Hongrie avant de se propager au reste de l'Europe [304]. Elle a été ensuite responsable d'épidémies en Grèce [304], en Serbie [305], en Roumanie [306], en Russie [307] et en Italie [308,309]. La plus grosse épidémie du WNV en Europe a été enregistrée en 2018. L'épidémie avait touché plus d'une douzaine de pays causant plus de 2000 cas avec 181 décès [303]. Les pays les plus touchés étaient l'Italie, la Serbie, la Grèce, la Roumanie, la Hongrie, la Croatie, la France, la Turquie et l'Autriche.

Aux Etats Unis, le WNV a été rapporté dans la ville de New York en 1999 [310].

Au Proche-Orient, le WNV a été isolé en Israël lors d'une épidémie en 1951 [311]. Il s'agissait de la première fois que le WNV était identifié dans le pays, même si on soupçonne que le virus était présent en Israël avant cette date. Depuis lors, il s'en est suivi d'autres épidémies [312,313]. A partir des années 2000, Israël connaît régulièrement des épidémies de WNV [314–318]. Les anticorps anti WNV ont été détectés chez les humains et les animaux en Iran dans les années 1970 et 2009, en Jordanie et au Liban [319–323].

Le continent Africain a enregistré de nombreuses épidémies de WNV depuis les années 1950 même si des enquêtes sérologiques montrent que le virus circulait en Afrique avant cette date [57] (Figure 15). En effet, une enquête sérologique réalisée entre 1939 et 1940 en Ouganda, au Soudan et dans l'actuel République démocratique du Congo a rapporté une séroprévalence du WNV supérieure à 50% dans certaines régions [324]. Une autre analyse réalisé sur des échantillons collectés entre 1951 et 1955 a permis d'observer des séropositifs au WNV au Nigéria [325]. Des cas sérologiques ont été rapportés en 1954 en Afrique du Sud sur des échantillons humains et animaux [326]. D'autres études sérologiques ont permis d'identifier des cas du WNV en Egypte chez les humains et les moustiques [327–329]. Le WNV a été responsable de syndromes neurologiques et de décès en Afrique du Sud en 1997, 1980 et 1984

[57]. Entre 1997 et 2018 plusieurs cas d'encéphalites et de décès liés au WNV ont été signalés en Tunisie [330–333].

Des foyers épidémiques ont été rapportés chez les humains et les animaux au Maroc en 1996 et en 2010, avec des cas sporadiques signalés en Algérie [324,334–336]. Des tests moléculaires ont montré la circulation du WNV en République centrafricaine [337], en Guinée [338], au Ghana [339], au Gabon [340], au Nigéria [341] au Sénégal [342] et en Sierra Leone [343] entre 1983 et 2020.

Des enquêtes sérologiques ont permis de confirmer la circulation du WNV chez l'homme en Algérie, en République centrafricaine, en République démocratique du Congo, en Ethiopie, au Gabon, au Ghana, au Kenya, à Madagascar, au Mali, au Maroc, en Mozambique, en Namibie, au Nigéria, au Sénégal, en Sierra Leone, en Tanzanie, en Tunisie, en Ouganda et en Zambie [57].

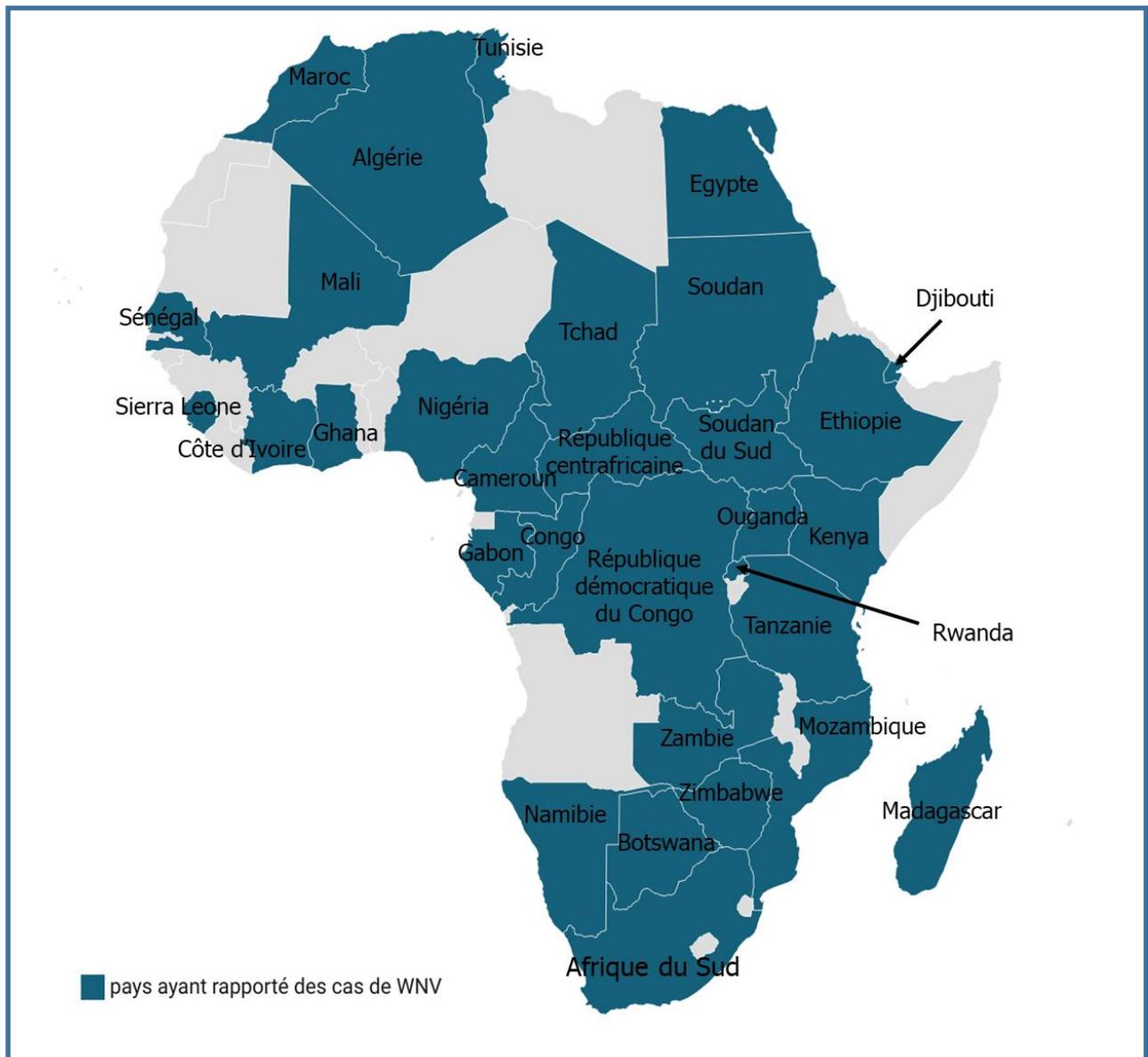


Figure 15 : Distribution du virus du Nil occidental en Afrique

La couleur verte représente les pays dans lesquels des cas sérologiques ou moléculaires du WNV ont été rapportés chez les humains, les animaux ou les moustiques.

Les lignées 1 et 2 du WNV ont été identifiées en Afrique (Figure 16). La lignée 1 a été identifiée en Algérie, en République centrafricaine, en Egypte, en Côte d'Ivoire, au Kenya, au Maroc, en Tunisie, au Sénégal et en Afrique du Sud tandis que la lignée 2 a quant à elle été identifiée au Botswana, en République centrafricaine, au Congo, en Djibouti, à Madagascar, au

Mozambique, en Namibie, au Sénégal, en Afrique du Sud, en Tanzanie et en Ouganda [57,344–348]

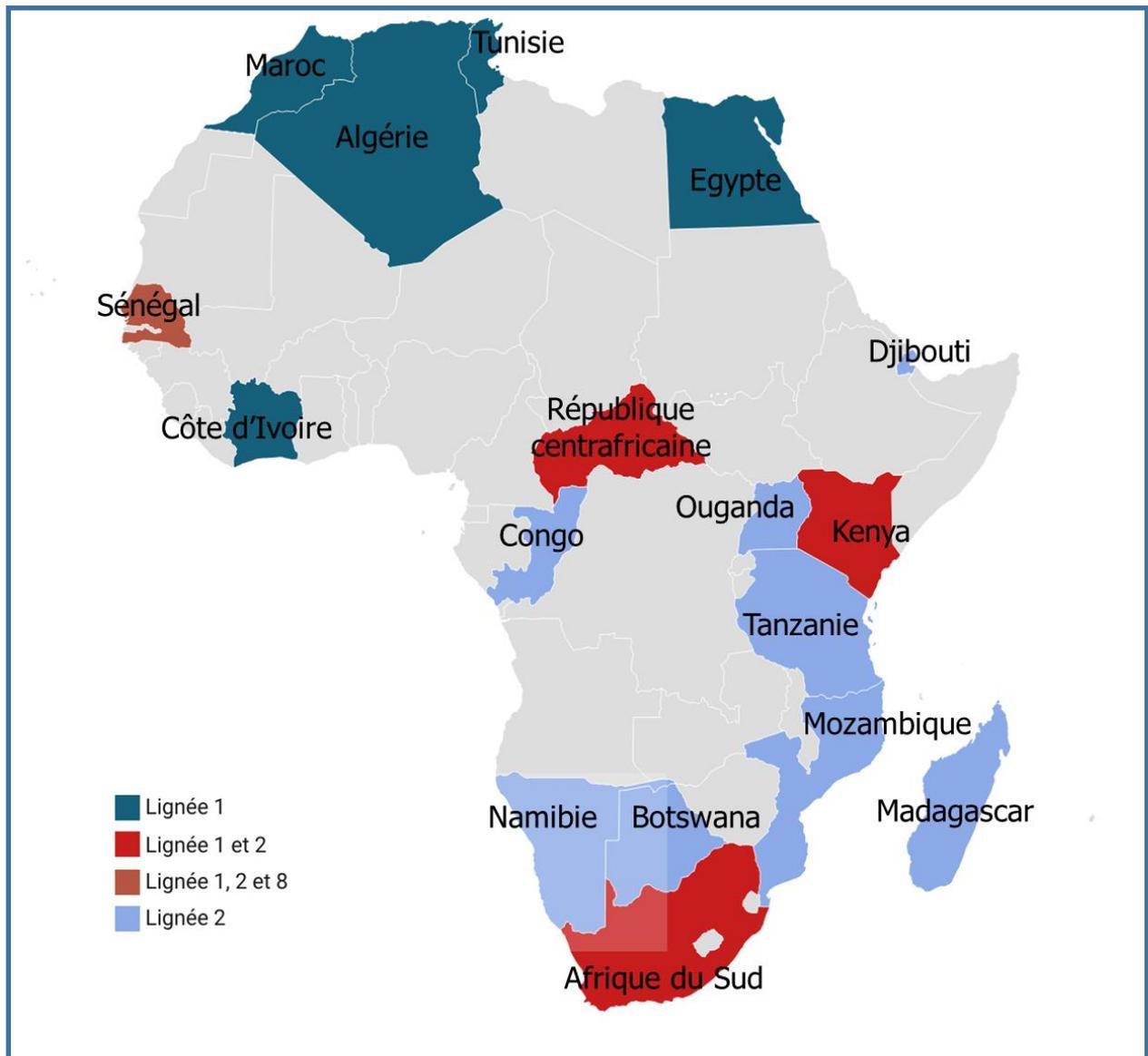


Figure 16 : Distribution des lignées du virus du Nil occidental en Afrique

La couleur vert foncé représente les pays dans lesquels la lignée 1 du WNV a été isolée, la couleur rouge les pays dans lesquels les lignées 1 et 2 ont été isolées, la couleur orange les pays dans lesquels les lignées 1, 2 et 8 ont été isolées et la couleur bleue claire, les pays dans lesquels la lignée 2 a été isolée.

4.2 Virologie

Le WNV est un virus à ARN brin positif avec une enveloppe entourant une capsidie icosaédrique d'environ 50 nm de diamètre [296]. Son génome de 11 kb est composé d'un seul cadre de lecture ouvert avec des UTR en 5' et 3' codant une polyprotéine de 3000 acides aminés. Après clivage la polyprotéine va donner 3 protéines structurales (C, prM et E) et 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) [349]. La protéine C intervient dans la formation du virion, la protéine prM et la protéine E sont nécessaires à l'assemblage des particules virales [350,351]. Toutes les protéines non structurales sont nécessaires à la réplication virale, l'assemblage des particules et l'évasion à réponse antivirale de l'hôte [351,352]. Plus spécifiquement NS1 intervient dans la réplication de l'ARN, l'échappement viral et la virulence [353,354] ; NS3 avec son activité hélicase ATP dépendante est impliquée dans la maturation postraductionnelle des protéines virales [296] ; NS5 est une méthyltransférase et une ARN polymérase dépendante de l'ARN et joue un rôle antagoniste de la voie de signalisation de l'interféron [355] ; NS2A participe à l'assemblage du virus ainsi qu'à l'inhibition de l'activation du promoteur de l'interféron bêta [356,357]; NS4B bloque la réponse interféron [358].

Phylogénétiquement, le WNV compte 9 lignées mais la majorité des épidémies et des cas sont provoqués par les lignées 1 et 2 [347]. Il semble y avoir une forte diversité de virulence entre les souches. La lignée 1 a été responsable d'épidémies majeures en Europe, en Afrique et en Amérique avec des syndromes neurologiques [304,359,360]. La lignée 2 a été longtemps considérée comme spécifiquement africaine avant de s'étendre en Europe [304,344,361,362]. Elle semblait être moins pathogène que la lignée 1 jusqu'à ce qu'elle soit responsable de forme grave en Afrique du Sud et en Europe [304,344,363].

4.3 Modes de transmission

Le WNV circule entre les moustiques et les oiseaux dans un cycle enzootique [296]. De nombreuses espèces de moustiques sont susceptibles de maintenir ce cycle mais ce sont les moustiques du genre *Culex* qui sont les plus impliqués [364]. Même si les moustiques du genre *Culex* sont ornithophile c'est à dire qu'ils prennent leur repas sanguin préférentiellement sur les oiseaux, il leur arrive aussi d'effectuer leur repas sanguin sur des mammifères principalement les chevaux et les humains [303].

Plusieurs espèces de moustiques *Culex* ont été identifiées dans différentes régions comme principales vecteurs du WNV. Ainsi, *Culex pipiens pipiens* et *Culex tarsalis* ont été identifiés en Amérique du Nord [365–367]; *Culex univittatus* en Afrique et au moyen Orient [368]; *Culex quinquefasciatus*, *Culex tritaeniorhynchus* et *Culex vishnui* en Asie [369]; *Culex pipiens* et *Culex modestus* en Europe [370]. D'autres espèces de moustiques appartenant à d'autres genres telles qu'*Aedes albopictus*, *Aedes vexans*, *Ochlerotatus japonicus* et *Ochlerotatus triseriatus* ont été identifiées comme étant capable de transmettre le WNV [371].

Les oiseaux constituent les hôtes naturels et hôtes amplificateurs du virus [372]. Le WNV a été isolé chez plusieurs espèces d'oiseaux sauvages telles que les passereaux, les charadriiformes, les strigiformes et les falconiformes [373,374]. Le geai bleu, le quiscalc bronzé, le roselin du Mexique, la corneille d'Amérique et le moineau domestiques sont considérés comme des hôtes amplificateurs les plus importants [370]. Certains oiseaux domestiques interviennent également dans la transmission du WNV surtout en zone urbaine [370].

Comme pour USUV l'homme et le cheval constituent des hôtes accidentels c'est-à-dire que la virémie est très faible et de courte durée chez ces mammifères si bien qu'ils ne peuvent pas infecter un moustique naïf pendant son repas sanguin [296]. Chez les humains, le WNV peut

se transmettre de différentes manières d'une personne à l'autre : i) transmission mère enfant : le WNV peut être transmis d'une mère infectée à son nouveau-né par voie intra utérine [375,376]. Une transmission par allaitement maternel a également été notifiée [377]; ii) transmission par transfusion sanguine ou par transplantation d'organes : plusieurs cas de contaminations par transfusion sanguine et par transplantation d'organes ont été signalés au début des années 2000 [378,379]. Le WNV peut représenter alors une menace pour la sécurité transfusionnelle dans les pays où le virus est endémique ; iv) transmission par manipulation de cadavres d'oiseaux infectés [303]; v) transmission probable par voie sexuelle [380] (Figure 17).

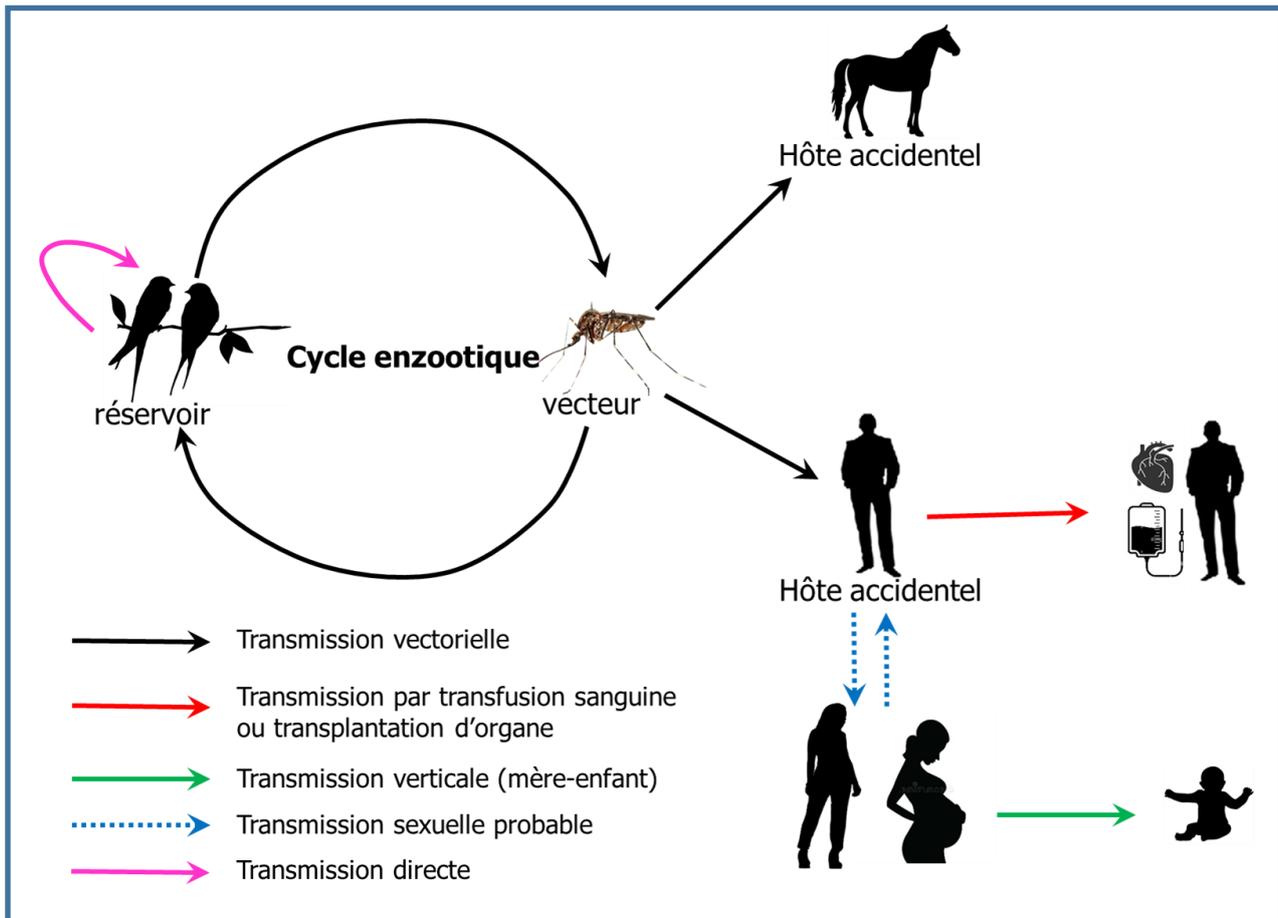


Figure 17 : Cycle de transmission du virus du Nil occidental

i) Le cycle enzootique implique les oiseaux et les moustiques. ii) l'homme et le cheval sont des hôtes accidentels. iii) transmission par transfusion sanguine ou par transplantation d'organe chez l'homme. iv) transmission verticale (mère-enfant) chez l'homme. v) probable transmission sexuelle chez l'homme.

4.4 Manifestations cliniques

La période d'incubation après infection par le WNV est de 2 à 14 jours [381]. La majorité des personnes infectées (environ 80 %) sont asymptomatiques ou présentent des symptômes très légers [381]. Environ 20 % des personnes infectés développent des symptômes allant d'un syndrome pseudo grippal à des complications neuroinvasives graves chez moins de 1% des

patients [382]. Les symptômes les plus couramment rencontrés sont la fièvre, les myalgies, les céphalées et des adénopathies [383]. Les complications neuroinvasives comprennent la méningite, l'encéphalite, la paralysie flasque aiguë et parfois des troubles oculaires [384]. Pendant les complications neuroinvasives on peut noter une forte fièvre, des céphalées violentes, une raideur de la nuque, une confusion, des tremblements, une paralysie musculaire et des déficits neurologiques [384]. Un dixième des malades qui développent des atteintes graves du système nerveux central en décèdent [384]. La gravité de la maladie augmente avec l'âge ou l'état immunitaire du patient. Ainsi les personnes âgées et les personnes immunodéprimées présentent des risques plus élevés de développer des formes graves de la maladie [381]. Des complications à type de troubles comportementaux et de surdité neurosensorielles irréversibles [385] ainsi que des atteintes rénales ont été rapportées lors de l'infection par le WNV [386]. Certains patients ont présenté une hypotension et des arythmies cardiaques mortelles [387,388]. Des complications à long terme pouvant dépasser un an après l'infection ont été observées chez certains malades ayant développé des formes graves [381].

Chez les chevaux, l'infection au WNV provoque des atteintes musculaires et neurologiques dans 20% des cas. Parmi les chevaux qui développent des signes neurologiques, 30% sont susceptibles de mourir et 10 à 20% guérissent avec des séquelles neurologiques [389].

4.5 Diagnostic biologique du virus du Nil occidental

Les tests moléculaires consistent à la détection de l'ARN viral du WNV dans le sérum ou le liquide céphalo rachidien par la RT-PCR [381]. La courte période de virémie rend difficile la détection du WNV dans le sang des patients [303]. Cependant des données suggèrent que la virémie dure plus longtemps chez les personnes infectées [390,391] (Figure 18). Les prélèvements d'urines pourraient alors être une alternative aux prélèvements sanguins dans le

diagnostic moléculaire du WNV. La PCR peut être également réalisé à partir d'une biopsie cérébrale [392].

Le WNV peut être isolé à partir de cultures cellulaires réalisées sur des échantillons de sérum ou de LCR. Ce test malgré sa spécificité est peu sensible et nécessite un laboratoire de niveau de sécurité 3 d'où sa pratique dans les laboratoires de recherche [393].

Les tests sérologiques permettent la détection des anticorps IgM et IgG du WNV. Les IgM sont détectables 4 à 7 jours après l'exposition au WNV et peuvent persister jusqu'à un an [394]. En cas de non détection de l'ARN viral dans le sérum et le LCR, la détection des IgM spécifiques est un indicateur fiable d'une infection précoce [393]. Ce résultat peut être confirmé par la détection des IgG (séroconversion) pendant la phase de convalescence de l'infection [393]. Les IgG sont détectable environ 8 jours après le début des symptômes et persistent pendant plusieurs années [395]. Les tests sérologiques les plus utilisés sont des tests ELISA ou des tests d'immunofluorescence [396]. Des tests ELISA existent dans le commerce et sont peu coûteux [397].

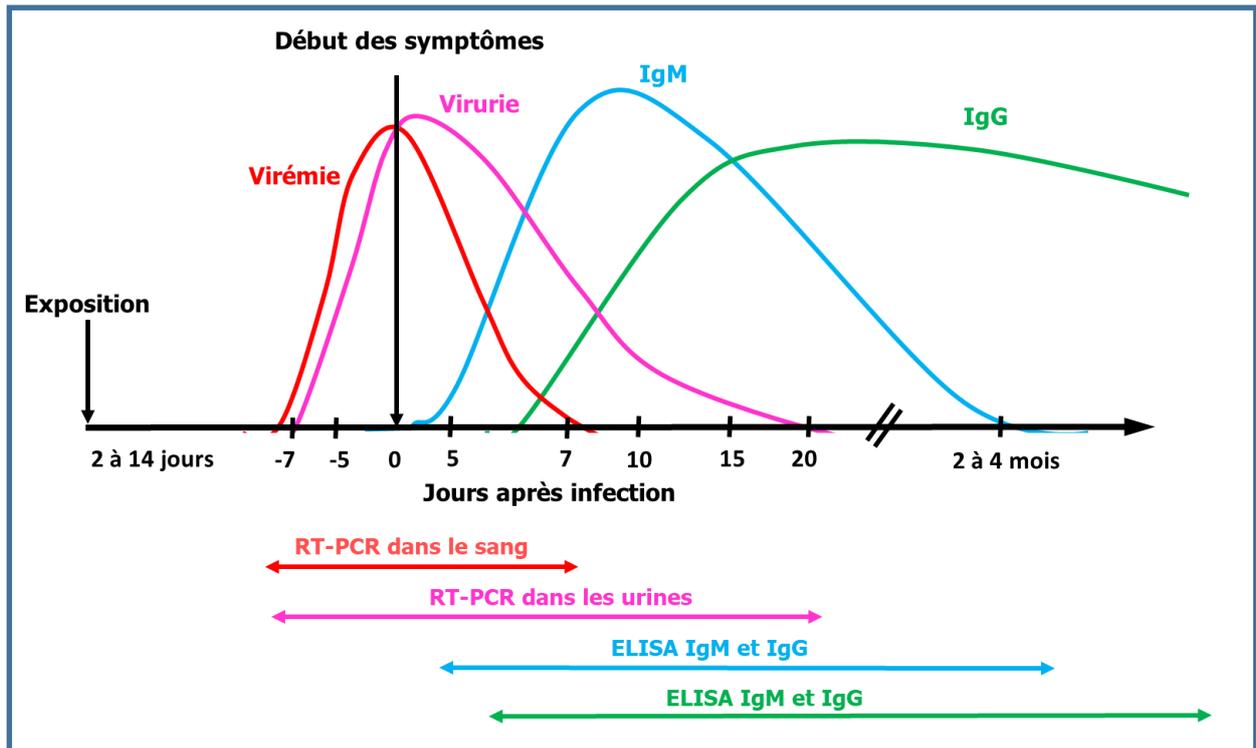


Figure 18 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques au cours d'une infection au virus du Nil occidental

L'ARN viral est présent dans le sang jusqu'à 5 à 7 jours après le début des symptômes ; l'ARN viral persiste dans les urines jusqu'à 15 à 20 jours après le début des symptômes ; les IgM apparaissent autour du quatrième jour après l'exposition au virus et les IgG autour du huitième jour.

VI. Les Alphavirus

Les Alphavirus sont des virus enveloppés non segmentés de 70 nm de diamètre appartenant à la famille des *Togaviridae*. Leur génome est constitué d'un ARN monocaténaire de polarité positive avec 2 ORF. Ils possèdent une longueur allant de 11000 à 12000 nucléotides avec une coiffe à l'extrémité 5' et une queue poly A à l'extrémité 3'. Le génome code pour 4 protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4) et 5 protéines structurales (protéine de capsid C,

glycoprotéine E1, glycoprotéine E2, Glycoprotéine E3, polypeptide 6K) [398] (Figure 19). Les protéines structurales sont principalement impliquées dans l'assemblage des virions infectieux [399].

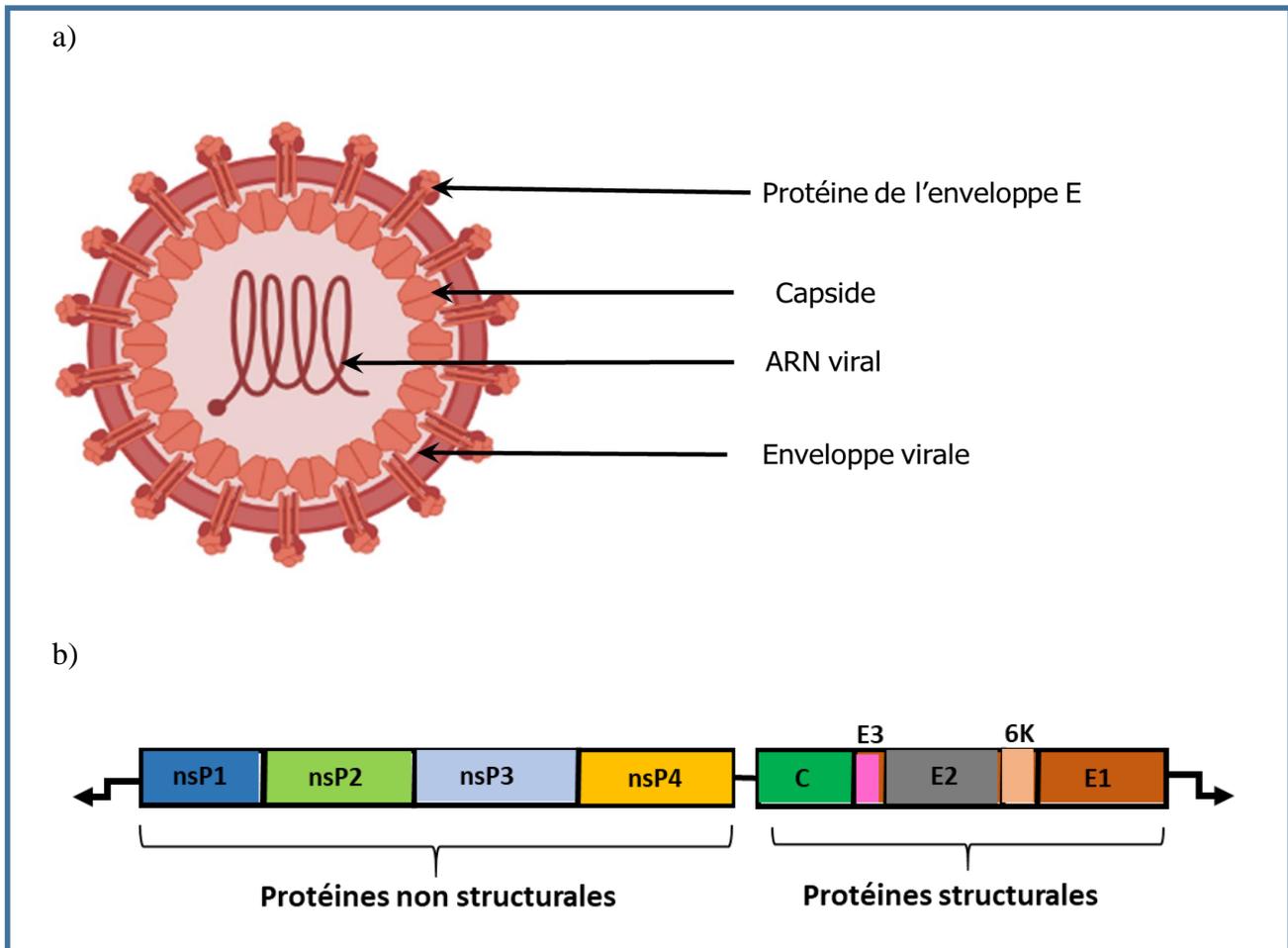


Figure 19 : (a) particule virale des Alphavirus (b) organisation génomique des Alphavirus

La figure (a) représente la particule virale des alphavirus avec de l'intérieur vers l'extérieur l'ARN viral, la capside, l'enveloppe virale et la protéine de l'enveloppe E. La figure (b) représente le génome viral des Alphavirus qui possède 2 cadres de lecture ouverts (ORF) codant pour 4 protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4) et 5 protéines structurales (protéine de capside C, glycoprotéine E1, glycoprotéine E2, Glycoprotéine E3, polypeptide 6K).

Certains Alphavirus font partie des arbovirus et se transmettent à l'homme ou aux autres mammifères principalement par la piqûre d'un moustique. Les Alphavirus ont été rarement isolés chez les tiques [400]. Plusieurs espèces de moustiques sont impliquées dans la transmission des Alphavirus. En fonction des virus, les *Aedes*, les *Culex* et les *Anopheles* ont été identifiés [401].

La nature sporadique des épidémies causées par les Alphavirus rend complexe la compréhension de leur épidémiologie [7]. Les Alphavirus sont largement répartis sur tous les continents et circulent au niveau enzootique à travers différents hôtes réservoirs (rongeurs, oiseaux) [66,402]. Les Alphavirus peuvent être classés en Alphavirus du nouveau monde et en Alphavirus de l'ancien monde. Les Alphavirus du nouveau monde regroupant le virus de l'Encéphalite équine Orientale (EEEV), le virus de l'Encéphalite équine occidentale (WEEV) et le virus de l'Encéphalite équine Vénézuélienne (VEEV) circulent dans les Amériques. Les Alphavirus de l'ancien monde regroupant le SINV, le CHIKV, l'ONNV, le virus de la Ross River (RRV pour Ross River virus), le virus de la forêt de Barmah (BFV pour Barmah Forest virus) et le SFV, sont répartis en Europe, en Asie, en Australie et en Afrique [10]. Plusieurs facteurs interviennent dans la dissémination des Alphavirus dans les différentes régions. Parmi ces facteurs nous pouvons citer le transport aérien, le commerce maritime, l'évolution du virus et l'adaptation des vecteurs à un nouvel environnement [7].

Les Alphavirus peuvent également être classés en 2 grands groupes en fonction des manifestations cliniques provoquées (Tableau V) [399]:

- Le premier groupe constitué par les Alphavirus provoquant des arthralgies tels que le CHIKV, le RRV, l'ONNV et le virus Mayaro (MAYV pour Mayaro virus). Une infection par ces virus provoque également de la fièvre, des éruptions cutanées des polyarthrites aiguës ou chroniques.

- Le second groupe constitué par les Alphavirus neuroinvasifs responsables d'encéphalites tels que le VEEV, l'EEEV et le WEEV. Ces virus provoquent des atteintes du système nerveux central avec de graves conséquences neurologiques.

Tableau V : Principaux Alphavirus pathogènes pour l'homme

Virus	Vecteur	Réservoir animal	Manifestations cliniques	Distribution géographique
Alphavirus provoquant des arthralgies				
Chikungunya (CHIKV)	Culex, Aedes	Primates	Fièvre, Arthrites, rash	Afrique, Asie, Europe, Amériques, Océanie
Virus O'nyong nyon (ONNV)	Anopheles		Fièvre, Arthrites, rash	Afrique
Ross River virus (RRV)	Culex, Aedes	Mammifères	Fièvre, Arthrites, rash	Australie, Papouasie Nouvelle-Guinée, Iles Salomon et Ile du Pacifique Sud
Virus de Sindbis (SINV)	Aedes	Oiseaux	Fièvre, Arthrites, rash	Europe, Asie, Afrique, Australie
Virus Mayaro (MAYV)	Haemagogus, Aedes		Fièvre, Arthrites, rash	Amérique du Sud
Virus de la forêt de Barmah (BFV)	Aedes	Oiseaux	Fièvre, Arthrites, rash,	Australie

			faiblesse musculaire	
Virus de la forêt de Semliki (SFV)	Aedes	Oiseau, mammifères	Fièvre, Arthrites, rash (rare)	Afrique, Europe, Asie
Alphavirus neuroinvasifs				
Virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEE)	Aedes	Oiseaux	Encéphalite	Amérique du nord, Amérique du sud, les Caraïbes
Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEE)	Culex	Oiseaux, chevaux	Fièvre, encéphalite	Amérique du nord, Amérique du sud
Virus de l'encéphalite équine Vénézuélienne (VEE)	Psorophora, Aedes	Chevaux, rongeurs	Fièvre, encéphalite	Amérique du nord, Amérique du sud

1. Le virus Chikungunya

1.1 Epidémiologie

Le CHIKV a été isolé pour la première fois en 1953 au Tanganyika (actuel Tanzanie) [403]. Le nom Chikungunya vient de la langue Makondé et signifie « ce qui est courbé » en référence à la position adoptée par les patients due aux douleurs articulaires sévères dont ils souffrent [404]. Depuis lors le CHIKV a été responsable de nombreuses épidémies dans le monde. Le virus est aujourd'hui présent sur tous les continents [405].

Les cas de CHIKV identifiés en Europe étaient uniquement des cas importés jusqu'en 2007 où les premiers cas de transmission autochtone ont été signalés dans le nord-est de l'Italie lors d'une épidémie qui a causé plus de 190 cas [406]. Deux cas autochtones ont ensuite été détectés en France en 2010 puis en 2014 où 12 autres cas autochtones ont été identifiés au sud du pays, dans la ville de Montpellier [407,408]. En 2017 une deuxième épidémie de CHIKV a été signalée au sud de l'Italie causant près de 700 cas suspects [405,409]. Des études de séroprévalence ont rapporté des séroprévalences de 0,4% en Turquie et de 10% en Italie [410,411]. Le génotype Est/Central/Sud Afrique (ECSA) a été identifié dans tous les foyers européens à l'exception de la France en 2010 où aucune lignée spécifique de CHIKV n'a été identifiée [405].

Le premier cas d'infection au CHIKV dans les Amériques a été identifié à Saint-Martin en fin 2013 [412]. Le virus s'est par la suite propagé dans près de 45 pays et territoires d'Amérique du Nord, Central et du Sud causant plus de 2,9 millions de cas et 296 décès [413]. Des épidémies ont été signalées au Suriname en 2014-2015 [414], en Haïti, au Mexique et en Barbade en 2014 [415-417], en Colombie en 2014 et 2015 [418,419], au Brésil et en Honduras en 2015 [420,421]. Les premiers cas autochtones du CHIKV aux Etats-Unis ont été rapportés en 2014 en Floride [422]. Plus de 2799 cas avaient été signalés par l'Etat américain dont 12 cas

autochtones, le reste étant des cas importés. Presque toutes épidémies survenues dans les Amériques étaient dues à la lignée asiatique à l'exception de quelques épidémies au Brésil qui étaient associées au génotype ESCA [405].

L'Asie a enregistré plusieurs foyers épidémiques du CHIKV. Une étude rétrospective réalisée sur des échantillons de patients montre que le virus circulait déjà en Asie du Sud-Est depuis 1954 [423]. Les premières épidémies ont été rapportées en 1958 en Thaïlande, puis en 1963 en Inde [423]. Depuis lors, des épidémies ont été signalées au Sri Lanka, en Inde, au Bangladesh, en Indonésie, en Malaisie, au Vietnam, en Thaïlande et aux Philippines [405,423,424]. L'Inde est le pays ayant signalé le plus d'épidémies avec plus de 26 épidémies [405]. Les taux d'incidence les plus élevés ont été observés en Inde en 2006 (4 270 cas suspects pour 10 000 habitants) et en 2008 (6 644 cas suspects pour 10 000 habitants) [425,426]. La majorité des épidémies enregistrées en Asie étaient associées au génotype ESCA [405]. Deux épidémies incluant la circulation de plusieurs lignées ont été rapportées dans le nord de l'Inde en 2016 et aux Philippines en 2011-2013 [427,428]. Des preuves sérologiques ont été rapportées dans des pays qui n'ont pas signalé d'épidémies comme l'Iraq, le Qatar et le Singapour [429-431].

L'Océanie est le continent le moins touché avec une seule épidémie identifiée en 2013-2014 en Micronésie [432]. Des études de séroprévalence réalisées en 2014-2015 ont montré également une circulation du virus dans cette région [433].

Depuis la découverte du CHIKV, le continent africain fait face à une recrudescence des épidémies avec une endémicité dans les zones rurales [89] (Figure 20). Certains pays Africains ne disposent pas de données fiables sur la circulation du CHIKV. Les preuves sérologiques et/ou moléculaires de l'infection au CHIKV ont été rapportées dans 33 pays Africains dont l'Angola, le Bénin, le Burundi, le Cameroun, la République centrafricaine, le Tchad, les Comores, la Côte d'Ivoire, la République démocratique du Congo, Djibouti, la Guinée

équatoriale, l'Érythrée, l'Éthiopie, le Gabon, la Guinée, le Kenya, Madagascar, le Malawi, l'île Maurice, Mayotte, la Mozambique, le Nigéria, la République du Congo, la Réunion, le Sénégal, le Seychelles, la Sierra Leone, l'Afrique du Sud, la Somalie, le Soudan, la Tanzanie, l'Ouganda et le Zimbabwe [434,435]. Depuis les années 2000 on assiste à une augmentation des épidémies en Afrique [434]. Des épidémies ont été observées au Kenya en 2004 et 2017-2018 [436,437], à Mayotte en 2005-2006 [438], au Cameroun en 2006 [439], en Tanzanie en 2015 [440], au Gabon en 2007 et 2010 [441,442], en République du Congo 2011 et 2019 [443,444], au Sénégal en 2009-2010 [445], en Angola en 2016 [446] et en Ethiopie en 2019 [447]. La majorité des épidémies du CHIKV enregistrées en Afrique est associée au génotypes ECSA [405]. Il existe très peu de données sur la circulation du CHIKV au Burkina Faso. Une seule étude réalisée sur des échantillons collectés en 2015 dans la capitale burkinabè (Ouagadougou) a montré une séroprévalence de 29% [56].

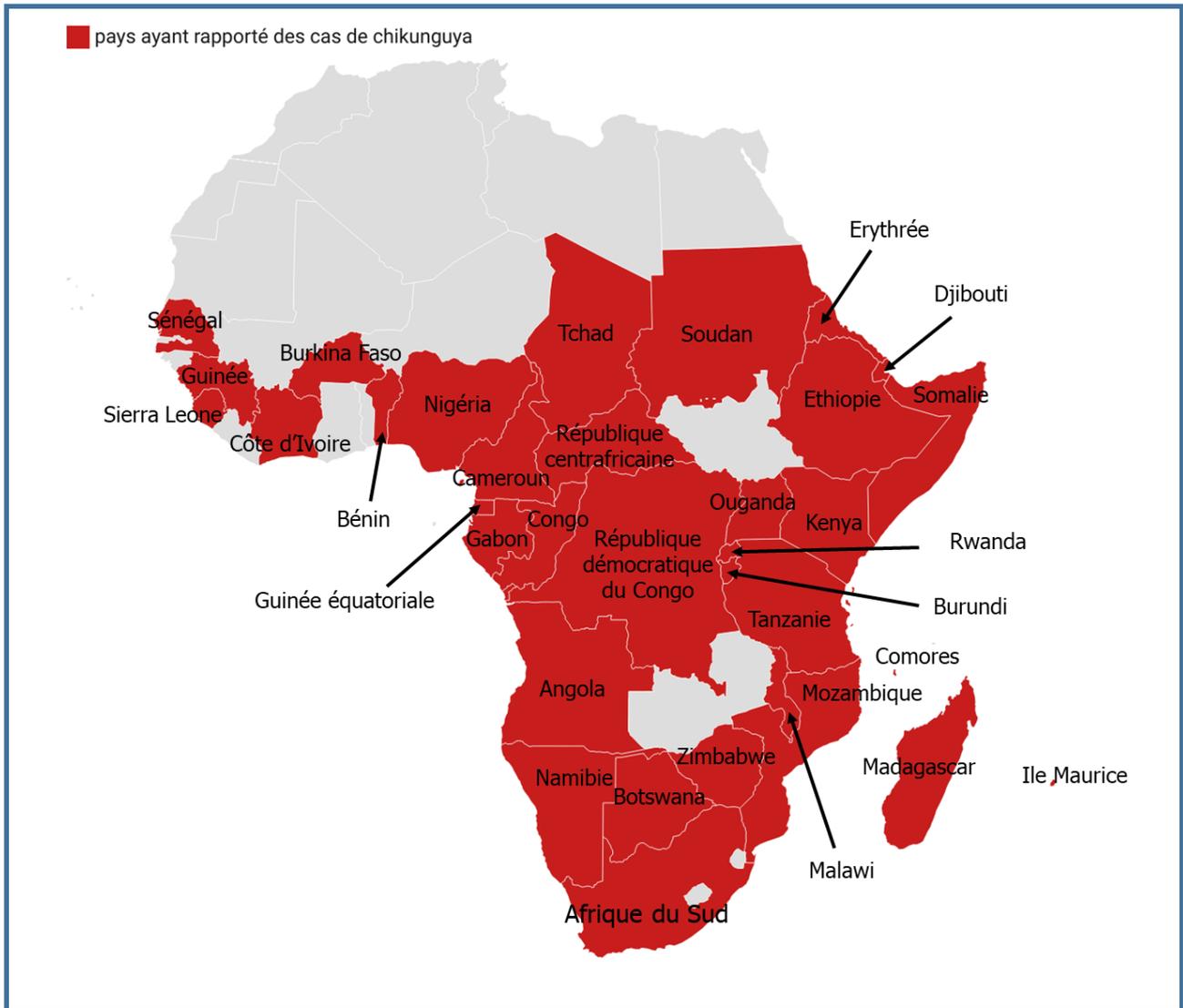


Figure 20 : Distribution géographique du virus Chikungunya en Afrique

La couleur rouge représente les pays ayant enregistré des épidémies ou des preuves sérologiques de la circulation du CHIKV.

1.2 Virologie

Le CHIKV est un arbovirus appartenant à la famille des *Togaviridae* du genre *Alphavirus*. Son génome est très proche d'ONNV et est constitué d'un ARN monocaténaire de sens positif d'environ 11,8 kilobases. Il possède une coiffe avec du 7- méthylguanosine à son extrémité 5' et une extrémité 3' polyadénylée. Il possède 2 ORF. L'ORF 5' qui représente les 2/3 du génome

code une polyprotéine non structurale de 2474 résidus d'acides aminés et l'autre ORF code une polyprotéine structurale de 1288 résidus d'acides aminés. Ces deux polyprotéines vont être clivées pour donner plusieurs protéines. La polyprotéine non structurale va donner quatre protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4) qui participent à la réplication virale. La glycoprotéine structurale va donner cinq protéines structurales : la protéine C de capsid, les glycoprotéines de l'enveloppe E1, E2, E3 et la protéine 6K. La particule virale sphérique d'environ 70 nm de diamètre est encapsidée par la protéine de capsid C et entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la cellule hôte enrichie d'hétérodimères des protéines d'enveloppe E1 et E2. Les protéines structurales E3 et 6K sont des peptides leaders de E1 et E2 respectivement et ne sont pas observées en abondance dans le virion mature [448,449]. Trois génotypes du virus ont été identifiés : le génotype Est/Central/Sud Afrique en abrégé ECSA incluant la lignée Océan indien (IOL), le génotype Ouest africain et le génotype asiatique [450].

1.3 Modes de transmission

Les moustiques sauvages tels que *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus* et *Aedes luteocephalus* servent de vecteurs [451–453] et les primates non humains constituent le principal réservoir et hôtes amplificateurs du virus dans les zones forestières [454]. Le cycle de transmission enzootique n'a pas été décrit sur d'autres continents même si des études ont montré des preuves sérologiques et moléculaires de la circulation du CHIKV chez des singes en Malaisie [455]. *Aedes furcifer* a été identifié comme étant le principal vecteur capable de pénétrer dans les villages et de transmettre le virus des singes aux humains [451].

Aedes aegypti et *Aedes albopictus* sont les principaux vecteurs qui maintiennent le cycle de transmission urbain [449] et l'homme constitue l'hôte amplificateur (Figure 21).

Une mutation adaptative (substitution de l'alanine par la valine en position 226 dans le gène de la glycoprotéine E1) survenue sur une souche de CHIKV circulant sur l'île de la Réunion

après septembre 2005 a permis au virus d'améliorer son infectivité, sa réplication et sa transmission par *Aedes albopictus* [456,457]. Ce phénomène pourrait expliquer la propagation du virus dans les zones tempérées et l'apparition d'épidémies plus importantes chez l'Homme.

Des modes de transmission non vectorielles sont possibles chez l'Homme notamment la transmission verticale (mère-enfant) [458]. La transmission par transfusion sanguine reste probable même s'il n'existe pas de cas rapportés [459].

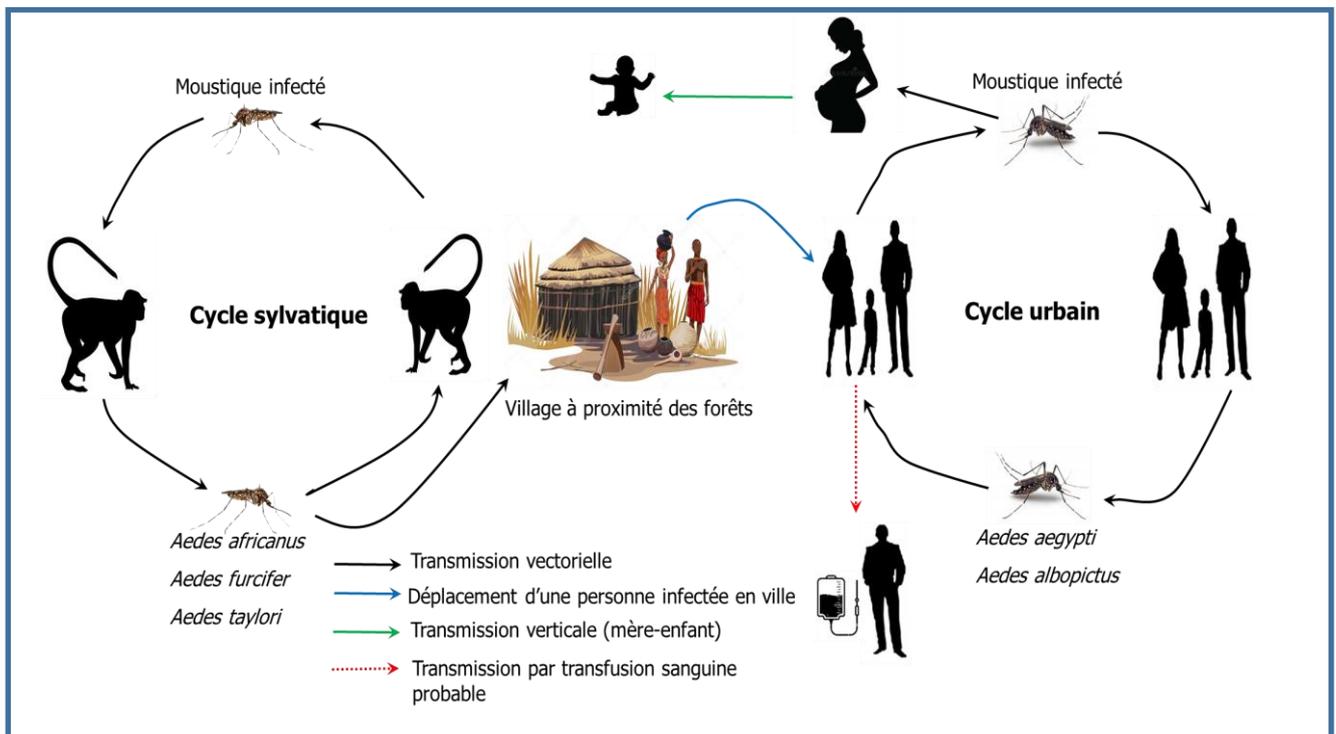


Figure 21 : Cycle de transmission du virus Chikungunya

i) Le virus circule entre les primates non humains et les moustiques de la forêt au cours d'un cycle sylvatique. ii) les moustiques de la forêt pénètrent dans les villages à proximité et transmettent le virus aux humains. iii) les personnes infectées se déplacent des villages vers les villes où les moustiques de la ville du genre Aedes vont assurer la transmission du virus et maintenir ainsi le cycle urbain.

1.4 Manifestations cliniques

Le temps d'incubation après une infection au CHIKV est de 2 à 4 jours. 3 à 25% des personnes infectées sont asymptomatiques [405]. Le reste des individus infectés développe principalement des symptômes à type de fièvre, d'arthralgies et des éruptions cutanées [89]. Chez certains patients, on observe d'autres symptômes tels que des céphalées, des myalgies, des douleurs rétro-orbitaires, des troubles digestifs, des nausées et une fatigue générale [460]. Certains patients notamment les immunodéprimés et les personnes âgées développent des douleurs articulaires sévères invalidantes et des myalgies pouvant persister plusieurs mois voire des années [461,462]. Pendant l'épidémie de CHIKV dans les Caraïbes en 2014, 1/3 des voyageurs ayant contracté la maladie lors de leur séjour ont signalé des douleurs articulaires persistantes plus de 9 mois après leur maladie [463]. Les genoux sont les articulations les plus concernées par les arthralgies même si d'autres articulations peuvent être également atteintes [460]. D'autres complications telles que des méningo-encéphalites, des hépatites, des insuffisances respiratoires et des syndromes de Guillain Barré ont été décrites [460]. Les examens biologiques peuvent faire apparaître une thrombocytopénie (baisse du nombre de plaquettes dans le sang) [423]. Le taux de létalité de la maladie est inférieur à 1 pour 1000 cas [434] mais peut augmenter chez les personnes âgées [464].

Des expériences réalisées sur des primates non humains montrent que lors de la phase aiguë de l'infection, le CHIKV cible les tissus lymphoïdes, le foie, les articulations, les muscles et le système nerveux central. Le virus infecte surtout les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales. Les macrophages constituent le principal réservoir du virus pendant les infections persistantes, d'où la survenue des rhumatismes chroniques [465].

1.5 Diagnostic biologique du virus *Chikungunya*

Les tests moléculaires principalement la PCR et l'isolement du virus dans le sang ou le liquide céphalo-rachidien peuvent être utilisés pendant la phase virémique de la maladie qui peut durer jusqu'à 5-7 jours après l'apparition des signes cliniques. Pendant cette période il est également possible de détecter les antigènes du virus par des tests ELISA ou par immunochromatographie [460,466]. Après ce délai, il faut faire recours à la sérologie pour rechercher les anticorps IgM et/ou IgG. Les IgM apparaissent vers le cinquième jour de l'infection et peuvent persister jusqu'à 3 mois. Les IgG quant à eux apparaissent plus tardivement vers le septième et dixième jour de la maladie et persistent pendant plusieurs années [460] (Figure 22). Cependant des tests de séroneutralisation sont nécessaires pour confirmer les tests ELISA [466]. Différents tests moléculaires et sérologiques ont été développés et disponibles dans le commerce [460].

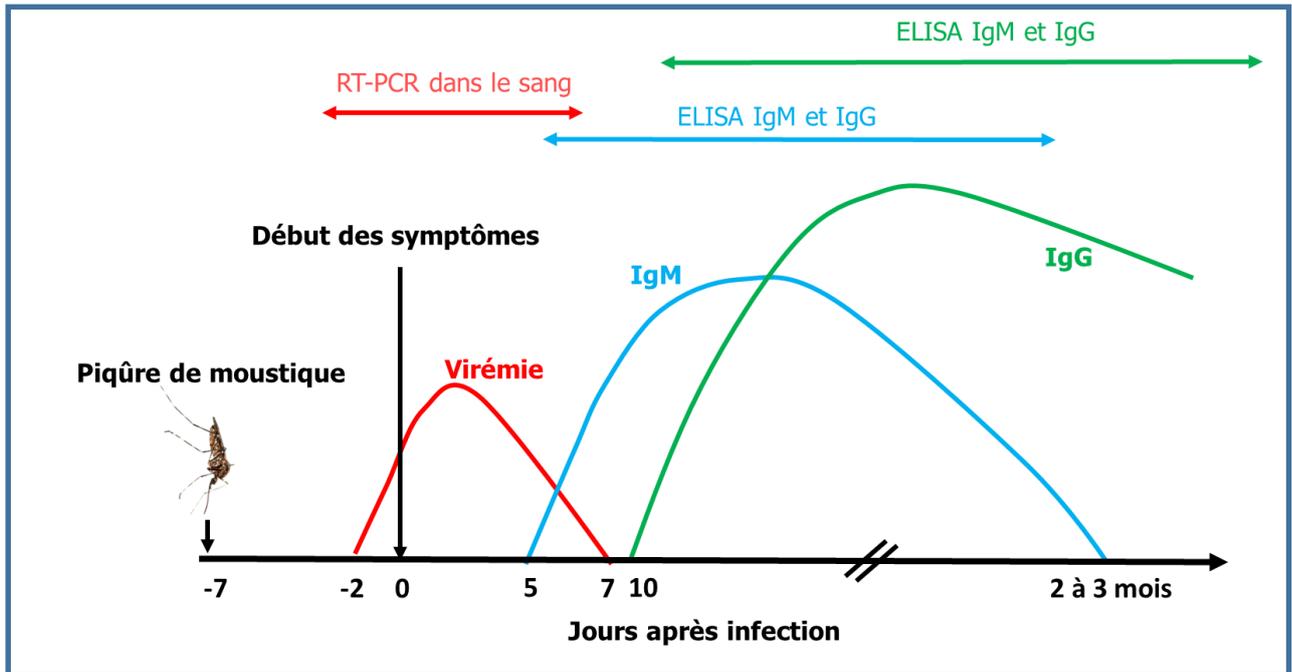


Figure 22 : Cinétique d'apparition des marqueurs biologiques au cours d'une infection par le virus Chikungunya

L'ARN viral est détectable dans le sang jusqu'à 5-7 jours après l'apparition des premiers symptômes. Les IgM apparaissent vers le cinquième jour de l'infection et peuvent persister jusqu'à 2 à 3 mois. Les IgG autour du septième et dixième jour de la maladie et persistent pendant plusieurs années.

2. Le virus O'nyon-nyong

2.1 Epidémiologie

L'ONNV est apparu pour la première fois en Ouganda en 1959 lors d'une épidémie qui avait touché plus de 2 millions de personnes dans plusieurs pays d'Afrique de l'Est [467]. Le virus est endémique en Afrique subsaharienne (Figure 23). Entre 1959 et 1962, des pays comme l'Ouganda, le Kenya, la Tanzanie, le Malawi et la Mozambique ont signalé des épidémies

d'ONNV [58]. Pendant la même période le virus s'est propagé à d'autres parties du continent africain en touchant des pays tels que la République démocratique du Congo, la République centrafricaine, le Cameroun et le Sénégal [58,468,469]. Depuis 1962, le virus n'a plus causé d'épidémies jusqu'en 1996 où il a ré-émergé à nouveau avec une épidémie en Ouganda [470]. En 2009, le Kenya a rapporté une co-circulation d'ONNV et du CHIKV [471]. Plus tard en 2013, l'ONNV a été isolé en Allemagne chez un voyageur de retour du Kenya [472].

Des cas d'ONNV ont été signalés en Afrique central. Des études menées au Cameroun ont montré la circulation du virus dans certaines régions du pays [473,474]. Les anticorps du virus ont été détectés dans la faune sauvage en République démocratique du Congo et au Gabon sur des échantillons collectés entre 1991 et 2011 [475].

Dans le sahel, l'ONNV a été détecté chez un expatrié français ayant séjourné au Tchad en 2004 [476].

En Afrique de l'Ouest, des preuves sérologiques et moléculaires de la circulation d'ONNV ont été rapporté au Nigéria, au Ghana et en Sierra Leone [58]. En 2013, la Côte d'Ivoire a signalé une épidémie chez des réfugiés libériens [477]. Il n'y a pas eu d'études au Burkina Faso concernant l'ONNV.

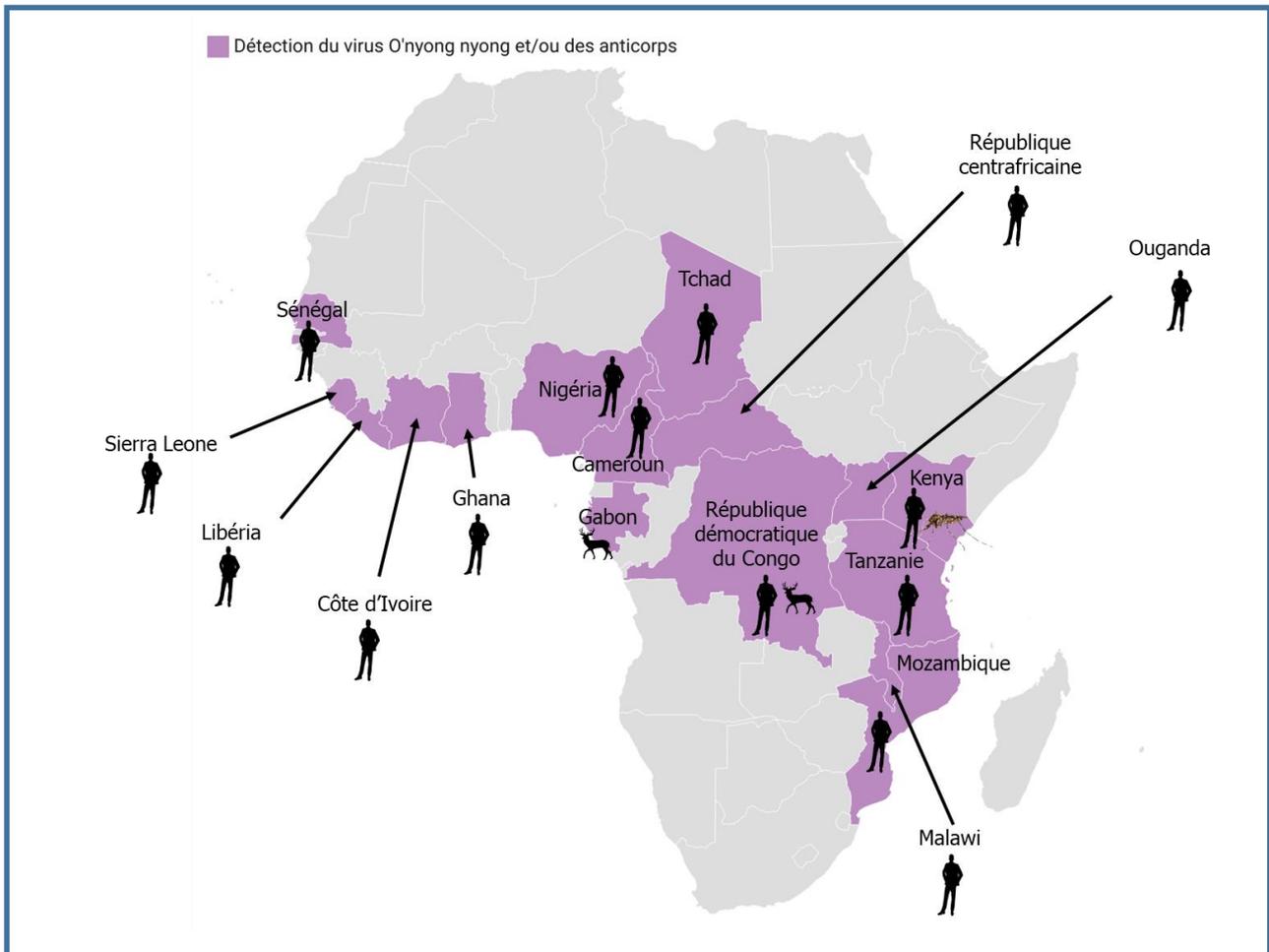


Figure 23 : Distribution du virus O'nyong nyong en Afrique

La couleur violet représente les pays africains ayant enregistré des cas d'ONNV chez les humains, les moustiques ou la faune sauvage.

2.2 Virologie

L'ONNV est un Alphavirus de la famille des *Togaviridae* appartenant au complexe antigénique du SFV [58]. L'ONNV est phylogénétiquement très proche du CHIKV avec qui il partage 90% d'identité des séquences nucléotidiques [478]. Comme les autres membres du genre *Alphavirus*, le génome d'ONNV est un ARN simple brin à sens positif de 11.7 kb possédant 2 ORF. Il contient un domaine non structural à son extrémité 5' constituant les 2/3 de l'ARN et un domaine structural à l'extrémité 3' constituant les 1/3 restants [479]. Le

domaine non structural code pour 4 protéines non structurales (nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4) qui participent à la réplication virale et au traitement des polyprotéines. Les protéines non structurales assurent la synthèse de l'ARNm subgénomique 26S coiffé et polyadénylé qui va produire 5 protéines structurales (la protéine de capsid C, les glycoprotéines E1, E2 et E3 et le polypeptide 6K) [480]. Des données suggèrent que toutes les protéines structurales virales sont indispensables pour l'infection du moustique *Anopheles gambiae* par l'ONNV [481]. L'analyse phylogénétique montre qu'il existe deux clades majeurs avec différentes souches. Un premier clade constitué d'une souche appelée Igbo-Ora et la souche de l'épidémie de 1996 en Ouganda et un second clade constitué d'une souche appelée EVA887, de la souche Kenya 2001 et de la souche Ouganda Gulu de 1959 [58].

2.3 Modes de transmission

Contrairement au CHIKV et aux autres Alphavirus, l'ONNV est l'un des rares Alphavirus qui se transmet par la piqûre des moustiques du genre *Anopheles*. Il s'agit principalement d'*Anopheles funestus* et d'*Anopheles gambiae* qui sont aussi des vecteurs du paludisme [69]. Contrairement à *Aedes* qui a une activité diurne, les Anophèles ont une activité nocturne c'est-à-dire qu'ils prennent leur repas sanguin la nuit [482]. Les larves des moustiques *Anopheles* se développent au niveau des grandes étendues d'eau claire et permanente telles que les lacs, les bords de rivières et les marécages [483]. La transmission de l'ONNV se fait probablement selon 2 cycles : un cycle enzootique où le virus circule entre des vecteurs sauvages et des hôtes réservoirs naturels ; et un cycle épidémique où le virus circule entre les humains et les vecteurs urbains (*Anopheles funestus* et *Anopheles gambiae*). Cependant les vecteurs enzootiques et les hôtes réservoirs naturels restent inconnus [58]. Des modes de transmission inter humaines n'ont pas été documentés.

2.4 Manifestations cliniques

L'infection à l'ONNV a une symptomatologie semblable à celle du CHIKV. Le temps d'incubation est d'environ 8 jours. Les personnes infectées présentent de la fièvre, des douleurs articulaires (grosses articulations), des céphalées, des éruptions cutanées, une lymphadénite (inflammation des ganglions lymphatiques) et des conjonctivites. Des signes hémorragiques notamment des gingivorragie (saignements des gencives) et des épistaxis (saignements du nez) ont été observés quelques rares fois. La définition clinique d'une infection à l'ONNV se base sur la présence de trois signes cliniques chez les patients: une fièvre, une polyarthralgie et une lymphadénopathie. Pendant l'épidémie de 1961 en Ouganda, 40% des patients ont présenté une combinaison de douleurs articulaires, d'éruptions cutanées et de lymphadénopathie avec ou sans fièvre.

La maladie dure en général quelques jours et les malades peuvent rester immobilisés pendant une durée moyenne de 4 jours. Cependant on note une persistance des douleurs articulaires chez certains patients. Aucun cas de décès lié chez l'homme à l'infection à l'ONNV n'a été signalé. Cependant les malades peuvent rester des jours sans pouvoir travailler, ce qui peut avoir un impact économique sur les pays touchés par des épidémies.

2.5 Diagnostic biologique du virus O'nyong nyong

Les tests moléculaires principalement la PCR pour la détection de l'ARN viral et l'isolement du virus dans le sang peuvent être réalisés pendant la phase virémique de la maladie qui peut durer 3 jours à une semaine après l'apparition des signes cliniques [58]. Même s'il n'existe pas de tests moléculaires commerciaux ciblant l'ONNV, plusieurs tests PCR maison ont été développés [484–486].

Les tests sérologiques principalement l'ELISA pour la recherche des anticorps IgM et IgG peuvent être réalisés plus tardivement lorsque le virus n'est plus détectable dans le sang par les tests moléculaires [58]. On dispose de peu d'informations sur la cinétique d'apparition des anticorps d'ONNV. Des données suggèrent que les IgM apparaissent généralement 2 semaines après le début de la maladie et persistent pendant environ 2 mois [476,487]. Cependant d'autres études suggèrent que les IgM persistent pendant 6 mois ou plus [476]. Concernant les IgG, seulement 2 études ont été réalisées pour déterminer leur période d'apparition dans le sang au cours de l'infection. Dans une de ces études on a observé que la séroconversion IgG survenait 26 jours après le début de la maladie tandis que dans l'autre étude, on a trouvé que le pic d'IgG apparaissait 68 jours après le début de la maladie [472,476]. Il n'existe pas de kits commerciaux pour les tests sérologiques d'ONNV [488] et des tests de séroneutralisation sont nécessaires pour distinguer les anticorps d'ONNV de ceux du CHIKV [489].

VII. Traitement et prévention contre les arbovirus

1. Traitement

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif contre les arbovirus malgré les pistes de traitement en étude [370]. Le traitement est uniquement symptomatique. En plus du repos, les malades doivent s'hydrater régulièrement pour lutter contre la déshydratation en cas de diarrhées et de vomissements ; des analgésiques et des antipyrétiques sont nécessaires en cas de fièvre [11]. Dans le cas des arbovirus responsables d'arthralgies, l'usage des analgésiques et des anti-inflammatoires non stéroïdiens est recommandé pour soulager les douleurs [460,490]. L'aspirine et les anti-inflammatoires non stéroïdiens sont à éviter dans les cas d'infection par les arbovirus tels que le DENV parce que pouvant augmenter les risques d'hémorragie par altération de la fonction plaquettaire [90]. Dans le cas par exemple de l'infection au ZIKV, les anti-inflammatoires non stéroïdiens peuvent être utilisés seulement si une infection par le DENV est écartée [11].

Dans le cas du CHIKV, plusieurs pistes de traitement sont à l'étude et montrent des résultats encourageants. La chloroquine a montré des capacités à inhiber la réplication du CHIKV *in vitro* dans les cellules véro même si une efficacité *in vivo* n'a pas encore été démontrée [491]. Une expérience réalisée sur des souris infectées par le CHIKV montre que la ribavirine et la doxycycline agissent en synergie pour réduire la charge virale et l'inflammation [492]. L'utilisation d'anticorps monoclonaux dirigés contre les protéines E1 et E2 du CHIKV chez les primates non humains a montré une protection de ces animaux contre une infection après exposition au CHIKV [493].

Pour le cas de ONNV, des expériences réalisées sur des souris montrent l'importance de l'interféron de type I dans la protection contre l'infection à l'ONNV, alors que le système immunitaire adaptative s'est avéré peu important dans l'infection aiguë [473].

2. Prévention

Etant donné l'inexistence de traitement curatif, le meilleur moyen de lutte contre les arbovirus demeure la prévention qui consiste à la lutte anti-vectorielle et au développement de vaccins.

❖ Lutte anti-vectorielle et autres moyens de lutte

La lutte anti-vectorielle et la protection individuelle restent les meilleurs moyens de prévention pour réduire la propagation des arbovirus notamment ceux dont il n'existe pas de vaccins. Cette lutte anti-vectorielle est basée sur la destruction des gîtes larvaires et la pulvérisation intra domiciliaire. Des mesures individuelles telles que l'utilisation de répulsifs corporels et le port de vêtements longs, l'usage des moustiquaires pourraient également être efficaces pour éviter les piqûres des moustiques [370]. La mise en place de programmes de surveillance de l'avifaune pourrait permettre d'anticiper les futures épidémies aux arbovirus tels que le WNV et l'USUV.

En Afrique de l'Ouest la lutte anti-vectorielle est rendue difficile par son coût élevé et par le fait que la plus part des infections aux arbovirus ne sont pas toujours considérées comme des priorités sanitaires pour la majorité des pays endémiques.

D'autres mesures de prévention existent pour certains arbovirus tels que le ZIKV et consistent à l'abstinence ou à l'utilisation des préservatifs lors des rapports sexuels au moins six mois après l'apparition des symptômes pour les hommes ayant contracté la maladie [172].

❖ Vaccins

Des vaccins efficaces existent chez l'homme pour certains arbovirus. C'est le cas du vaccin contre la fièvre jaune et le vaccin contre l'encéphalite japonaise [63,494]. Malgré l'existence de ces vaccins on observe une persistance de la survenue d'épidémies de fièvre jaunes dans certaines régions africaines [495].

Un vaccin contre la dengue a été développé par Sanofi Pasteur depuis 2016 (**Dengvaxia®**). Cependant ce vaccin a montré de nombreuses limites notamment une efficacité moindre chez les personnes n'ayant jamais été infectées par rapport à ceux ayant déjà fait une primo-infection et une exacerbation de survenue de dengue sévère chez les jeunes enfants. Le vaccin augmenterait également le risque de survenue d'une dengue sévère chez les sujets vaccinés n'ayant jamais été en contact avec le virus [496]. Pour cette raison le vaccin est uniquement indiqué chez les personnes vivant dans des zones d'endémie et ayant un antécédent prouvé d'infection par le virus de la dengue. D'autres candidats vaccins contre la dengue sont en cours d'évaluation [88].

Il n'existe pas à ce jour de vaccins homologués contre de nombreux arbovirus chez l'homme. Cependant, plusieurs vaccins utilisant diverses technologies sont actuellement en développement : il s'agit de vaccins vivants atténués, de vaccins à sous unités, de vaccins recombinants et de vaccins à ADN entre autres [497]. Les vaccins les plus avancés contre le

ZIKV sont en phase 1 [498]. Un candidat vaccin contre le CHIKV a montré une protection croisée contre l'ONNV chez les souris [499]. Les multiples vaccins en développement contre le CHIKV pourraient alors être potentiellement efficaces contre l'ONNV [497]. Plusieurs vaccins contre le WNV chez l'Homme sont en développement selon différentes approches [500,501]. L'armée américaine a développé des vaccins inactivés contre l'EEE, le WEE, le VEE et le CHIKV qui sont utilisés par les travailleurs de laboratoires. Ces vaccins induisent des protections de courte durée et nécessitent des doses de rappels périodiques. Ils ne sont pas homologués et ne peuvent donc pas être utilisés à l'échelle mondiale [502].

Des vaccins pour usage vétérinaire existent cependant contre certains arbovirus. Ainsi, on dénombre quatre vaccins (2 vaccins inactivés, un vaccin vivant utilisant un vecteur et un vaccin chimère à Flavivirus inactivé) contre le WNV homologués utilisés chez les chevaux [503]. Des vaccins à usage vétérinaire contre le WEE, l'EEE et le VEE sont également disponibles pour les chevaux [504].

Chapitre 2 : Objectifs et hypothèses de thèse

Les maladies infectieuses demeurent l'un des principaux facteurs de morbidité et de mortalité dans le monde. En comparaison aux autres régions du monde, l'Afrique Sub-saharienne porte une charge anormalement élevée de la morbidité et de la mortalité en raison des maladies infectieuses. Les étiologies de ces maladies infectieuses ne sont pas toujours connues et nécessiteraient des investigations plus poussées. Très peu de données probantes sont disponibles sur les sites sentinelles des différents pays.

Une surveillance des arbovirus chez les moustiques a été effectuée au Burkina Faso de 1983 à 1986. Cette étude qui a été réalisée au sud-ouest du pays a permis de détecter le virus de la fièvre jaune et le virus de la dengue [505]. Une étude réalisée en 2010 sur les patients fébriles a mis en exergue le poids des fièvres d'étiologies inconnues sur la santé des populations au Burkina Faso. En effet cette étude rapporte que 78% et 36% des infections fébriles enregistrées respectivement en saison sèche et en saison pluvieuse étaient d'étiologies inconnues.

Depuis ces dernières décennies on note une émergence et une réémergence de certains arbovirus au Burkina Faso. De 2006 à 2008, 4 touristes rentrant en France en provenance du Burkina Faso ont été diagnostiqués positifs à la dengue. Au cours des mois d'octobre à novembre 2013, 111 cas suspects de dengue ont été testés avec 33 cas positifs dans la ville de Ouagadougou. Plus récemment en 2016 et 2017, le Burkina Faso a connu des grosses épidémies urbaines de dengue déclenchant l'inquiétude des autorités sanitaires. Enfin, dans le cadre de la surveillance nationale de la fièvre jaune, le Burkina Faso a enregistré plus de 100 cas positifs entre 2001 et 2018 (source : LNR-FHV, données non publiées).

La circulation du DENV et du YFV et le nombre élevé de maladies fébriles d'étiologies inconnues nous amène à poser les hypothèses selon lesquelles, plusieurs autres arbovirus

circuleraient au Burkina Faso et qu'il existe un manque d'information sur l'épidémiologie de ces virus.

L'objectif de mon travail était d'évaluer les risques d'émergence et de comprendre les mécanismes d'épidémisation des arbovirus au Burkina Faso. Pour atteindre cet objectif, nous avons ciblé 6 arbovirus (DENV, ZIKV, USUV, WNV, CHIKV et ONNV) en utilisant une approche « One Health ». Parmi ces virus sus cités, seule la circulation du DENV a été formellement établit en lien avec les épidémies identifiées. Une seule étude publiée récemment en juin 2022 a mis en évidence les anticorps du CHIKV dans des échantillons de sang collectés en 2015 à Ouagadougou. Concernant les autres virus (ZIKV, USUV, WNV et ONNV), aucune preuve formelle de leur circulation au Burkina Faso n'a été rapportée.

Nous avons donc recherché la présence de ces virus chez les vecteurs (moustiques), les réservoirs (animaux domestiques) et les hôtes (humains) dans 2 zones géographiques du Burkina Faso (Ouagadougou et Bobo Dioulasso) selon des approches sérologiques et moléculaires.

Le but de final ce projet est d'anticiper de futures situations épidémiques impliquant des arbovirus au Burkina Faso, en proposant des mesures de surveillance, de prévention et de contrôle sanitaires adéquates.

Chapitre 3 : Résultats - Productions scientifiques

1. Circulation des virus Zika et dengue au Burkina Faso

Le ZIKV et le DENV sont deux arbovirus étroitement liés de la famille des Flaviviridae, tous deux transmis par des moustiques du genre *Aedes*, et font partie des arbovirus les plus à risque pour la santé humaine. Depuis 2013, le Burkina Faso est confronté à une recrudescence des épidémies de DENV. Contrairement au DENV, il n'existe aucune preuve de la circulation du ZIKV chez l'homme au Burkina Faso. L'objectif principal de notre étude était de déterminer la séroprévalence du ZIKV et du DENV chez les donneurs de sang au Burkina Faso. 501 échantillons de donneurs collectés dans les deux principales villes du pays en 2020 ont d'abord été testés par un test immuno-enzymatique compétitif pour détecter les anticorps anti-Flavivirus. Les sérums positifs ont ensuite été testés à l'aide de la technologie Luminex pour détecter les anticorps anti-ZIKV et anti-DENV. Des protéines NS1 recombinantes pour le ZIKV et pour les quatre sérotypes du DENV ont été couplées à des billes Luminex pour détecter les immunoglobulines G (IgG) dirigées contre ces antigènes. Par la suite des tests de séroneutralisation spécifiques du virus contre le ZIKV ont été réalisés. La séroprévalence du ZIKV était de 22,75% dans les échantillons des donneurs et nous avons trouvé une séropositivité pour tous les sérotypes de DENV allant de 19,56% pour le DENV-1 à 48,86% pour le DENV-2. Les analyses moléculaires pour la recherche du ZIKV effectuées sur des échantillons de patients fébriles et pour la recherche du ZIKV et du DENV sur des échantillons de moustiques *Aedes aegypti* collectés par nos collaborateurs au CIRAD (Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement) et à l'IRSS (Institut de recherche en science de la santé du Burkina Faso), entre 2019 et 2021 étaient négatives. Notre étude a montré une circulation importante du ZIKV et du DENV détectés par sérologie bien que la preuve moléculaire de la circulation du ZIKV n'ait pu être démontrée. Il est essentiel de

Chapitre 3 : Résultats-Productions scientifiques

renforcer la surveillance actuelle des arbovirus au Burkina Faso et plus largement en Afrique de l'Ouest en se focalisant sur les fièvres d'étiologie inconnue et en intégrant la surveillance des vecteurs pour évaluer l'étendue de la circulation du ZIKV et identifier la ou les souche(s) circulante(s).

Article

Serological Evidence of Zika Virus Circulation in Burkina Faso

Bachirou Tinto ^{1,2,*} , Didier Patindé Alexandre Kaboré ³, Dramane Kania ², Thérèse Samdapawindé Kagoné ², Alice Kiba-Koumaré ⁴, Laura Pinceloup ¹, Guillaume Thaurignac ⁵ , Philippe Van de Perre ¹, Roch Kounbobr Dabire ³ , Thierry Baldet ⁶ , Serafin Gutierrez ⁶ , Patricia Gil ⁶, Ahidjo Ayoubou ⁵ , Sara Salinas ^{1,*} ,† and Yannick Simonin ^{1,*} ,†

- ¹ Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, INSERM, University of Montpellier, 34000 Montpellier, France; laura.pinceloup-sosa@etu.umontpellier.fr (L.P.); p-van_de_perre@chu-montpellier.fr (P.V.d.P.)
- ² Centre MURAZ, Institut National de Santé Publique (INSP), Bobo-Dioulasso BP 390, Burkina Faso; draka3703@yahoo.fr (D.K.); tskagone@gmail.com (T.S.K.)
- ³ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso BP 390, Burkina Faso; kapda0123@gmail.com (D.P.A.K.); dabiroch@gmail.com (R.K.D.)
- ⁴ Centre National de Transfusion Sanguine, Ouagadougou BP 5372, Burkina Faso; alice_kiba@yahoo.fr
- ⁵ Recherches Translationnelles sur le VIH et Maladies Infectieuses, Université de Montpellier, IRD, Inserm, 34000 Montpellier, France; guillaume.thaurignac@ird.fr (G.T.); ahidjo.ayoubou@ird.fr (A.A.)
- ⁶ ASTRE Research Unit, CIRAD, INRAE, Montpellier University, 34000 Montpellier, France; thiery.baldet@cirad.fr (T.B.); serafin.gutierrez@cirad.fr (S.G.); patricia.gil@cirad.fr (P.G.)
- * Correspondence: tintobachirou@yahoo.fr (B.T.); sara.salinas@inserm.fr (S.S.); yannick.simonin@umontpellier.fr (Y.S.)
- † These authors contributed equally to this work.



Citation: Tinto, B.; Kaboré, D.P.A.; Kania, D.; Kagoné, T.S.; Kiba-Koumaré, A.; Pinceloup, L.; Thaurignac, G.; Perre, P.V.d.; Dabire, R.K.; Baldet, T.; et al. Serological Evidence of Zika Virus Circulation in Burkina Faso. *Pathogens* **2022**, *11*, 741. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070741>

Academic Editor: Fengwei Bai

Received: 9 June 2022

Accepted: 25 June 2022

Published: 29 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Zika virus (ZIKV) and dengue virus (DENV) are two closely related members of the *Flaviviridae* family, both transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, and are among the arboviruses most at risk to human health. Burkina Faso has been facing an upsurge in DENV outbreaks since 2013. Unlike DENV, there is no serological evidence of ZIKV circulation in humans in Burkina Faso. The main objective of our study was to determine the seroprevalence of ZIKV and DENV in blood donors in Burkina Faso. A total of 501 donor samples collected in the two major cities of the country in 2020 were first tested by a competitive enzyme-linked immunosorbent assay to detect flavivirus antibodies. Positive sera were then tested using Luminex to detect ZIKV and DENV antibodies and virus-specific microneutralization tests against ZIKV were performed. The ZIKV seroprevalence was 22.75% in the donor samples and we found seropositivity for all DENV-serotypes ranging from 19.56% for DENV-1 to 48.86% for DENV-2. Molecular analyses performed on samples from febrile patients and *Aedes aegypti* mosquitoes between 2019 and 2021 were negative. Our study showed the important circulation of ZIKV and DENV detected by serology although molecular evidence of the circulation of ZIKV could not be demonstrated. It is essential to strengthen existing arbovirus surveillance in Burkina Faso and more broadly in West Africa by focusing on fevers of unknown origin and integrating vector surveillance to assess the extent of ZIKV circulation and identify the circulating strain. Further studies are needed to better understand the epidemiology of this virus in order to define appropriate prevention and response methods.

Keywords: Zika virus; dengue virus; flavivirus; arbovirus; seroprevalence; Burkina Faso

1. Introduction

Zika (ZIKV) and dengue (DENV) viruses are arthropod-borne viruses (arboviruses) belonging to the *Flaviviridae* family of the *Flavivirus* genus. These viruses are transmitted to humans through the bite of infected mosquitoes from the *Aedes* genus, mainly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* [1,2]. There are also cases of non-vectorial transmission by blood transfusion, accidental exposure to biological fluids among healthcare personnel

or nosocomial transmission, mother-to-child transmission (vertical transmission), and sexual transmission, in particular with ZIKV [1,2]. Importantly, the clinical diagnosis of these viruses is difficult in areas endemic to malaria because the symptoms may appear similar [3].

ZIKV is endemic in all tropical regions of the world: Africa, the Americas, and Southeast Asia [4]. The virus was first identified in 1947 in a rhesus monkey in the Zika forest in Uganda and the first human case was reported in 1954 in Nigeria [5]. Only 14 human cases were reported before 2007 [6]. Similar to many arboviruses, the majority of ZIKV-infected patients are asymptomatic [7]. The clinical picture of ZIKV infection was correctly established after the epidemic in Yap in 2007, with fever, rash, arthralgia, and conjunctivitis as the most common symptoms [8]. The same clinical picture was observed during the outbreaks in French Polynesia and Brazil, in 2013 and 2015, respectively [9,10]. During the later epidemics, numerous cases of neurological complications such as Guillain-Barre and neurodevelopmental deficits, (e.g., microcephaly) in children born to infected mothers as well as other neurological syndromes such as meningitis or meningoencephalitis have been observed [11].

DENV is endemic in more than 100 countries, mostly in urban and semi-urban areas, in Africa, Asia, and America. These last two continents are the most affected. The global incidence of dengue has grown dramatically with about half of the world's population now at risk. Circulation of the virus in West Africa was first reported in Nigeria in the 1960s [12]. Dengue fever is the most common arboviral disease in the world and is due to four different serotypes: DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 [13]. Infection with one of the serotypes does not confer long-term cross-protection [2]. The disease is asymptomatic in the majority of cases. However, some patients experience symptoms such as fever, myalgia, arthralgia, anorexia, retro-orbital pain, nausea and vomiting, sore throat, headache, and rash. Neurological and bleeding complications may occur in some cases [14]. There is no specific treatment for dengue/severe dengue. Early detection of disease progression associated with severe dengue, and access to proper medical care lowers fatality rates of severe dengue to below 1%. Studies have shown that sequential infection with different DENV serotypes increases the risk of complications that can lead to death [15]. This phenomenon called antibody-dependent enhancement (ADE) is also observed in patients who have been exposed to ZIKV and subsequently contracted dengue [16].

In Burkina Faso, there has been an upsurge in dengue fever epidemics since 2013 [2]. All four DENV serotypes have already been identified in the country since the first suspected case was reported in 1925 [2]. Unlike DENV, there is no molecular and serological evidence of ZIKV circulation in humans in this country. The objective of our study was to determine the seroprevalence in Burkina Faso of ZIKV and DENV in blood donors and to carry out a molecular screening of ZIKV on samples of febrile patients and mosquitoes (*Aedes aegypti*).

2. Results

2.1. Serological Screening for ZIKV and DENV in Blood Donor

To assess the circulation of ZIKV and the different DENV serotypes in Burkina Faso, we analyzed blood donor samples from two regional blood transfusion centers for the year 2020, including 114 (22.75%) women (median age: 28 years; interquartile range (IQR): 24–35.75 years) and 387 (77.25%) men (median age: 28 years; IQR 24–35 years). From those 501 serum samples screened by competitive enzyme-linked immunoabsorbent assay (cELISA) to detect prior flavivirus infection, we identified antibodies against flaviviruses in 400 samples (79.84%, 95% CI: 76.10–83.12). These cELISA-positive samples were then tested with Luminex-based serological assay using the NS1 antigens of ZIKV and for the four DENV serotypes (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4). We found 229 samples positive for ZIKV (representing 45.70% of the total samples, CI 95%: 41.39–50.08), 98 positives for DENV-1 (19.56%, 95% CI: 16.32–23.26), 280 positives for DENV-2 (48.86%, 95% CI: 44.79–51.13), 204 DENV-3 positive (40.71%, 95% CI: 36.50–45.07) and 199 DENV-4

positive (39.72%, 95% CI: 35.53–44.06) (Table 1). Ninety-four (18.76%) people carried antibodies against the four DENV serotypes. Since ZIKV is not described as circulating in Burkina Faso, unlike dengue virus, to confirm the presence of anti-ZIKV antibodies in blood donor samples, all ZIKV Luminex-positive samples were tested by microneutralization tests (MNT). We found 114 positives (22.75%, 95% CI: 19.29–26.62) with high neutralizing antibody titer (Table 2).

Table 1. Luminex and MNT results in blood donor samples tested positive for flaviviruses by Elisa. 2021. N = 501.

	Luminex Positive N (%)					
	DENV1 NS1 Ab (%)	DENV2 NS1 Ab (%)	DENV3 NS1 Ab (%)	DENV4 NS1 Ab (%)	ZIKV NS1 Ab (%)	MNT ZIKV Positive N (%)
Total	98 (19.56)	280 (55.88)	204 (40.71)	199 (39.77)	229 (45.39)	114 (22.75)
Origin						
Ouagadougou	63 (24.60)	164 (64.06)	126 (49.21)	122 (47.65)	127 (49.60)	71 (27.73)
Bobo-Dioulasso	35 (14.28)	116 (47.34)	78 (31.83)	77 (31.42)	102 (41.63)	43 (17.55)
Gender						
Male	69 (17.82)	223 (57.62)	158 (40.82)	159 (41.08)	187 (48.32)	90 (23.25)
Female	29 (25.43)	57 (50.0)	46 (40.34)	40 (35.08)	42 (36.84)	24 (21.05)
Age						
18–24	28 (16.47)	81 (47.64)	53 (31.17)	56 (32.94)	63 (37.05)	27 (15.88)
25–34	37 (18.78)	106 (53.80)	79 (40.10)	70 (35.53)	92 (46.70)	45 (22.84)
35–44	25 (26.31)	67 (70.52)	55 (57.89)	55 (57.89)	54 (56.84)	31 (32.63)
45–59	8 (20.51)	26 (66.66)	17 (43.58)	18 (46.15)	20 (51.28)	11 (28.20)

DENV: Dengue virus; ZIKV: Zika virus; NS: non-structural protein; Ab: antibody; MNT: microneutralization test; N: number.

Table 2. Anti-ZIKV antibody titer in blood donor samples after MNT tests.

ZIKV Antibody Titer	Number of Sample N (%)
15	11 (9.64)
22.5	28 (24.56)
45	21 (18.42)
67.5	18 (15.78)
135	14 (12.28)
202	1 (0.87)
202.5	3 (2.63)
405	7 (6.14)
607.5	6 (5.26)
1215	2 (1.75)
1837.5	2 (1.75)
3675	1 (0.87)
Total	114 (100)

We did not find a significant association between the sex of blood donors and ZIKV seroprevalence while there was a statistically significant difference between origin and age and ZIKV seroprevalence. Blood donors from Ouagadougou city were the most affected and ZIKV seroprevalence increased with age (Table 3).

Table 3. ZIKV seroprevalence according to the socio-demographic characteristics of the blood donors.

Variable	Positive N (%)	Odds Ratio IC95%	p-Value
Origin			0.0076 *
Ouagadougou	71 (27.73)	1	
Bobo-Dioulasso	43 (17.55)	0.55 [0.36–0.84]	
Gender			0.7034
Male	90 (23.25)	1	
Female	24 (21.05)	0.88 [0.53–1.46]	
Age			0.0148 *
18–24	27 (15.88)	1	
25–34	45 (22.84)	1.57 [0.93–2.66]	
35–44	31 (32.63)	2.57 [1.42–4.66]	
45–59	11 (28.20)	2.08 [0.93–4.67]	

* $p < 0.05$.

2.2. Molecular Screening for ZIKV and DENV in Samples from Febrile Patients and Aedes aegypti Mosquitoes

With RT-qPCR, we analyzed ZIKV RNA in samples from febrile patients collected in 2019 as part of the national surveillance of dengue and yellow fever in Burkina Faso. About 26% of samples collected in Burkina Faso in 2019 were positive for DENV PCR. We, therefore, selected 340 samples among the negative DENV samples that we analyzed by RT-PCR for ZIKV. No ZIKV-positive samples were detected in this specific cohort. Additionally, a total of 1356 *Aedes aegypti* no-blood-engorged females were collected in the Hauts-Bassins and southwest region of Burkina Faso, in both rural and urban areas, in 2019 (147 females), 2020 (863 females), and 2021 (346 females). We did not identify the presence of ZIKV or DENV in mosquitoes. It should be noted that the national arbovirus surveillance program reported a few sporadic cases of DENV in 2020 and 2021 without noticing major outbreaks.

3. Discussion

DENV has become endemic in Burkina Faso with recurrent outbreaks since 2013 [2]. After the dengue epidemics that the country has experienced, there have been no studies to estimate the level of immunity of the population according to the different serotypes. To be fully immune to new dengue infections, it is necessary to have antibodies against all four serotypes. In our study we identified all four DENV serotypes in the blood donor cohort with a predominance of serotype 2 (48.86%); serotype 1 being the least represented (19.56%). Our results are consistent with those obtained in previous studies that reported the presence of the four serotypes, with a predominance of serotype 2, in previous epidemics in the country [17–19]. In our study, only 94 people had antibodies against all four serotypes, representing 18.4% of the cohort, which means that the vast majority of people are likely to be infected with different dengue serotypes against which they do not have effective antibodies. For example, an introduction of serotype 1, for which the Burkinabe population has the least antibodies, could lead to new epidemics and potentially severe clinical cases as sequential infections are known to increase the risk of severe dengue [20]. Therefore, monitoring serotypes would be important to anticipate future epidemics in the country. Other studies carried out in the general population in neighboring countries have identified DENV serotypes 2 and 3 in Côte d’Ivoire [21], and DENV serotype 2 in Ghana and Mali [22,23]. All four DENV serotypes have also been identified in Nigeria and Senegal [2,24,25].

Unlike DENV, the circulation of ZIKV has never been clearly established in Burkina Faso despite the surveillance of arboviruses implemented since 2016 [26]. A serological survey of the general population carried out from 1963 to 1964 showed serological evidence of the circulation of the ZIKV in the present-day Republic of Haute-Volta (now Burkina Faso) [27]. Our study is the first to be carried out since the major epidemics of ZIKV the world experienced in 2007, 2013, and 2015 [8,9]. We found a high seroprevalence (22.6%) of ZIKV among blood donors in Burkina Faso. This percentage is close to the 21.9% and 22.7%

seroprevalence obtained in Senegal in 2007 and 2011/2012, respectively [28]. Our results are higher than in Mali, a country bordering Burkina Faso, which detected 12% of positives between 2013 and 2016 [29]. We found statistically significant associations between ZIKV seroprevalence and the location of blood donors. Donors from Ouagadougou had a higher seroprevalence (27.73%) compared to those from Bobo-Dioulasso (17.55%). Ouagadougou has a higher population density than Bobo-Dioulasso and also has problems with access to water and sanitation. These factors could increase the risk of vector proliferation and therefore arbovirus transmission. The ZIKV seroprevalence increased with age with a peak in the 35 to 44 age group with a seroprevalence of 32.63%. In Burkina Faso, this age group represents the most active part of the population and therefore spends more time outdoors compared to the younger and older age groups and are likely to be more exposed to mosquito bites. Our results are comparable to those of Diarra et al. who found in a study carried out in Mali that ZIKV seroprevalence increased with age [29]. We did not observe any statistically significant difference between seroprevalence and sex. Men and women seem to be exposed to the same degree as previously reported in Mali [29].

Despite a high seroprevalence, we did not obtain positive results for ZIKV in the RT-qPCR performed on the human fever cohort or mosquito samples. This result implies that either the virus may have been in circulation at low levels during the study period, causing mainly asymptomatic cases within the population, or that the virus may have been transmitted in previous years. Indeed the detection of arbovirus RNA is difficult and rare outside of epidemic periods. Added to this is the short viremia observed during infection with arbovirus including ZIKV [30]. Furthermore, in the literature, we have not encountered any cases of microcephaly in newborns or Guillain-Barre reported in Burkina Faso, even though these two neurological symptoms are typical of complications due to infection with ZIKV. However, these neurological disorders are relatively rare outcomes and African and Asian lineages may have differential virulence [31]. Moreover, it is not clear if the African lineage of ZIKV has the capacity to cause microcephaly or not. In addition, health care systems in some regions are limited and one cannot exclude un-reported cases. It is important to note that RT-PCR testing for DENV in *Aedes aegypti* mosquitoes was negative despite the existence of molecular evidence of DENV circulation in humans in Burkina Faso [18,32]. This result could be due to the low number of mosquitoes tested. In general, the detection of arboviruses in natural mosquito populations is not very sensitive unless mosquito collections are carried out during a major circulation of the virus or during an epidemic [33]. As a reminder, surveillance of arboviruses was initiated in Burkina Faso in 2016, some ten years after the emergence of the first major ZIKV epidemics in Yap and French Polynesia. It is possible that human cases of ZIKV may have gone unnoticed in Burkina Faso or in Africa in general due to the low diagnostic and surveillance capacity of most African countries [34]. Studies showed differential transmission efficiency of the African strain of ZIKV compared to the Asian strain by *Aedes Aegypti* [35,36].

Given that prior exposure to ZIKV could potentially cause an ADE effect in the event of a subsequent dengue virus infection, the circulation of ZIKV could increase the number of severe cases in future dengue fever epidemics in Burkina Faso. The circulation of different dengue serotypes could also be a factor favoring the occurrence of severe forms of the disease [37].

It should be noted that we observed differences between Luminex and MNT tests. This makes sense because the NS1 protein, used for Luminex, is an internal protein, which is not the target of neutralizing antibodies. Furthermore, even for surface proteins, not all specific antibodies are neutralizing. It is therefore logical that we observed higher results with an NS1-based test compared to a test detecting neutralizing antibodies.

Our study has shown a high level of DENV and ZIKV seroprevalence in Burkina Faso although molecular evidence of the circulation of ZIKV could not be demonstrated. It is therefore essential to strengthen the existing arbovirus surveillance by focusing on fevers of unknown origin and by integrating vector surveillance. Our results also show the importance of setting up a good program for the prevention and expanded management

of the main arboviruses circulating in Burkina Faso. A retrospective study of newborn cohorts covering the last 10 years would be interesting to identify whether there have been undocumented cases of congenital malformations such as microcephaly that could be attributable to ZIKV.

4. Materials and Methods

4.1. Samples

4.1.1. Blood Donors

The blood donor samples included in our study came from regional blood transfusion centers in the cities of Ouagadougou and Bobo-Dioulasso. A total of 501 serum samples (256 in Ouagadougou and 245 in Bobo-Dioulasso) were collected from June to July 2020. At least 600 µL of serum were taken from each participant and sent to the National Reference Laboratory for Viral Hemorrhagic Fevers at the Centre MURAZ Center in Bobo-Dioulasso to be stored at -80°C before the serological tests.

4.1.2. Febrile Patients

Three hundred and forty fever samples collected as part of arbovirus surveillance in Burkina Faso in 2019 and stored at -80°C in the biobank at the Centre MURAZ were included in our study. In the present study, we selected 340 samples that had already been tested with dengue fever RT-PCR and were negative. These samples were then screened with ZIKV RT-PCR in our study.

4.1.3. Mosquito Sampling

Mosquito collection was carried out in August, September 2019; June, July, and October 2020, and May, June 2021. Mosquitoes were collected in several areas from the Hauts-Bassins and southwest region of Burkina Faso. In the Hauts-Bassins region, the sampling was carried out in seven localities: Bobo-Dioulasso, Banakeledaga, Sourkoudougou, Badara, Vallée du Kou 3 (VK3), Nasso and Dinderesso. In the southwest region, sampling was carried out in six sites: Diébougou, Gaoua, Bapla, Tiankoura, Banlo and Bouroum-bouroum.

Sampling was carried out over two successive days in each locality. Two methods were used: the BG-Sentinel traps and the Prokopack aspiration. The various specimens (living) were identified morphologically to the species level using the identification keys [38–40]. Non-blood-engorged females of *Aedes aegypti* were sorted and stored at -80°C for subsequent analyses.

Mosquitoes were pooled in groups of 6 to 37 individuals per site and collection date. Pools were homogenized in 500 µL ice-cold 1X-PBS (Phosphate Buffered Saline) buffer with two ice-cold steel bearing balls (3 mm diameter, LOUDET) using a TissueLysor II (Qiagen). After homogenization and clarification, total RNA was extracted from homogenate supernatants with the NucleoMagVet kit (Macherey Nagel) using a Kingfisher Flex (Thermo Scientific).

4.2. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

All blood donor samples were screened using a competitive ELISA test: the ID Screen[®] West Nile Competition Multi-species from Innovative Diagnostics (Grabel, France). This test was originally developed for the detection of antibodies directed against the envelope protein pr-E of the West Nile virus but it is found to give cross reactions with other flaviviruses including the ZIKV and DENV and can therefore be used for the screening of these viruses [41]. The test was performed according to the manufacturer's protocol.

4.3. Luminex

All cELISA-positive samples were screened in Luminex using the NS1 antigens of ZIKV and DENV (DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4) according to the procedures described by Raulino et al. [42].

Recombinant NS1 proteins for ZIKV and for the four DENV serotypes were coupled to Luminex beads to detect Immunoglobulin G (IgG) directed against these antigens. The samples, diluted to 1/200th, are placed in the presence of the beads and incubated overnight at 4 °C. The fluorescence intensities of the antigen-antibody reactions are then read with the Bioplex 200 device. A blank is used to measure only the fluorescence intensity of the beads and remove this “background noise” from the other results obtained. The NS1 antigen used for ZIKV has a sensitivity of 100% and a specificity of 98.48%; for DENV-1, a sensitivity of 91.3% and a specificity of 98.48%; for DENV-2, a sensitivity of 100% and a specificity of 96.97%; for DENV-3, a sensitivity of 100% and a specificity of 96.97%, for DENV-1, a sensitivity of 82.61% and a specificity of 98.48%.

4.4. Seroneutralization Assays

Viral microneutralization tests (MNT) were performed on eLISA-positive sera to confirm ZIKV infection. The sera were serially diluted in duplicate in 50 µL of Dulbecco’s Modified Eagle Medium (DMEM) of ThermoFisher supplemented by heat-inactivated fetal bovine serum 2% and hepes 40X in a 96 plate, then with a dilution factor of 3 starting with 1/5th to 1/3645th. ZIKV suspension (ArB41644 ZIKV of African lineage) at 107.14 tissue culture infectious dose 50 (TCID50) was then added to each well. After incubation for 90 min at 37 °C with 5% CO₂, we added 100 µL of DMEM 2% containing 2000 Vero cells E6 per well. The plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 7 days. Antibody titers were calculated by doing the reciprocal of the last dilution at which there are no cytopathic effects.

4.5. RT-PCR ZIKV and DENV

Nucleic acids from fever samples were extracted using Qiagen RNA extraction kit (QIAamp Viral RNA Mini Kit, Qiagen, Hilden, Germany). Amplification was performed with the QuantStudio[®] Real-Time PCR from ThermoFisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA) according to the procedures described by Liu et al. [43]. For mosquitoes, total RNA extraction was performed using the Biomek-FX machine (Beckman-Coulter) and the Nucleospin RNA virus extraction kit (Macherey-Nagel), following the manufacturer’s instructions. Control of the quantity and quality of the RNA was measured by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific) and by capillary electrophoresis (Bioanalyser, Agilent Technologies). The detection of ZIKV and PAN-DENV by real-time RT-PCR was carried out following the protocol described previously by Liu et al. and Gray et al. [43,44]. We use the following primers and probes:

ZIKV:

Forward: CGCAGGATCATAGGTGATGAAG

Reverse: CCTGACAACACTAAAATTGGTGC

Probe: VIC-ACAGCACTCCAGGTGTAGACCCTTC-BHQ1

DENV:

Forward: GGATAGACCAGAGATCCTGCTGT

Reverse R1: CATTCCATTTCTGGCGTTC

Reverse R2: CAATCCATCTTGGCGGCGCTC

Probe: FAM-CAGCATCATTCCAGGCACAG-TAMRA

4.6. Statistical Analysis

The seroprevalence of ZIKV and DENV was calculated by dividing the number of positive samples by the total number of samples tested, using two-sided exact binomial 95% confidence intervals (95%CI). The correlation between seroprevalence of ZIKV and independent variables such as origin, sex, and age were analyzed using a Pearson chi-square test and/or Fisher’s exact test and odds ratio.

Author Contributions: Conceptualization, B.T., S.S. and Y.S.; methodology, A.A., B.T., D.P.A.K., P.G., S.S. and Y.S.; investigation, B.T., L.P., G.T., P.G. and D.P.A.K.; resources, A.K.-K.; writing—original draft preparation, B.T. and Y.S.; writing—review and editing, B.T., D.P.A.K., T.B., S.G., P.G., A.A., D.K., S.S. and Y.S.; project administration, T.S.K., R.K.D., T.B., S.G., D.K., S.S. and Y.S.; funding acquisition, P.V.d.P., S.S. and Y.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Montpellier University of Excellence (MUSE) through the ANR (the French National Research Agency) under the “Investissements d’avenir” programme, with the reference ANR-16-IDEX-0006.

Institutional Review Board Statement: The study on human samples was approved by the health research ethics committee of Burkina Faso (2020-3-049) and was performed in line with the regulations outlined in the Declaration of Helsinki. Data were anonymized for publication purposes.

Informed Consent Statement: Informed consent was waived due to the fact that we used samples that had originally been collected for another study in which informed consent had been collected. In this consent, the participants gave their consent for their samples to be used for other studies if necessary, so we no longer needed informed consent for our study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We thank the national blood transfusion center of Burkina Faso and all the people who participated in the realization of this work.

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

References

- Sharma, A.; Lal, S.K. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Front. Microbiol.* **2017**, *8*, 110. [CrossRef]
- Tinto, B.; Kania, D.; Samdapawindé Kagone, T.; Dicko, A.; Traore, I.; De Rekeneire, N.; Bicaba, B.W.; Hien, H.; Van de Perre, P.; Simonin, Y.; et al. Dengue Virus Circulation in West Africa: An Emerging Public Health Issue. *Med. Sci.* **2022**, *38*, 152–158. [CrossRef]
- Sow, A.; Loucoubar, C.; Diallo, D.; Faye, O.; Ndiaye, Y.; Senghor, C.S.; Dia, A.T.; Faye, O.; Weaver, S.C.; Diallo, M.; et al. Concurrent Malaria and Arbovirus Infections in Kedougou, Southeastern Senegal. *Malar. J.* **2016**, *15*, 47. [CrossRef] [PubMed]
- Marbán-Castro, E.; Goncé, A.; Fumadó, V.; Romero-Acevedo, L.; Bardaji, A. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Their Children: A Review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2021**, *265*, 162–168. [CrossRef] [PubMed]
- Baud, D.; Gubler, D.J.; Schaub, B.; Lanteri, M.C.; Musso, D. An Update on Zika Virus Infection. *Lancet* **2017**, *390*, 2099–2109. [CrossRef]
- Katzelnick, L.C.; Zambrana, J.V.; Elizondo, D.; Collado, D.; Garcia, N.; Arguello, S.; Mercado, J.C.; Miranda, T.; Ampie, O.; Mercado, B.L.; et al. Dengue and Zika Virus Infections in Children Elicit Cross-Reactive Protective and Enhancing Antibodies That Persist Long Term. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, eabg9478. [CrossRef] [PubMed]
- Gubler, D.J.; Vasilakis, N.; Musso, D. History and Emergence of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S860–S867. [CrossRef]
- Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543. [CrossRef]
- Cao-Lormeau, V.M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.L.; Mallet, H.P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1085–1086. [CrossRef]
- Brasil, P.; Calvet, G.A.; Siqueira, A.M.; Wakimoto, M.; de Sequeira, P.C.; Nobre, A.; de Souza Borges Quintana, M.; de Mendonça, M.C.L.; Lupi, O.; de Souza, R.V.; et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004636. [CrossRef]
- Musso, D.; Ko, A.I.; Baud, D. Zika Virus Infection—After the Pandemic. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *381*, 1444–1457. [CrossRef]
- Moore, D.L.; Causey, O.R.; Carey, D.E.; Reddy, S.; Cooke, A.R.; Akinkugbe, F.M.; David-West, T.S.; Kemp, G.E. Arthropod-Borne Viral Infections of Man in Nigeria, 1964–1970. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1975**, *69*, 49–64. [CrossRef] [PubMed]
- Beltrán-Silva, S.L.; Chacón-Hernández, S.S.; Moreno-Palacios, E.; Pereyra-Molina, J.A. Clinical and Differential Diagnosis: Dengue, Chikungunya and Zika. *Rev. Médica del Hosp. Gen. México* **2018**, *81*, 146–153. [CrossRef]
- Muller, D.A.; Depelsenaire, A.C.I.; Young, P.R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, S89–S95. [CrossRef]
- Mangada, M.M.; Rothman, A.L. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4 + T Cells to Heterologous Serotypes. *J. Immunol.* **2005**, *175*, 2676–2683. [CrossRef] [PubMed]
- Katzelnick, L.C.; Narvaez, C.; Arguello, S.; Mercado, B.L.; Collado, D.; Ampie, O.; Elizondo, D.; Miranda, T.; Carillo, F.B.; Mercado, J.C.; et al. Zika Virus Infection Enhances Future Risk of Severe Dengue Disease. *Science* **2020**, *369*, 1123–1128. [CrossRef] [PubMed]
- Letizia, A.G.; Pratt, C.B.; Wiley, M.R.; Fox, A.T.; Mosore, M.; Agbodji, B.; Yeboah, C.; Kumordjie, S.; Di Paola, N.; Assana, K.C.; et al. Retrospective Genomic Characterization of a 2017 Dengue Virus Outbreak, Burkina Faso. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 1198–1210. [CrossRef]

18. Ridde, V.; Agier, I.; Bonnet, E.; Carabali, M.; Dabiré, K.R.; Fournet, F.; Ly, A.; Meda, I.B.; Parra, B. Presence of Three Dengue Serotypes in Ouagadougou (Burkina Faso): Research and Public Health Implications. *Infect. Dis. Poverty* **2016**, *5*, 23. [\[CrossRef\]](#)
19. Lim, J.K.; Seydou, Y.; Carabali, M.; Barro, A.; Dahourou, D.L.; Lee, K.S.; Nikiema, T.; Namkung, S.; Lee, J.S.; Shin, M.Y.; et al. Clinical and Epidemiologic Characteristics Associated with Dengue during and Outside the 2016 Outbreak Identified in Health Facility-Based Surveillance in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, e0007882. [\[CrossRef\]](#)
20. Jaenisch, T.; Tam, D.T.H.; Kieu, N.T.T.; Ngoc, T.; Nam, N.T.; Van Kinh, N.; Yacoub, S.; Chanpheaktra, N.; Kumar, V.; See, L.L.C.; et al. Clinical Evaluation of Dengue and Identification of Risk Factors for Severe Disease: Protocol for a Multicentre Study in 8 Countries. *BMC Infect. Dis.* **2016**, *16*, 120. [\[CrossRef\]](#)
21. Franco, L.; di Caro, A.; Carletti, F.; Vapalahti, O.; Renaudat, C.; Zeller, H.; Tenorio, A. Recent Expansion of Dengue Virus Serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 19490. [\[CrossRef\]](#)
22. Amarasinghe, A.; Kuritsky, J.N.; William Letson, G.; Margolis, H.S. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1349–1354. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Phoutrides, E.K.; Coulibaly, M.B.; George, C.M.; Sacko, A.; Traore, S.; Bessoff, K.; Wiley, M.R.; Kolivras, K.N.; Adelman, Z.; Traore, M.; et al. Dengue Virus Seroprevalence among Febrile Patients in Bamako, Mali: Results of a 2006 Surveillance Study. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1479–1485. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Onoja, A.B.; Adeniji, J.A.; Olaleye, O.D. High Rate of Unrecognized Dengue Virus Infection in Parts of the Rainforest Region of Nigeria. *Acta Trop.* **2016**, *160*, 39–43. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Fagbami, A.H.; Onoja, A.B. Dengue Haemorrhagic Fever: An Emerging Disease in Nigeria, West Africa. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 757–762. [\[CrossRef\]](#)
26. Sanou, A.S.; Dirlikov, E.; Sondo, K.A.; Kagoné, T.S.; Yameogo, I.; Sow, H.E.; Adjami, A.G.; Traore, S.M.; Dicko, A.; Tinto, B.; et al. Building Laboratory-Based Arbovirus Sentinel Surveillance Capacity during an Ongoing Dengue Outbreak, Burkina Faso, 2017. *Heal. Secur.* **2018**, *16*, S103–S110. [\[CrossRef\]](#)
27. Brès, P. Données Récentes Apportées Par Les Enquêtes Sérologiques Sur La Prévalence Des Arbovirus En Afrique, Avec Référence Spéciale à La Fièvre Jaune. *Bull. World Health Organ.* **1970**, *43*, 223–267.
28. Marchi, S.; Viviani, S.; Montomoli, E.; Tang, Y.; Boccutto, A.; Vicenti, I.; Zazzi, M.; Sow, S.; Diallo, A.; Idoko, O.T.; et al. Zika Virus in West Africa: A Seroepidemiological Study between 2007 and 2012. *Viruses* **2020**, *12*, 641. [\[CrossRef\]](#)
29. Diarra, I.; Nurtop, E.; Sangaré, A.K.; Sagara, I.; Pastorino, B.; Sacko, S.; Zeguimé, A.; Coulibaly, D.; Fofana, B.; Gallian, P.; et al. Zika Virus Circulation in Mali. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 945–952. [\[CrossRef\]](#)
30. Piantadosi, A.; Kanjilal, S. Diagnostic Approach for Arboviral Infections in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, e01926-19. [\[CrossRef\]](#)
31. Simonin, Y.; Loustalot, F.; Desmetz, C.; Foulongne, V.; Constant, O.; Fournier-Wirth, C.; Leon, F.; Molès, J.P.; Goubaud, A.; Lemaître, J.M.; et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine* **2016**, *12*, 161–169. [\[CrossRef\]](#)
32. Tarnagda, Z.; Cissé, A.; Bicaba, B.W.; Diabougou, S.; Sagna, T.; Ilboudo, A.K.; Tialla, D.; Lingani, M.; Sondo, K.A.; Yougbaré, I.; et al. Dengue Fever in Burkina Faso, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 170–172. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Ritchie, S.A.; Cortis, G.; Paton, C.; Townsend, M.; Shroyer, D.; Zborowski, P.; Hall-Mendelin, S.; Van Den Hurk, A.F. A Simple Non-Powered Passive Trap for the Collection of Mosquitoes for Arbovirus Surveillance. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 185–194. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Meda, N.; Salinas, S.; Kagoné, T.; Simonin, Y.; Van de Perre, P. Zika Virus Epidemic: Africa Should Not Be Neglected. *Lancet* **2016**, *388*, 337–338. [\[CrossRef\]](#)
35. Weger-Lucarelli, J.; Rückert, C.; Chotiwan, N.; Nguyen, C.; Garcia Luna, S.M.; Fauver, J.R.; Foy, B.D.; Perera, R.; Black, W.C.; Kading, R.C.; et al. Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0005101. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Fernandes, R.S.; O’connor, O.; Bersot, M.I.L.; Girault, D.; Dokunengo, M.R.; Pocquet, N.; Dupont-Rouzeyrol, M.; Lourenço-Deoliveira, R. Vector Competence of *Aedes Aegypti*, *Aedes Albopictus* and *Culex Quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. *Pathogens* **2020**, *9*, 575. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
37. Katzelnick, L.C.; Gresh, L.; Halloran, M.E.; Mercado, J.C.; Kuan, G.; Gordon, A.; Balmaseda, A.; Harris, E. Antibody-Dependent Enhancement of Severe Dengue Disease in Humans. *Science* **2017**, *358*, 929–932. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
38. HUANG, Y.-M. The Subgenus *Stegomyia* of *Aedes* in the Afrotropical Region with Keys to the Species (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* **2004**, *700*, 1. [\[CrossRef\]](#)
39. Gillies, M.T.; Coetzee, M. A Supplement to the Anophelinae of the South of the Sahara (Afrotropical Region). *Publ. South African Inst. Med. Res.* **1987**, *55*, 1–143.
40. Gillies, M.T.; De Meillon, B. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Publ. South African Inst. Med. Res.* **1968**, *54*, 3–343.
41. Faye, O.; Freire, C.C.M.; Iamarino, A.; Faye, O.; de Oliveira, J.V.C.; Diallo, M.; Zannotto, P.M.A.; Sall, A.A. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2636. [\[CrossRef\]](#)

42. Raulino, R.; Thaurignac, G.; Butel, C.; Villabona-Arenas, C.J.; Foe, T.; Loul, S.; Ndimbo-Kumugo, S.P.; Mbala-Kingebeni, P.; Makiala-Mandanda, S.; Ahuka-Mundeke, S.; et al. Multiplex Detection of Antibodies to Chikungunya, O'nyong-Nyong, Zika, Dengue, West Nile and Usutu Viruses in Diverse Non-Human Primate Species from Cameroon and the Democratic Republic of Congo. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2021**, *15*, e0009028. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Liu, S.Q.; Li, X.; Deng, C.L.; Yuan, Z.M.; Zhang, B. Development and Evaluation of One-Step Multiplex Real-Time RT-PCR Assay for Simultaneous Detection of Zika Virus and Chikungunya Virus. *J. Med. Virol.* **2018**, *90*, 389–396. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gray, E.R.; Heaney, J.; Ferns, R.B.; Sequeira, P.C.; Nastouli, E.; Garson, J.A. Minor Groove Binder Modification of Widely Used TaqMan Hydrolysis Probe for Detection of Dengue Virus Reduces Risk of False-Negative Real-Time PCR Results for Serotype 4. *J. Virol. Methods* **2019**, *268*, 17–23. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

2. Circulation des virus WNV et USUV

L'USUV et le WNV sont des arbovirus phylogénétiquement proches appartenant au sérocomplexe du JEV, de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus*. Ces virus suivent principalement un cycle enzootique impliquant les moustiques et les oiseaux, mais ils infectent occasionnellement l'Homme et d'autres mammifères en provoquant des troubles neurologiques. La transmission d'Homme à Homme est rare et ne contribue pas à la circulation de ces virus. Depuis la découverte de l'USUV, seuls deux cas humains ont été rapportés en Afrique, dont un au Burkina Faso en 2004 chez un patient de 10 ans présentant un ictère fébrile. Depuis, aucune étude n'a été menée pour mesurer l'étendue de la circulation de ce virus au Burkina Faso et aucune étude concernant la circulation du WNV n'avait été réalisée. Notre étude visait à déterminer la séroprévalence de l'USUV et du WNV dans les dons de sang et chez les animaux domestiques (chevaux, chiens, poulets et pigeons) et à réaliser un screening moléculaire chez les patients présentant une fièvre avec ou sans ictère et chez les moustiques (*Culex quinquefasciatus* et *Aedes aegypti*). La prévalence de l'USUV et du WNV a été évaluée par des analyses sérologiques (tests Elisa et séroneutralisation) et moléculaires (RT-qPCR) d'échantillons de moustiques, de chiens, d'oiseaux domestiques, de chevaux et d'humains au Burkina Faso entre 2019 et 2021. Nous avons détecté une transmission très active des deux virus au Burkina Faso. La séroprévalence du WNV et de l'USUV est particulièrement élevée chez les humains (19,16 % et 14,17 % respectivement) et les chevaux (17,28 % et 6,17 %). Les analyses moléculaires n'ont pas permis de détecter le WNV ou l'USUV dans les moustiques ou les échantillons de fièvre testés. Notre étude montre une propagation active de l'USUV et du WNV au Burkina Faso, surtout pour le WNV. Cette étude souligne l'intérêt de développer des programmes de surveillance pour mieux prévenir, détecter et alerter sur la circulation de l'USUV et du WNV chez les hôtes primaires et accidentels.

Article

Screening of Circulation of Usutu and West Nile Viruses: A One Health Approach in Humans, Domestic Animals and Mosquitoes in Burkina Faso, West Africa

Bachirou Tinto ^{1,2,*}, Didier Patinde Alexandre Kaboré ³, Thérèse Samdapawindé Kagoné ², Orienne Constant ¹, Jonathan Barthelemy ¹, Alice Kiba-Koumaré ⁴, Philippe Van de Perre ¹, Roch Kounbohr Dabiré ³, Thierry Baldet ⁵, Serafin Gutierrez ⁵, Patricia Gil ⁵, Dramane Kania ² and Yannick Simonin ^{1,*}

¹ Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, INSERM, University of Montpellier, 34394 Montpellier, France

² Centre MURAZ, Institut National de Santé Publique (INSP), Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

³ Institut de Recherche en Sciences de la Santé (IRSS), Bobo-Dioulasso 01, Burkina Faso

⁴ Centre National de Transfusion Sanguine, Ouagadougou 01, Burkina Faso

⁵ ASTRE Research Unit, CIRAD, INRAE, Montpellier University, 34398 Montpellier, France

* Correspondence: tintobachirou@yahoo.fr (B.T.); yannick.simonin@umontpellier.fr (Y.S.)

Citation: Tinto, B.; Kaboré, D.P.A.; Kagoné, T.S.; Constant, O.; Barthelemy, J.; Kiba-Koumaré, A.; Van de Perre, P.; Dabiré, R.K.; Baldet, T.; Gutierrez, S.; et al. Screening of Circulation of Usutu and West Nile Viruses: A One Health Approach in Humans, Domestic Animals and Mosquitoes in Burkina Faso, West Africa. *Microorganisms* **2022**, *10*, 2016. <https://doi.org/10.3390/microorganisms10102016>

Academic Editor: Denis Sereno

Received: 21 September 2022

Accepted: 10 October 2022

Published: 12 October 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Usutu virus (USUV) and West Nile virus (WNV) are phylogenetically closely related arboviruses. These viruses mainly follow an enzootic cycle involving mosquitoes and birds, but they occasionally infect humans and other mammals, inducing neurotropic disorders. Since the discovery of USUV, only two human cases have been reported in Africa, including one in Burkina Faso in 2004. Since then, no studies have been conducted to measure the extent of the circulation of this virus in Burkina Faso, and no study regarding the circulation of WNV has been conducted. Our study aimed to determine the seroprevalence of USUV and WNV in blood donations and in animals (horses, dogs, chickens and pigeons) and to perform molecular screening in patients with febrile fever and in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* mosquitoes. The prevalence of USUV and WNV was studied by serological (ELISA and microneutralization tests) and molecular analyses (RT-qPCR) of mosquito, dog, domestic bird, horse, and human samples in Burkina Faso between 2019 and 2021. We detected a very active transmission of both viruses in Burkina Faso. WNV and USUV seroprevalence is particularly high in humans (19.16% and 14.17%, respectively) and horses (17.28% and 6.17%). Molecular screening did not detect WNV or USUV in the mosquito or human samples tested. Our study shows an active spread of USUV and WNV in Burkina Faso, especially for WNV. This study highlights the value of developing surveillance programs to better prevent, detect, and alert people to USUV and WNV circulation in both primary and incidental hosts.

Keywords: Usutu virus; West Nile virus; humans; domestic animals; mosquitoes; Burkina Faso

1. Introduction

Usutu (USUV) and West Nile (WNV) viruses are arboviruses that are phylogenetically closely related, belonging to the Japanese encephalitis (JEV) serocomplex of the Flaviviridae family and the Flavivirus genus [1,2]. These viruses have a complex transmission cycle involving different species of birds as amplifying hosts, *Culex* mosquitoes as main vectors, and humans, horses, and other mammals as incidental hosts [3,4]. A transmission from human to human is rare and does not contribute to the circulation of these viruses, but several species of mosquitoes such as *Culex quinquefasciatus*, *Culex pipiens*, *Aedes albopictus*, and *Aedes japonicus* are involved in the transmission and circulation [5,6]. USUV was first isolated in 1959 from a *Culex neavei* mosquito collected near the Usutu river in Swaziland [7]. WNV was initially identified in 1937 in the West Nile Province of

Uganda in a woman with a febrile syndrome [8]. These two viruses have long been considered viruses of African interest, given that they circulated originally in Africa, prior to their introduction to Europe and other continents. Major USUV epizootics affecting avifauna, associated with a large epidemic of WNV, were demonstrated in Europe in 2016 and in 2018 [2]. Although most USUV and WNV infections are asymptomatic, some patients experience symptoms ranging from febrile syndrome to neurological complications such as meningitis, meningoencephalitis, and encephalitis [7,9].

Since the discovery of USUV, only two human cases have been reported in Africa. These cases occurred in the Central African Republic in 1981 in a febrile patient with a rash and in Burkina Faso in 2004 in a 10-year-old patient with febrile jaundice [10]. The low number of human cases diagnosed in Africa makes it difficult to establish a clear clinical picture of the disease on the African continent. This arbovirus has gained the attention of the scientific community due to its recent incursions in Europe and due to the threat it represents for certain wild birds (mainly blackbirds and owls in Europe) [2]. Molecular and serologic evidence of USUV infection in European blood donors also suggests a silent spread of this virus among asymptomatic humans. To date, USUV infection has been reported in a dozen European countries, with more than a hundred cases of acute human infection being described, mainly in Europe [2,11]. Contrary to USUV, WNV has been described as responsible for many epidemics in Africa, Europe, and the United States [12]. On the African continent, cases of WNV have been reported in the Democratic Republic of Congo, Gabon, Namibia, and Tunisia [13]. The majority of symptomatic patients have fever, rash, headache, muscle and joint pain, or jaundice. Less than 1% of infections progress to neuroinvasive disease, with such progression being recorded in cases of immunocompetent or immunocompromised patients (meningitis, encephalitis, or acute flaccid paralysis) [13,14].

Clinical diagnosis is made difficult by the similarity of USUV and WNV symptoms with other flaviviruses or other infectious diseases. Diagnostic techniques used are RT-PCR, virus isolation in cell culture, and the detection of antiviral antibodies by Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) tests. ELISA tests suffer from a lack of specificity due to cross-reactions that exist with flaviviruses [15]. To discriminate these viruses, positive ELISA samples must be systematically confirmed by microneutralization tests (MNT). There are no specific commercial tests for the differential diagnosis of USUV and WNV, making them difficult to monitor. Currently, in-house tests developed by reference laboratories are relied upon. The above-mentioned diagnostic problems make the monitoring of these viruses particularly difficult in resource-limited countries.

In Burkina Faso, the circulation of some flaviviruses such as dengue and yellow fever viruses (DENV and YFV) has been observed, notably with recurrent DENV epidemics since 2013 [16]. The country has recorded sporadic cases of yellow fever every year since the establishment of national surveillance in 2001. Since the identification of the first human case of USUV infection in Burkina Faso in 2004, no studies have been conducted to measure the extent of the circulation of this virus in the country. Hence the interest of our study, which aims to determine the seroprevalence of USUV and WNV in blood donations, animals (horses, dogs, chickens, and pigeons) and to perform molecular screening in patients with febrile fever and in *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti* mosquitoes the main vectors of arboviruses in Burkina Faso.

2. Materials and Methods

2.1. Samples

2.1.1. Blood Donors

The study involved blood donors from regional blood transfusion centers in the cities of Bobo-Dioulasso and Ouagadougou. Blood samples were collected from June to July

2020. A total of 501 samples were collected. This cohort harbors 114 (22.75%) females (median age: 28 years; interquartile range (IQR): 24–35.75 years) and 387 (77.25%) males (median age: 28 years; IQR 24–35 years).

2.1.2. Sera Specimens from Fever of Unknown Etiologies.

188 samples from patients with fever of unknown etiology, including 23 with jaundice, were collected in 2019 and stored at -80°C in the biobank of the MURAZ center in Bobo-Dioulasso to perform serological and molecular tests.

2.1.3. Sera Samples from Animals

Horses, dogs, chickens, and pigeons were collected from the towns of Bobo-Dioulasso and Ouagadougou. A total of 204 animal samples were collected from November 2021 to January 2022.

- A total of 81 horse sera samples (50 from Ouagadougou and 31 from Bobo-Dioulasso) were collected. The average age of the 81 horses analyzed was 7.11 years, with extremes ranging from 10 months to 27 years, corresponding to 79.01% of males and 20.99% of females. The samples were taken in the breeding sites by a veterinary technician. No horse was vaccinated against WNV, and all showed no symptoms at the time of sampling.
- A total of 52 dogs (25 from Ouagadougou and 27 from Bobo-Dioulasso) were included in our study. All samples were taken at the owners' homes, and no dog showed symptoms. The average age of the dogs was 2.77 years, with extremes ranging from 2 months to 12 years. There were 34 males and 18 females.
- A total of 50 sera samples from chickens from traditional farms were collected in Ouagadougou (25) and Bobo-Dioulasso (25) and analyzed. The average age was 1.3 years, with extremes ranging from 5 months to 3 years. There were 10 males and 40 females. All samples were collected from poultry markets.
- A total of 21 domestic pigeons from traditional breeding were included in the study. We collected 10 sera samples in Ouagadougou and 11 in Bobo-Dioulasso. The average age of the pigeons was 12.8 months, with extremes ranging from 1 month to 2 years. There were 9 males and 12 females. All samples were collected from owners' homes.

2.1.4. Mosquito Samples

Mosquito collection was carried out in August and September 2019, June, July and October 2020, and May and June 2021. Mosquitoes were collected in the Hauts-Bassins and South-West regions of Burkina Faso (Figure 1). In the Hauts-Bassins region, the sampling localities were located on two road transects. The first transect was composed by the town of Bobo-Dioulasso, following four rural areas: Banakeledaga, Sourkoudougou, Badara and Vallée du Kou 3 (VK3). The sampling on the second transect were carried out in two rural forested areas: Nasso and Dinderesso. In the South-West region, the sampling was carried out in two urban areas (Diébougou and Gaoua) and in four rural sites (Bapla, Tiankoura, Banlo, and Bouroum-bouroum). Collection areas have been grouped and renamed in urban or rural areas.

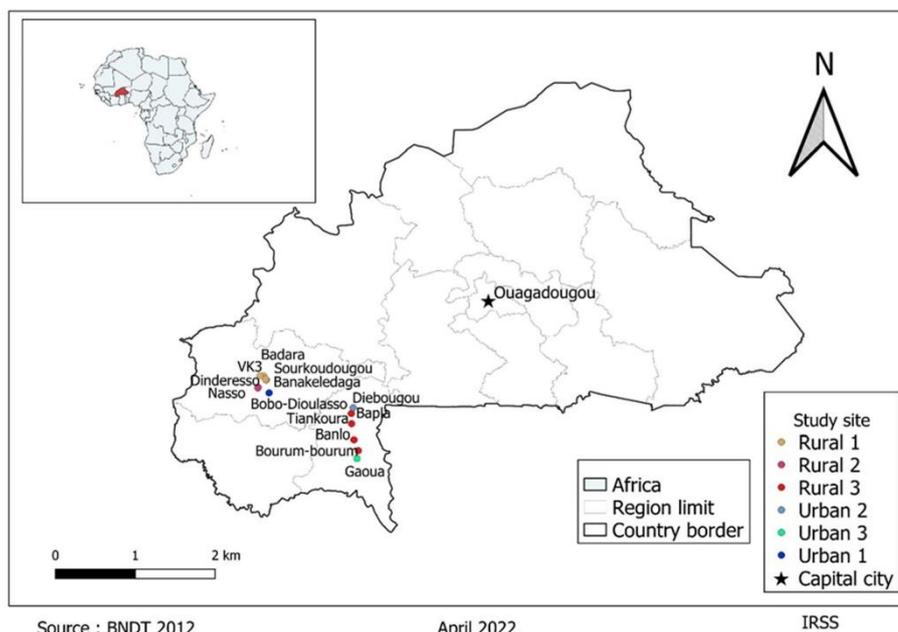


Figure 1. Location of mosquito collection sites in Burkina Faso. Each dot represents one sampling site; the samples from the sites that have the same dot color were grouped and renamed in rural 1 to 3 and in urban 1 to 3.

Samples were carried out over two successive days in each locality. Three methods were used: the double net tent, the BG-Sentinel traps, and the prokopack aspiration. The various specimens (living) were identified morphologically using the identification keys [17–19], then killed cold and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ for subsequent analyses.

2.1.5. Mosquito Sorting and Crushing

No-blood-engorged females of *Culex quinquefasciatus* and *Aedes aegypti*, the main vectors of Arboviruses, were our species of interest for this study. As the sampling were composed of several genera and species of mosquitoes, a sorting was necessary to isolate the specimens of interest and to group them by area and by collection period. This sorting was carried out on an ice-cold platform to avoid viral genome degradation. Each species was placed in pools of 6 to 37 individuals per well in 96-well “deepwell” type. The crushing was carried out using the TissueLyser II (Qiagen (Hilden, Germany), 30 s at 30 Hz, 2 times). Beforehand, each pool was resuspended in 500 μL 1X-PBS (Phosphate Buffered Saline buffer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) with two ice-cold steel bearing balls (3 mm diameter, LOUDET). After crushing, the supernatant was recovered for extraction of total RNA.

2.2. Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

The screening of human and animal sera was carried out with the ID Screen® West Nile competition ELISA test, (Innovative diagnostic, Montpellier, France), which is a competition ELISA test. This test was originally developed to identify antibodies against the West Nile virus pr-E envelope protein, as it turned out to cross other flaviviruses and can therefore detect a large spectrum of flaviviruses including WNV and USUV and other

related flaviviruses [20,21]. The test was performed according to manufacturer's instructions.

2.3. Seroneutralization Assays

Viral microneutralization tests (MNT) were performed on cELISA positive sera to identify WNV or USUV infection for human, horse, and dog samples using USUV (France2018, MT863562) and WNV (lineage 2, MT863560) [21]. The sera were serially diluted in duplicate in 50 μ L of Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) of ThermoFisher supplemented by heat-inactivated fetal bovine serum 2% in a 96 plate, then with a dilution factor of 2 starting with 1/4th to 1/256th. USUV and WNV suspension at 200 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀) were then added in each well. After incubation for 90 min at 37 °C with 5% CO₂, we added 100 μ L of DMEM 2% containing 2000 vero cells per well. The plates were incubated at 37 °C with 5% CO₂ for 5 days. Antibody titers were calculated by doing the reciprocal of the last dilution at which there is no cytopathic effects. Samples that were positive for both WNV and USUV were considered positive for either virus when the antibody titer for one virus is 4 times higher than the antibody titer for other virus.

2.4. USUV and WNV qRT-PCR

Nucleic acids were extracted from human sera using the automatic extractor MGISP-960, and amplification was performed with the LightCycler® 480 from Roche according to the procedures described by Nikolay et al. for USUV [22] and Garcia et al. for WNV [23]. For mosquitoes, total RNA extraction was performed using the Biomek-FX machine (Beckman-Coulter) and the Nucleospin RNA virus extraction kit (Macherey-Nagel, Strasbourg, France), following the manufacturer's instructions. A control of the quantity and quality of the RNA was measured by spectrophotometry (Nanodrop, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and by capillary electrophoresis (Bioanalyser, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA). The detection of USUV and WNV by real-time RT-qPCR was carried out using the LUNA Universal Probe One Step RT-qPCR Biolaps kit, respectively following the protocol described previously by Nikolay et al. and Tang et al. [22,24].

2.5. Statistical Analysis

In blood donors, the correlation between seroprevalence and independent variables such as origin, sex, and age were analyzed using a Pearson chi-square test or Fisher's exact test. We also used the Odds ratio to show the association or lack thereof of independent variables with seroprevalence. Figures were made using GraphPad Prism 9 software and maps using QGIS 3.24.2 software.

2.6. Ethical Statement and Informed Consent

Study on human samples was approved by health research ethics committee of Burkina Faso (2020-3-049) and was performed in line with the regulations outlined in the Declaration of Helsinki. Data was anonymized for publication purposes. Animal sampling was performed according to national and institutional guidelines, informed written consent of animal owners was obtained, and sample collection was performed by veterinarians.

Patients and blood donors were informed during the collection that their samples could be used later for other studies.

3. Results

3.1. WNV and USUV Infections in Humans Samples

In order to analyze the potential circulation of USUV and WNV in the general population in Burkina Faso, we decided to screen blood donor samples and clinical samples from the national YFV surveillance program. The seroprevalence of WNV and USUV was

first evaluated in a collection of 501 samples from blood donors, using cELISA to detect prior flavivirus infection. A total of 389 samples were positive (77.65%, CI95%: 73.79–81.07) (Tables 1 and S1). Samples positive for cELISA were then tested using MNT against WNV and USUV. Despite the inability to completely rule out antibody cross reactions, samples with close or equal neutralizing activity for WNV and USUV (<four-fold difference in MNT titer) were considered as potential co-infections. Among the positive samples, 71 were tested positive for USUV-specific antibodies (14.17%, CI95%: 11.39–17.49), and 96 for WNV-specific antibodies (19.16%, 95% CI: 15.95–22.83). A total of 52 samples demonstrated neutralizing activity for both USUV and WNV (Table 1). We did not find any significant associations between the origin, sex, and age of blood donors and USUV seroprevalence (Table 2A), whereas men had a higher seroprevalence for WNV than women (Table 2B). We additionally analyzed 188 fever samples of unidentified etiology for serological screening and using RT-qPCR for USUV and WNV. No WNV or USUV was detected in any of these samples.

Table 1. cELISA test and MNT results in blood donors among the 501 human samples analyzed.

Variable	cELISA Positive n (%)	MNT Positive n (%)		
		USUV+	WNV+	USUV + WNV+
Total	389 (77.64)	71 * (14.17)	96 * (19.16)	52 * (10.38)
Origin				
Ouagadougou	216 (84.37)	44 (17.18)	50 (19.53)	31 (12.10)
Bobo-Dioulasso	173 (70.61)	27 (11.02)	46 (18.77)	21 (8.57)
Gender				
Male	302 (78.03)	56 (14.47)	82 (21.18)	45 (11.62)
Female	87 (76.31)	15 (13.15)	14 (12.28)	7 (6.14)
Age				
18–24	130 (76.47)	24 (14.11)	33 (19.41)	17 (10.0)
25–34	146 (74.11)	24 (12.18)	30 (15.22)	15 (7.65)
35–44	81 (85.26)	17 (17.89)	23 (24.21)	14 (14.73)
45–59	32 (82.05)	6 (15.38)	10 (25.64)	6 (15.38)

* among the 71 USUV positives and 96 WNV positives, there are 52 samples positive for both USUV and WNV.

Table 2. (A). USUV seroprevalence according to the socio-demographic characteristics of the blood donors. (B). WNV seroprevalence according to the socio-demographic characteristics of the blood donors.

(A)			
Variable	Positive n (%)	Odds ratio IC95%	p-Value
Origin			0.0547
Ouagadougou	44 (17.18)	1	
Bobo-Dioulasso	27 (11.02)	0.6 [0.36–1]	
Gender			0.8786
Male	56 (14.47)	1	
Female	15 (13.15)	0.9 [0.49–1.66]	
Age			0.6213
18–24	24 (14.11)	1	
25–34	24 (12.18)	0.84 [0.46–1.54]	
35–44	17 (17.89)	1.33 [0.67–2.62]	
45–59	6 (15.38)	1.11 [0.42–2.93]	
(B)			
Variable	Positive n (%)	Odds ratio IC95%	p-Value
Origin			0.9097

Ouagadougou	50 (19.53)	1	
Bobo-Dioulasso	46 (18.77)	0.95 [0.61–1.49]	
Gender			0.0415 *
Male	82 (20.15)	1	
Female	14 (12.28)	0.52 [0.28–0.96]	
Age			0.2040
18–24	31 (18.23)	1	
25–34	29 (14.72)	0.75 [0.44–1.29]	
35–44	22 (23.15)	1.33 [0.73–2.45]	
45–59	10 (25.64)	1.43 [0.63–3.22]	

* $p < 0.05$.

3.2. WNV and USUV Infections in Domestic Animals

Arboviruses are maintained in sylvatic and urban cycles through non pathological infection in natural reservoirs but can also affect other animal hosts. To monitor the potential infection in domestic animals, we screened various species for the presence of specific USUV and WNV antibodies. Animal samples were collected in different neighborhoods of the two major cities of Burkina Faso (Ouagadougou and Bobo-Dioulasso). All animals were from domestic breeding. A total of 81 horses, 52 dogs, 50 chickens and 21 pigeons were included in our study. Among the 81 horses analyzed, we obtained 73 horses positive for cELISA (48 from Ouagadougou and 25 from Bobo-Dioulasso). Among them, 5 (6.17%, CI95%: 2.66–13.64) were positive for USUV antibodies, and 14 (17.28%, CI95%: 10.58–26.94) for WNV (Table 3). We identified anti-flavivirus antibodies in 14 dogs (10 from Ouagadougou and 4 from Bobo-Dioulasso); only one of the dogs presented neutralizing activity for WNV; and all dog samples were negative for USUV antibodies. Concerning avian analyses, we identified anti-flavivirus antibodies in 4 chicken samples but no positives for USUV and WNV after MNT tests. In pigeons, of the two samples that gave a positive result for the cELISA test, we detected one sample presenting a USUV positive antibody and another one presenting anti-WNV antibodies (Table 3). The majority of positive animals came from Bobo-Dioulasso (Table 4, Figure 2).

Table 3. USUV and WNV MNT results in cELISA positive animals.

Species	Number of Specimens	cELISA	MNT Antibodies Titer		Conclusion
			USUV	WNV	
Horses	81	73	128	128	USUV + WNV+
			32	Negative	USUV+
			32	256	WNV+
			64	64	USUV + WNV+
			8	Negative	USUV+
			8	Negative	USUV+
			32	128	WNV+
			Negative	128	WNV+
			Negative	128	WNV+
			Negative	32	WNV+
			Negative	32	WNV+
			Negative	8	WNV+
			Negative	256	WNV+
			Negative	16	WNV+
			Negative	32	WNV+
			Negative	16	WNV+
Negative	16	WNV+			
Dogs	52	14	0	64	WNV+

Chickens	50	4	Negative	Negative	Negative
Pigeons	21	2	8	Negative	USUV+
			0	8	WNV+

Table 4. Seroprevalence of USUV and WNV according to animal location.

Species	Results	Total	Origin	
			Ouagadougou	Bobo-Dioulasso
Horses	USUV + n (%)	5 (6.17%)	2 (4%)	3 (9.67%)
	WNV + n (%)	14 (17.28%)	1 (2%)	13 (41.93)
Dogs	USUV + n (%)	0 (00%)	0 (00%)	0 (00%)
	WNV + n (%)	1 (1.92%)	1 (4%)	0 (00%)
Chickens	USUV + n (%)	0 (00%)	0 (00%)	0 (00%)
	WNV + n (%)	0 (00%)	0 (00%)	0 (00%)
Pigeons	USUV + n (%)	1 (4.76%)	0 (00%)	1 (9.09%)
	WNV + n (%)	1 (4.76%)	0 (00%)	1 (9.09%)

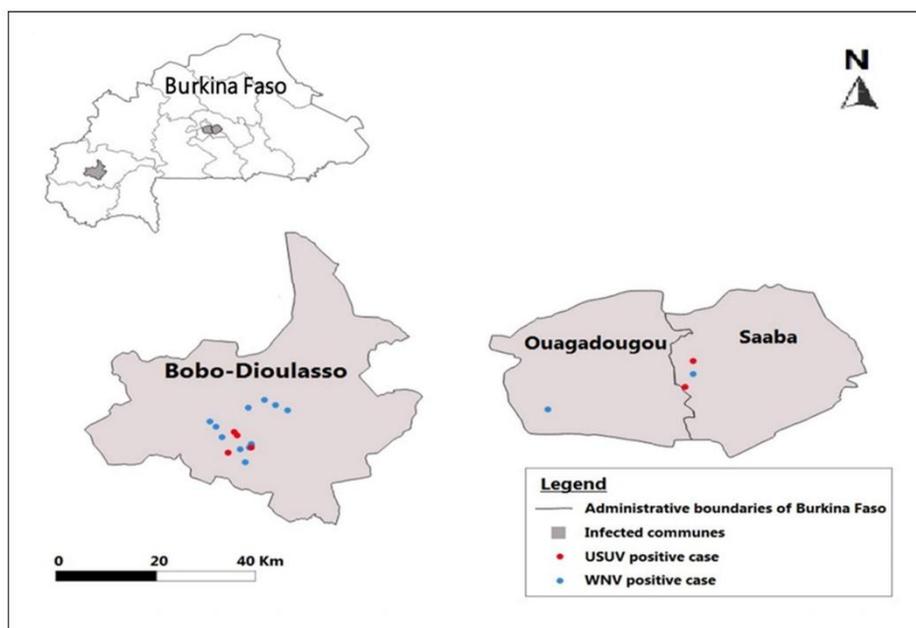


Figure 2. Geographical distribution of animals who tested positive for antibodies against USUV and WNV. Red dots represent USUV positive samples and blue dots WNV positive samples. In Bobo-Dioulasso, all the positives are concentrated in the same area.

3.3. WNV and USUV Screening in Mosquitoes

A total of 1356 *Aedes aegypti* and 1659 *Culex quinquefasciatus* no-blood-engorged females were obtained after sorting. Blood-fed mosquitoes can contain viruses in the blood that are not mosquito borne and thus lead to false conclusions on the viral pathogens borne by mosquitoes in the study area.

These species were most dominant in the city of Bobo-Dioulasso (Urban 1) (Figure S1). We did not identify the presence of USUV or WNV in these samples. To validate the negative results of our RT-qPCR, we always added a positive sample (RNA isolated from

cell culture infections) in our PCR plates. Moreover, we have analyzed in parallel and with the same RT-qPCR a batch of mosquitoes from France [25]. Our results with the French samples show that our RT-qPCR is able to detect both viruses and allows to identify positive samples for virus isolation and genome sequencing. Finally, the Burkinabe samples were also screened with a RT-qPCR targeting the mosquito 5.8S ribosomal RNA to validate the absence of PCR inhibitors.

4. Discussion

There was no previous data regarding the circulation of USUV and WNV in Burkina Faso. The only human case of West African USUV infection was identified in Burkina Faso in 2004, which suggests that this virus circulated in the country several years ago [10]. Since 2014, Burkina Faso has developed a national reference laboratory for hemorrhagic fevers, which is responsible for monitoring arbovirus infections in humans. This monitoring is mainly concerned with DENV, YFV, zika and chikungunya viruses, with no analysis of USUV or WNV having been performed thus far. Notably, a modeling study has identified a number of countries (Togo and Benin) bordering Burkina Faso as areas at risk of the emergence of WNV [12].

To have a general view of the potential circulation of these viruses, our study targeted several epidemiologically relevant hosts: humans, horses, dogs, birds, and mosquitoes, and highlighted the active circulation of USUV and WNV in Burkina Faso. We found the presence of antibodies directed against these two viruses in blood donors, horses, dogs and pigeons. Several other studies have shown the co-circulation of USUV and WNV viruses in humans and animals, particularly in Europe [26,27]. Horses, dogs, domestic birds and chickens have been identified as accidental hosts of USUV and WNV [7,20,28–31]. Horses are known as a species particularly susceptible to WNV and USUV infection, and are considered as valuable sentinels of the risk of WNV epizootic transmission [32,33]. In this species, we observed a high seroprevalence of WNV (17.28%) compared to USUV (6.17%). In general, WNV is known to be more widespread than USUV [26], and our study appears to confirm the same trend in Burkina Faso as well. That said, some studies have shown a higher circulation of USUV in humans in regions where the two viruses are endemic [21]. During the collection of our samples, horse breeders reported the occurrence in some horses of neurological syndromes typically associated with infection. Unfortunately, this information was not documented, nor does such data exist at the level of veterinary clinics in the country. It would be very informative to set up a surveillance system for flaviviruses in horses, with the collaboration of veterinary clinics and horse owners in Burkina Faso. Some previous studies have reported high seroprevalence of WNV in horses in sub-Saharan Africa, particularly in Ivory Coast, Nigeria and Chad [34,35]. Another study carried out in Morocco reported serological evidence of the circulation of USUV and WNV in horses but also in dogs [29]. Although dogs are not described as developing clinical signs after USUV and WNV infection, our study included them as relevant candidates for surveillance due their proximity to humans and their high exposure rates to WNV, as has been previously documented [36]. While our study we observed only one dog presented antibodies against WNV and none had antibodies to USUV, it must be acknowledged that our cohort was small in number to be conclusive. The small sample size of pigeons (21) collected did not allow us to measure the real extent of the circulation of these viruses in this population of domestic birds although it did allow us to detect positive birds for USUV and WNV. The regular displacement of this species suggests that they could be more exposed than mammals to infections by these viruses. To date, there have been very few studies on domestic pigeons, even though the first WNV infection in birds was detected in organs and blood from a pigeon in 1955 [13]. A WNV surveillance system based on the serological testing of domestic pigeons in Greece reported seroprevalences of 54% in 2010 and 31% in 2011, with one pigeon also testing positive for anti-USUV antibodies during the same period [37]. Also, an epidemiological survey on zoonoses in Spain identified the circulation of USUV and WNV in feral pigeons

[38]. Our study is the first to show serological evidence of USUV in domestic pigeons in West Africa. A WNV serological survey of domestic pigeons in Nigeria reported a seroprevalence of 3.5% [39]; which is close to the 4.76% rate found in our study. Another study conducted in Mali showed the presence of USUV and WNV antibodies in other species of domestic bird (duck and chicken) [30]. A large-scale study on domestic pigeons in Burkina Faso would make it possible to better situate their share in the circulation of USUV and WNV. It should be noted that samples from domestic pigeons are more easily accessible compared to samples from wild birds. In our study, all chickens were found to be negative for antibodies to both viruses. Previous studies estimate that USUV has a limited pathogenicity in domestic chickens [40], while WNV antibodies have been identified in chickens by authors in Turkey and Croatia [31,41].

USUV and WNV have been isolated from several mosquito species of the genera *Culex* and *Aedes* [4], and some *Culex* and *Aedes* species have been shown as capable of transmitting USUV and WNV in Africa [13,42]. The presence of these vectors has already been demonstrated in Burkina Faso [43]. In the course of our study, we searched for USUV and WNV in two mosquito species using RT-PCR: *Culex quinquefasciatus* (1659 specimens) and *Aedes aegypti* (1356 specimens). The PCR was negative for the viruses sought in these two species of mosquitoes, but also for other viruses such as DENV, zika, and chikungunya viruses known to be circulating in Burkina Faso. [44]. The data for the absence of detection of other flaviviruses (DENV and ZIKV) in mosquitoes have been recently published and are thus available [45]. Moreover, virus positive mosquitoes are extremely scarce for most epidemiological situations involving arboviruses. These results show a low prevalence of the circulation of USUV and WNV in vector population, hence the difficulty of identifying and monitoring these viruses in mosquitoes. A more exhaustive mosquitoes sampling or targeted mosquito collection in localities where we identified animals positive to both viruses would increase the likelihood to find the positive specimens in the vector population.

There is currently an information gap as to the circulation of USUV and WNV in humans in West Africa. For example, concerning WNV, there are more than twenty African countries (including Burkina Faso) in which no seroprevalence study has yet been conducted in humans to measure the extent of the circulation of the virus [46]. Two studies in Africa have considered the seroprevalence of WNV in blood donors. In Egypt, a study reported a high seroprevalence of 55%, and in Rwanda, a seroprevalence of 10.4% [47,48]. No data exists on the seroprevalence of USUV among blood donors in Africa. The only available data concerning blood donors derives from studies carried out in Europe. Of those studies, several have reported quite low seroprevalences of USUV among blood donors in Italy (1% and 0.23%), Germany (<1%), and Hungary (<1%) [49–52]. These results are all very far from the 14.17% obtained in our study, suggesting a significant level of circulation of USUV virus in humans in Burkina Faso. We observed a statistically significant association between blood donor gender and WNV seroprevalence as men had a high seroprevalence compared to women. One hypothesis to explain this is that in Burkina Faso, due to their typical daily activities, men spend more time outside the home than women, which would expose them more to mosquito bites. The search for viral RNA of USUV and WNV using RT-PCR in fever specimens of unknown etiologies returned negative results for all samples analyzed (188). In Burkina Faso, people often resort to self-medication when they are sick, and all febrile illnesses are generally treated as malaria. Therefore, people only consult a doctor when self-medication does not work. This late consultation makes it difficult to detect the virus in the blood because during USUV or WNV infection, the viremia window is very short in humans [2]. It is therefore necessary to take a blood sample very early during disease onset to increase the probability of detecting the virus in the blood.

In our study, 52 human samples demonstrated neutralizing activity for both USUV and WNV. These results do not allow us to conclude whether they are simultaneous in-

fections or infections acquired at different times. Co-infections have already been documented in other studies in birds and mosquitoes [3,53]. The ability of vectors to transmit multiple arboviruses in a single bite increases the likelihood of individuals being infected with multiple arboviruses simultaneously [54]. Such co-infections would further complicate the interpretation of serological tests and could affect the performance of molecular tests.

5. Conclusions

To conclude, our study shows an active spread of USUV and WNV in Burkina Faso in humans and horses, especially for WNV. This study highlights the value of developing monitoring programs to better prevent, detect, and warn about USUV and WNV circulation, in both primary and incidental hosts. Developing surveillance programs in Burkina Faso would help to anticipate the veterinary and public health risks associated with these viruses and further studies would be needed to characterize these viruses in wild birds to determine their potential origin.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/microorganisms10102016/s1>, Figure S1: Number of mosquito after sorting; Table S1: Socio-demographic characteristics of blood donors samples.

Author Contributions: Conceptualization, B.T. and Y.S.; methodology, B.T., D.P.A.K., O.C., J.B., P.G. and Y.S.; investigation, B.T., P.G., and D.P.A.K.; resources, A.K.-K.; writing—original draft preparation, B.T. and Y.S.; writing—review and editing, B.T., D.P.A.K., T.B., S.G., P.G., D.K., and Y.S.; supervision, Y.S. and S.G.; project administration, T.S.K., R.K.D., T.B., S.G., D.K. and Y.S.; funding acquisition, P.V.d.P. and Y.S. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Montpellier University of Excellence (MUSE) through the ANR (the French National Research Agency) under the “Investissements d’avenir” programme, with the reference ANR-16-IDEX-0006.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki, and approved by health research ethics committee of Burkina Faso (2020-3-049).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: We would like to thank the national blood transfusion center which allowed us to have access to samples from blood donors, the owners of the animals included in the study for their collaboration as well as all the partners who participated in the implementation of this study.

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

References

1. Buckley, A.; Dawson, A.; Gould, E.A. Detection of Seroconversion to West Nile Virus, Usutu Virus and Sindbis Virus in UK Sentinel Chickens. *Virology* **2006**, *3*, 71. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-3-71/FIGURES/3>.
2. Clé, M.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Beck, C.; Gutierrez, S.; Baldet, T.; Vande Perre, P.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Le Virus Usutu: La Menace Fantôme. *Médecine/Sciences* **2018**, *34*, 709–716. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/20183408018>.
3. Santos, P.D.; Michel, F.; Wylezich, C.; Höper, D.; Keller, M.; Holicki, C.M.; Szentiks, C.A.; Eiden, M.; Muluneh, A.; Neubauer-Juric, A.; et al. Co-Infections: Simultaneous Detections of West Nile Virus and Usutu Virus in Birds from Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 776–792. <https://doi.org/10.1111/tbed.14050>.
4. Vázquez González, A.; Ruiz, S.; Herrero, L.; Moreno, J.; Molero, F.; Magallanes, A.; Sánchez-Seco, M.P.; Figuerola, J.; Tenorio, A. West Nile and Usutu Viruses in Mosquitoes in Spain, 2008–2009. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 178. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.2011.11-0042>.
5. Decarlo, C.H.; Campbell, S.R.; Bigler, L.L.; Mohammed, H.O. Aedes Japonicus and West Nile Virus in New York. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2020**, *36*, 261–263. <https://doi.org/10.2987/20-6958.1>.
6. Mancini, G.; Montarsi, F.; Calzolari, M.; Capelli, G.; Dottori, M.; Ravagnan, S.; Lelli, D.; Chiari, M.; Santilli, A.; Quaglia, M.; et al. Mosquito Species Involved in the Circulation of West Nile and Usutu Viruses in Italy. *Vet. Ital.* **2017**, *53*, 97–110. <https://doi.org/10.12834/VETIT.114.933.4764.2>.

7. Roesch, F.; Moratorio, G.; Moratorio, G.; Vignuzzi, M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses* **2019**, *11*, 640.
8. Smithburn, K.C.; Hughes, T.P.; Burke, A.W.; Paul, J.H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *20*, 471–492. <https://doi.org/10.4269/AJTMH.1940.S1-20.471>.
9. Campbell, G.L.; Marfin, A.A.; Lanciotti, R.S.; Gubler, D.J.; Nile, W. Reviews West Nile Virus. *Lancet Infect. Dis.* **2002**, *2*, 519–529. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(02\)00368-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(02)00368-7).
10. Saiz, J.C.; Blázquez, A.B. Usutu Virus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Virus Adapt. Treat.* **2017**, *9*, 27–40. <https://doi.org/10.2147/VAAT.S123619>.
11. Simonin, Y.; Sillam, O.; Carles, M.J.; Gutierrez, S.; Gil, P.; Constant, O.; Martin, M.F.; Girard, G.; Van de Perre, P.; Salinas, S.; et al. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 875–878. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171122>.
12. García-Carrasco, J.M.; Muñoz, A.R.; Olivero, J.; Segura, M.; Real, R. Mapping the Risk for West Nile Virus Transmission, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 777–785. <https://doi.org/10.3201/eid2804.211103>.
13. Sule, W.F.; Oluwayelu, D.O.; Hernández-Triana, L.M.; Fooks, A.R.; Venter, M.; Johnson, N. Epidemiology and Ecology of West Nile Virus in Sub-Saharan Africa. *Parasites Vectors* **2018**, *11*, 1–10.
14. Burki, T. Increase of West Nile Virus Cases in Europe for 2018. *Lancet* **2018**, *392*, 1000.
15. 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. <https://doi.org/10.1099/vir.0.031641-0>.
16. Tinto, B.; Kania, D.; Samdapawindé Kagone, T.; Dicko, A.; Traore, I.; De Rekeneire, N.; Bicaba, B.W.; Hien, H.; Van de Perre, P.; Simonin, Y.; et al. Dengue Virus Circulation in West Africa: An Emerging Public Health Issue. *Medecine/Sciences* **2022**, *38*, 152–158. <https://doi.org/10.1051/medsci/2022007>.
17. HUANG, Y.-M. The Subgenus Stegomyia of Aedes in the Afrotropical Region with Keys to the Species (Diptera: Culicidae). *Zootaxa* **2004**, *700*, 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.700.1.1>.
18. Gillies, M.T.; Coetzee, M. A Supplement to the Anophelinae of the South of the Sahara (Afrotropical Region). *Publ. South African Inst. Med. Res.* **1987**, *55*, 1–143.
19. Spielman, A. The Anophelinae of Africa South of the Sahara (Ethiopian Zoogeographical Region). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1970**, *19*, 736–736. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1970.19.4.tn0190040736a>.
20. Niczyporuk, J.S.; Samorek-Salamonowicz, E.; Lecollinet, S.; Pancewicz, S.A.; Kozdruń, W.; Czekaj, H. Occurrence of West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Horses, and Humans in Poland. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 234181. <https://doi.org/10.1155/2015/234181>.
21. Constant, O.; Bolloré, K.; Clé, M.; Barthelemy, J.; Foulongne, V.; Chenet, B.; Gomis, D.; Virolle, L.; Gutierrez, S.; Desmetz, C.; et al. Evidence of Exposure to USUV and WNV in Zoo Animals in France. *Pathogens* **2020**, *9*, 1005. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121005>.
22. Nikolay, B.; Weidmann, M.; Dupressoir, A.; Faye, O.; Boye, C.S.; Diallo, M.; Sall, A.A. Development of a Usutu Virus Specific Real-Time Reverse Transcription PCR Assay Based on Sequenced Strains from Africa and Europe. *J. Virol. Methods* **2014**, *197*, 51–54. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.039>.
23. Garcia, M.; Alout, H.; Diop, F.; Damour, A.; Bengue, M.; Weill, M.; Missé, D.; Lévêque, N.; Bodet, C. Innate Immune Response of Primary Human Keratinocytes to West Nile Virus Infection and Its Modulation by Mosquito Saliva. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00387>.
24. Tang, Y.; Anne Hapip, C.; Liu, B.; Fang, C.T. Highly Sensitive TaqMan RT-PCR Assay for Detection and Quantification of Both Lineages of West Nile Virus RNA. *J. Clin. Virol.* **2006**, *36*, 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2006.02.008>.
25. Constant, O.; Gil, P.; Barthelemy, J.; Bolloré, K.; Foulongne, V.; Desmetz, C.; Leblond, A.; Desjardins, I.; Pradier, S.; Joulié, A.; et al. One Health Surveillance of West Nile and Usutu Viruses: A Repeated Cross-Sectional Study Exploring Seroprevalence and Endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *Eurosurveillance* **2022**, *27*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2022.27.25.2200068>.
26. Zannoli, S.; Sambri, V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* **2019**, *7*, 184.
27. Nikolay, B. A Review of West Nile and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: How Much Do Transmission Cycles Overlap? *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2015**, *109*, 609–618. <https://doi.org/10.1093/TRSTMH/TRV066>.
28. Bażanów, B.; Jansen van Vuren, P.; Szymański, P.; Stygar, D.; Frącka, A.; Twardoń, J.; Kozdrowski, R.; Paweska, J.T. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **2018**, *10*, 87. <https://doi.org/10.3390/v10020087>.
29. 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. <https://doi.org/10.1017/S095026881600011X>.
30. Chevalier, V.; Marsot, M.; Molia, S.; Rasamoelina, H.; Rakotondravao, R.; Pedrono, M.; Lowenski, S.; Durand, B.; Lecollinet, S.; Beck, C. Serological Evidence of West Nile and Usutu Viruses Circulation in Domestic and Wild Birds in Wetlands of Mali and Madagascar in 2008. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1998. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061998>.
31. Yapici, O.; Kale, M.; Gur, S.; Mamak, N.; Yavru, S.; Hasircioglu, S.; Bulut, O. Serologic Investigation for West Nile Virus Infection in Commercial Domestic Chickens (*Gallus Gallus Domesticus*). *J. Anim. Vet. Adv.* **2012**, *11*, 2211–2214. <https://doi.org/10.3923/javaa.2012.2211.2214>.
32. Clé, M.; Beck, C.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Gutierrez, S.; Van de Perre, P.; Baldet, T.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Usutu Virus: A New Threat? *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, 1–11.

33. Venter, M.; Pretorius, M.; Fuller, J.A.; Botha, E.; Rakgotho, M.; Stivaktas, V.; Weyer, C.; Romito, M.; Williams, J. West Nile Virus Lineage 2 in Horses and Other Animals with Neurologic Disease, South Africa, 2008–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2060. <https://doi.org/10.3201/EID2312.162078>.
34. Cabre, O.; Grandadam, M.; Marié, J.L.; Gravier, P.; Prangé, A.; Santinelli, Y.; Rous, V.; Bourry, O.; Durand, J.P.; Tolou, H.; et al. West Nile Virus in Horses, Sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1958–1960. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060042>.
35. Cabre, O.; Durand, J.P.; Prangé, A.; Gomez, J.; Maurizi, L.; Tolou, H.; Davoust, B. West Nile Virus Infection: Serological Investigation among Horses in France and in Africa. *Med. Trop.* **2005**, *65*, 439–443.
36. Blackburn, N.K.; Reyers, F.; Berry, W.L.; Shepherd, A.J. Susceptibility of dogs to West Nile virus: a survey and pathogenicity trial. *J. Comp. Pathol.* **1989**, *100*, 59–66. [https://doi.org/10.1016/0021-9975\(89\)90090-x](https://doi.org/10.1016/0021-9975(89)90090-x).
37. Chaintoutis, S.C.; Dovas, C.I.; Papanastassopoulou, M.; Gewehr, S.; Danis, K.; Beck, C.; Lecollinet, S.; Antalis, V.; Kalaitzopoulou, S.; Panagiotopoulos, T.; et al. Evaluation of a West Nile Virus Surveillance and Early Warning System in Greece, Based on Domestic Pigeons. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *37*, 131–141. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2014.01.004>.
38. Cano-Terriza, D.; Guerra, R.; Lecollinet, S.; Cerdà-Cuellar, M.; Cabezon, O.; Almería, S.; García-Bocanegra, I. Epidemiological Survey of Zoonotic Pathogens in Feral Pigeons (*Columba Livia* Var. *Domestica*) and Sympatric Zoo Species in Southern Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *43*, 22–27. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2015.10.003>.
39. Waziri, I.J.; Kabir, J.; Kwaga, J.K.P.; Nguku, P. Serosurvey of West Nile Virus in Household-Reared Pigeons in Bauchi Metropolis, Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *112*, 169–174. <https://doi.org/10.1093/trstmh/try035>.
40. Chvala, S.; Bakonyi, T.; Hackl, R.; Hess, M.; Nowotny, N.; Weissenböck, H. Limited Pathogenicity of Usutu Virus for the Domestic Chicken (*Gallus Domesticus*). *Avian Pathol.* **2005**, *34*, 392–395. <https://doi.org/10.1080/03079450500268500>.
41. Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Sabadi, D.; Peric, L.; Barbic, L.; Klobucar, A.; Miklausic, B.; Tabain, I.; Santini, M.; Vucelja, M.; et al. Prevalence and Molecular Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Croatia in the ‘One Health’ Context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 1946–1957. <https://doi.org/10.1111/TBED.13225>.
42. Seitz, R. Usutu Virus. *Transfus. Med. Hemother.* **2014**, *41*, 73–82. <https://doi.org/10.1159/000357106>.
43. Ouattara, L.P.E.; Sangaré, I.; Namountougou, M.; Hien, A.; Ouari, A.; Soma, D.D.; Kassié, D.; Diabaté, A.; Gnankiné, O.; Bonnet, E.; et al. Surveys of Arboviruses Vectors in Four Cities Stretching along a Railway Transect of Burkina Faso: Risk Transmission and Insecticide Susceptibility Status of Potential Vectors. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 140. <https://doi.org/10.3389/fvets.2019.00140>.
44. Robert, V.; Lhuillier, M.; Meunier, D.; Sarthou, J.L.; Monteny, N.; Digoutte, J.P.; Cornet, M.; Germain, M.; Cordellier, R. Yellow Fever Virus, Dengue 2 and Other Arboviruses Isolated from Mosquitos, in Burkina Faso, from 1983 to 1986. Entomological and Epidemiological Considerations. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1993**, *86*, 90–100.
45. Tinto, B.; Kaboré, D.P.A.; Kamia, D.; Kagoné, T.S.; Kiba-Koumaré, A.; Pinceloup, L.; Thaurignac, G.; Van de Perre, P.; Dabire, R.K.; Baldet, T.; et al. Serological Evidence of Zika Virus Circulation in Burkina Faso. *Pathogens* **2022**, *11*, 741. <https://doi.org/10.3390/pathogens11070741>.
46. Mencattelli, G.; Ndione, M.H.D.; Rosà, R.; Marini, G.; Diagne, C.T.; Diagne, M.M.; Fall, G.; Faye, O.; Diallo, M.; Faye, O.; et al. Epidemiology of West Nile Virus in Africa: An Underestimated Threat. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, *16*, e0010075. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PNTD.0010075>.
47. Youssef, S.R.; Eissa, D.G.; Abo-Shady, R.A.; Aly Fouad, N.T.; Kattab, D.K.; Fathey, H.; Abdullaha Elewa, A.A.; Reda, D.M. Seroprevalence of Anti-WNV IgG Antibodies and WNV-RNA in Egyptian Blood Donors. *J. Med. Virol.* **2017**, *89*, 1323–1329. <https://doi.org/10.1002/jmv.24682>.
48. Seruyange, E.; Ljungberg, K.; Muvunyi, C.M.; Gahutu, J.B.; Katere, S.; Nyamusore, J.; Gwon, Y.D.; Evander, M.; Norder, H.; Liljeström, P.; et al. Seroreactivity to Chikungunya and West Nile Viruses in Rwandan Blood Donors. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2019**, *19*, 731–740. <https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2393>.
49. Percivalle, E.; Sasser, D.; Rovida, F.; Isernia, P.; Fabb, M.; Baldanti, F.; Marone, P. Usutu Virus Antibodies in Blood Donors and Healthy Forestry Workers in the Lombardy Region, Northern Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 658–661. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2126>.
50. Pierro, A.; Gaibani, P.; Spadafora, C.; Ruggeri, D.; Randi, V.; Parenti, S.; Finarelli, A.C.; Rossini, G.; Landini, M.P.; Sambri, V. Detection of Specific Antibodies against West Nile and Usutu Viruses in Healthy Blood Donors in Northern Italy, 2010–2011. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, E451–E453. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12241>.
51. Allering, L.; Jöst, H.; Emmerich, P.; Günther, S.; Lattwein, E.; Schmidt, M.; Seifried, E.; Sambri, V.; Hourfar, K.; Schmidt-Chanasit, J. Detection of Usutu Virus Infection in a Healthy Blood Donor from South-West Germany, 2012. *Eurosurveillance* **2012**, *17*. <https://doi.org/10.2807/ese.17.50.20341-en>.
52. Nagy, A.; Csonka, N.; Takács, M.; Mezei, E.; Barabás, É. West Nile and Usutu Virus Seroprevalence in Hungary: A Nationwide Serosurvey among Blood Donors in 2019. *PLoS ONE* **2022**, *17*, e0266840. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0266840>.
53. Wang, H.; Abbo, S.R.; Visser, T.M.; Westenberg, M.; Geertsema, C.; Fros, J.J.; Koenraadt, C.J.M.; Pijlman, G.P. Competition between Usutu Virus and West Nile Virus during Simultaneous and Sequential Infection of *Culex pipiens* Mosquitoes. *Emerg. Microbes Infect.* **2020**, *9*, 2642–2652. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1854623>.
54. Rückert, C.; Weger-Lucarelli, J.; Garcia-Luna, S.M.; Young, M.C.; Byas, A.D.; Murrieta, R.A.; Fauver, J.R.; Ebel, G.D. Impact of Simultaneous Exposure to Arboviruses on Infection and Transmission by *Aedes Aegypti* Mosquitoes. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15412. <https://doi.org/10.1038/ncomms15412>.

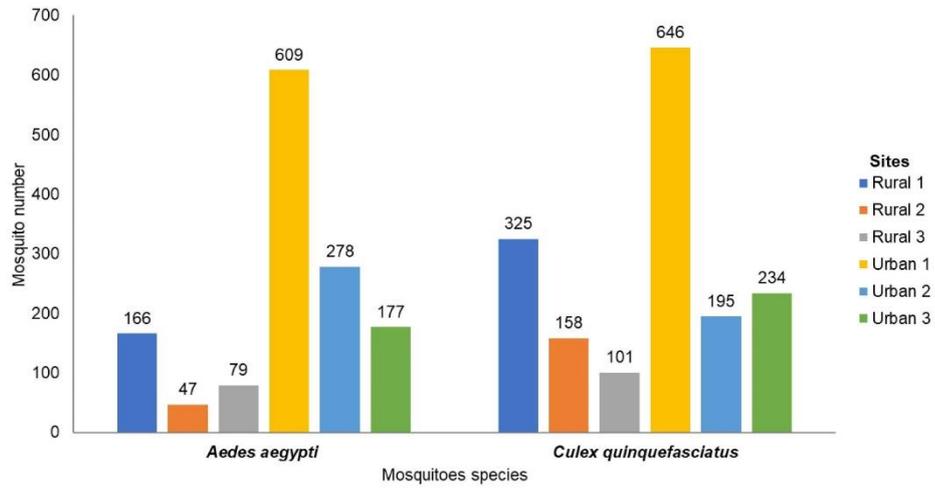


Figure S1: Number of mosquito after sorting.

Table S1: Socio-demographic characteristics of bloods donors samples.

Variable	n(%) or median		
	Ouagadougou	Bobo-Dioulasso	Total
	256	245	501
Gender			
Male	183 (71.48%)	204 (83.27%)	387 (77.25%)
Female	73 (28.52%)	41 (16.73%)	114 (22.75%)
Age			
18-24	72 (28.12%)	98 (40%)	170 (33.94%)
25-34	94 (36.72%)	103 (42.04%)	197 (39.32%)
35-44	65 (25.39%)	30 (12.25%)	95 (18.96%)
45-59	25 (9.77%)	14 (5.71%)	39 (7.78%)

3. Circulation des virus Chikungunya et O'nyon-nyong

Le CHIKV et l'ONNV sont des arbovirus très proches appartenant à la famille des *Togaviridae* du genre *Alphavirus*. Il existe très peu de données sur la circulation de ses deux virus au Burkina Faso. Une seule étude réalisée sur des échantillons collectés en 2015 dans la capitale burkinabè (Ouagadougou) a montré une séroprévalence de 29% du CHIKV. Aucune donnée n'existe au Burkina Faso sur l'ONNV. Cependant des preuves sérologiques et moléculaires de la circulation d'ONNV ont été rapportées dans des pays limitrophes du Burkina Faso tels que le Ghana et la Côte d'Ivoire. Au cours de notre étude nous avons screené 500 échantillons de donneurs de sang du Burkina Faso en Luminex en utilisant les antigènes NS1 du CHIKV et d'ONNV. Les protéines recombinantes NS1 du CHIKV et d'ONNV ont été couplées aux billes Luminex pour détecter les Immunoglobulines G (IgG) dirigées contre ces antigènes. Nous avons obtenu 283 (56,6%) échantillons positifs CHIKV et 273 (54,6%) échantillons positifs ONNV. 168 échantillons (33,6%) étaient à la fois positifs CHIKV et ONNV. Nos résultats montrent des séroprévalences assez élevées pour ces deux virus. Des analyses supplémentaires (séroneutralisation et analyses moléculaires) sont en cours afin de renforcer ces résultats qui feront l'objet d'une publication scientifique très prochainement.

Chapitre 4 : Discussion générale-Perspectives

Il existe un manque d'information sur l'incidence des arbovirus en Afrique en générale et au Burkina Faso en particulier. Nous ne disposons pas de connaissances réelles sur les conséquences des arbovirus sur la santé des populations. Le diagnostic des arbovirus n'est pas réalisé en routine et les maladies arbovirales ne constituent pas une priorité pour de nombreux pays africains alors que certaines arboviroses peuvent causer des maladies graves voir le décès des patients. C'est le cas par exemple du DENV qui a causé plusieurs dizaines de décès au Burkina Faso en 2016 selon les données du service de surveillance épidémiologique (données non publiées).

1. Problématique diagnostic et de surveillance des arbovirus au Burkina Faso

Le Burkina Faso est une zone endémique pour le paludisme, une infection parasitaire qui a une symptomatologie assimilable aux infections arbovirales. Les cliniciens doivent donc avoir à l'esprit les possibilités de co-infections qui peuvent exister entre le paludisme et les arbovirus pendant leur pratique. En effet, une étude réalisée au Burkina Faso pendant l'épidémie de dengue de 2016 a montré l'existence de co-infection DENV-paludisme dans environ 24% des cas [506]. La même étude rapporte qu'environ 28% des personnes décédés avaient une co-infection DENV-paludisme [506]. Une autre étude réalisée au Sénégal a montré des taux élevés de co-infections aiguës entre les arbovirus et le paludisme [507]. Dans cette étude les patients qui avaient une co-infection présentaient une fièvre plus marquée (≥ 40 °C) par rapport aux patients mono-infectés par le paludisme ou un arbovirus. Ce critère pourrait orienter les cliniciens dans le diagnostic clinique différentiel en attendant la confirmation de laboratoire.

Depuis l'avènement de l'épidémie de la maladie à virus Ebola en Afrique de l'Ouest en 2013, le Burkina Faso a créé en 2014, un LNR-FHV. Ce laboratoire était chargé de la

surveillance et de la confirmation des cas de maladie à virus Ebola. Depuis 2016, le LNR-FHV réalise la surveillance et le diagnostic des arbovirus avec un focus sur le DENV.

Les tests PCR de confirmation utilisé au LNR-FHV est le triplex du CDC Atlanta qui permet de détecter en une seule réaction le DENV, CHIKV et le ZIKV [508]. Les autres arbovirus tels que le WNV, l'USUV et l'ONNV ne sont pas recherchés.

Pendant notre étude, la recherche de certains arbovirus par RT-PCR dans des échantillons de fièvres d'étiologies inconnues et de moustiques collectés au Burkina Faso était négative. Dans les échantillons de fièvre d'étiologies inconnues, ce sont le ZIKV, le WNV, le DENV, l'USUV et le CHIKV qui ont été recherchés. La courte virémie observée avec les arbovirus rend la détection PCR compliquée surtout dans un pays comme le Burkina Faso où les patients consultent tardivement. Cependant certains arbovirus tels que le ZIKV et le WNV ont une virurie plus longue faisant des prélèvements d'urine une bonne alternative pour la recherche par PCR de ces virus. Par ailleurs les prélèvements d'urine sont faciles à réaliser et moins invasifs que les prélèvements sanguins surtout chez les enfants et chez qui, le prélèvement sanguin est difficile.

Un couplage des tests moléculaires avec des tests sérologiques IgM et IgG permettrait une meilleure interprétation des résultats. Malheureusement, il n'existe pas de tests sérologiques commerciaux spécifiques pour la plupart des arbovirus et les tests existants sont confrontés à la problématique des réactions croisées observées avec les arbovirus. La séroneutralisation qui est le test de référence pour pallier aux problèmes de réaction croisée est très lourde à réaliser et nécessite des laboratoires de haut niveau de sécurité 2 ou 3 en fonction de la classe du virus et du personnel bien formé. Le LNR-FHV dispose d'un laboratoire de niveau de sécurité 3 mais ne dispose pas de l'expertise pour réaliser la séroneutralisation. Pendant la réalisation de nos travaux de thèse, nous avons effectué des séroneutralisations pour l'identification de certains arbovirus (ZIKV, WNV et USUV). L'un de nos objectifs de thèse était de pouvoir effectuer un

transfert de cette technologie au Burkina Faso afin de renforcer le système de surveillance existant.

Des outils de diagnostic innovant ont été également développés par notre partenaire industriel HORIBA Medical et est en cours de validation. Cette plateforme innovante, flexible et multiplexe, permet de détecter des génomes amplifiés ou la présence d'anticorps. Elle repose sur un principe d'agglutination de particules magnétiques fonctionnalisées en surface par des molécules appelées récepteurs complémentaires des biomarqueurs ciblés. Cette technologie innovante pourra être transférée au LNR-FHV du Burkina Faso pour renforcer les capacités diagnostiques.

La surveillance des arbovirus au Burkina Faso est confrontée à de nombreuses difficultés de divers ordres. L'accessibilité de certaines zones liée au mauvais état des routes et à l'insécurité, le nombre limité de laboratoires équipés et le manque d'infrastructures dans les zones rurales.

Lorsque des épidémies arbovirales se déclarent dans des zones à fortes activités terroristes il est impossible d'intervenir et l'épidémie pourrait se propager à travers les mouvements de personnes de ces zones vers les autres régions du pays. Une alternative dans ce cas de figure est l'utilisation de laboratoires mobiles et la formation des militaires biologistes au diagnostic de ces virus. En effet, le Burkina a pu se doter de laboratoires mobiles utilisables en zone rurale grâce au réseau de biosécurité, biosûreté du G5 sahel. Depuis 2016, le terrorisme a entraîné de nombreux mouvements de populations des zones rurales vers les zones urbaines. Ces déplacés internes vivent dans des conditions précaires et le plus souvent à l'extérieur donc exposés à des piqûres de moustiques. Etant donné que le cycle sylvatique se produit à proximité des villages, ces personnes déplacées pourraient être à l'origine de l'introduction des virus en ville et donc de la survenue d'épidémies. Une surveillance spécifique basée sur des populations ou environnements à risque permettraient d'anticiper sur ces problèmes.

Au Burkina Faso, les laboratoires sont localisés dans les zones urbaines alors que la majorité des épidémies arbovirales débutent en zone rurale compte tenu du cycle de réplication de ces virus dont le cycle sylvatique s'effectue en forêt. Les échantillons doivent donc être prélevés et acheminés en ville en respectant la chaîne de froid alors que de nombreuses zones rurales ne disposent ni d'électricité ni d'équipements pour assurer cette chaîne de froid ; cette situation peut altérer la qualité des échantillons et impacter sur la qualité des résultats. Pour pallier à ce problème, nous explorons des pistes de techniques alternatives de collecte d'échantillons à partir de papier buvard appelé DBS (Dried Blood Spot). C'est une technique qui consiste à prélever une goutte de sang sur du papier buvard et à le laisser sécher. Ces papiers une fois séchés peuvent être conservés à température ambiante et le transport se fait par l'utilisation de simples enveloppes. Cette technique est déjà utilisée dans plusieurs pays à ressources limités dont le Burkina Faso pour le suivi des enfants infectés par le VIH ou les hépatites. L'implémentation de cette technique dans le diagnostic des arbovirus viendrait améliorer la surveillance de ces virus au Burkina Faso.

2. Circulation des arbovirus chez les humains au Burkina Faso

Notre étude a mis en évidence la circulation de plusieurs arbovirus au Burkina Faso chez les humains. Les anticorps du DENV, du ZIKV, du WNV, d'USUV, du CHIKV et d'ONNV ont été identifiés dans les échantillons de donneurs de sang de Ouagadougou et de Bobo-Dioulasso.

2.1 Le virus de la dengue et le virus Zika

Le Burkina Faso est devenu un pays endémique pour le DENV et fait face à des épidémies récurrentes depuis 2016 causant des pertes en vies humaines. L'infection au DENV est très souvent confondue avec le paludisme, ce qui occasionne des erreurs de prise en charge

cliniques qui peuvent parfois être fatales. En effet, lors de la première épidémie de DENV en 2016, l'utilisation des anti-inflammatoires dans certains centres de santé ou en automédication avait augmenté le nombre de cas de DENV hémorragiques avec des décès associés à cette mauvaise prise en charge [506]. Ces événements ont amenés les autorités sanitaires du pays à renforcer les capacités des laboratoires de biologie médicale et à doter les centres de santé en tests de diagnostic rapide (TDR) DENV, ce qui a contribué à améliorer la prise en charge clinique. Le diagnostic joue donc un rôle essentiel dans la prise en charge des cas. Afin de mieux optimiser sa capacité de diagnostic, le Burkina Faso a mis en place en 2017 à travers le LNR-FHV, un système de surveillance de la dengue et les autres arbovirus par sites sentinelles. Dans ce système, les échantillons de cas suspects sont collectés dans les sites sentinelles puis criblés avec les TDR DENV ; les échantillons positifs au TDR DENV sont ensuite acheminés au LNR-FHV pour confirmation.

Dans notre étude, les quatre sérotypes du DENV ont été identifiés avec une prédominance du sérotype 2 (48,86 %), le sérotype 1 étant le moins représenté (19,56 %). Depuis 2016, c'est la première étude réalisée sur la séroprévalence du DENV au Burkina Faso et cela donne un aperçu sur le taux d'immunisation de la population bien qu'un échantillonnage plus important permettra de donner des informations plus complètes. Nous savons que pour être totalement immunisé contre le DENV, il faut avoir les anticorps contre les quatre sérotypes et dans notre étude, 18,76% des personnes étaient dans ce cas de figure. Environ 82% des personnes ayant déjà contracté la dengue peuvent donc se réinfecter s'ils étaient en contact avec un sérotype différent de celui ayant été responsable de leur primo infection. Nos résultats montrent qu'une surveillance des sérotypes du DENV au Burkina Faso s'avère importante pour anticiper sur les futures épidémies. En effet une réintroduction d'un sérotype ayant moins circulé pourrait entraîner une épidémie de grande ampleur. Des études réalisées en population générale dans les pays voisins du Burkina Faso ont permis d'identifier les sérotypes 2 et 3 en

Côte d'Ivoire [509], le sérotype 2 au Ghana et au Mali [510,511]. Les quatre sérotypes ont également été identifiés au Nigéria et au Sénégal [19,106,512].

Contrairement à la dengue, il n'existait pas d'informations sur la circulation du ZIKV au Burkina Faso. Nous avons trouvé une séroprévalence de ZIKV de 22,6% chez les donneurs de sang. Ce pourcentage est assez élevé vu que le pays n'a jamais identifié de cas cliniques. Une enquête sérologique réalisée entre 1963 et 1964 en république de Haute-Volta (actuel Burkina Faso) avait mis en évidence la circulation du ZIKV [142]. Notre étude est la première réalisée depuis les importantes épidémies de la maladie associées au ZIKV qu'a connu le monde en 2007 et 2013 [131,190]. Malgré la mise en place de la surveillance des arbovirus en 2014 au Burkina Faso, aucun cas de ZIKV n'a été répertorié. Un seul cas positif aux IgG anti ZIKV a été détecté par Elisa en 2018 par le LNR-FHV mais le test de séroneutralisation n'ayant pas pu être réalisé à l'époque, le résultat n'a pas pu être confirmé (données non publiées du LNR-FHV). Aussi dans la littérature, nous n'avons pas rencontré des cas de microcéphalies chez les nouveau-nés ou des cas de Guillain barrés rapportés au Burkina Faso, alors que ces deux symptômes neurologiques sont typiques des complications dues à l'infection au ZIKV. Cependant, ces troubles neurologiques sont relativement rares et les lignées africaines et asiatiques peuvent avoir une virulence différente [513] et il n'a pas été clairement établi si la lignée africaine du ZIKV a la capacité de provoquer une microcéphalie ou non. Une étude expérimentale a montré une transmissibilité plus élevée de la lignée africaine du ZIKV chez les moustiques par rapport à la lignée asiatique [514]. Aussi la lignée africaine provoquerait une létalité plus importante chez les souris adultes et les fœtus que la lignée asiatique [514]. Au vu des résultats de cette étude, une hypothèse avancée pour expliquer la non survenue d'épidémies majeures en Afrique est que le virus a pu circuler en provoquant d'avantage de morts fœtales que de malformations congénitales, ce qui a dû échapper aux systèmes de surveillance de nombreux pays africains. Il serait donc important de pouvoir déterminer la souche circulant au

Burkina Faso et pour cela il faut pouvoir détecter le virus chez des patients virémiques. Lors de la maladie à ZIKV chez l'homme, la virémie est de courte durée mais la virurie se prolonge sur des temps plus longs. Par ailleurs l'ARN viral est plus facilement détectable dans la salive des personnes infectées que dans les prélèvements sanguins [164,203]. Une définition claire de cas suspects basés sur les signes cliniques et des prélèvements précoces d'urine et de salive associés à des prélèvements sanguins pourrait ainsi augmenter la probabilité d'avoir des cas positifs aux tests moléculaires et ainsi d'isoler, amplifier et identifier la ou les souche(s) circulante(s). Au vu de nos résultats, nous pouvons dire que le ZIKV a probablement circulé à bas bruit et que les cas d'infections chez l'Homme sont passés inaperçus en raison de la faible capacité de diagnostic et de surveillance.

Il est à noter que la co-circulation du DENV et du ZIKV peut augmenter la survenue de formes graves de DENV au Burkina Faso. En effet il existe un effet ADE qui se produit en cas d'exposition préalable au ZIKV et d'une infection ultérieure au DENV [515]. La connaissance du statut sérologique d'une population donnée vis-à-vis de DENV et ZIKV est donc importante afin d'évaluer le risque associé à cet effet ADE.

2.2 Le virus du Nil occidental et le virus Usutu

❖ Chez l'Homme

Il y'a très peu d'informations sur la circulation du WNV chez l'homme en Afrique de l'Ouest y compris le Burkina Faso. La plupart des études concernent les animaux et les vecteurs. Nous avons trouvé une séroprévalence du WNV de 19,16% chez les donneurs de sang. Une étude de modélisation avait identifié deux pays limitrophes du Burkina Faso, le Togo et le Bénin comme des zones à risque d'émergence du WNV [516]. Seulement deux études en Afrique ont traité de la séroprévalence du WNV chez les donneurs de sang : une étude en Egypte

qui a rapporté une séroprévalence élevée de 55%, et une au Rwanda qui a rapporté une séroprévalence de 10,4%.

Le seul cas humain d'infection par le USUV en Afrique de l'Ouest a été identifié au Burkina Faso en 2004, ce qui suggère que ce virus a circulé dans le pays il y a cela plusieurs années [10]. Nous avons donc voulu évaluer l'ampleur de la circulation de ce virus dans la population. Nos résultats montrent une séroprévalence de 14,17%. Cette étude qui a concerné les donneurs de sang est la première réalisée en Afrique. Les seules données disponibles concernant les donneurs de sang proviennent d'études réalisées en Europe notamment en Italie, en Allemagne et en Hongrie où on note des séroprévalences assez faibles (environ 1%) [235,517–519].

10% des personnes incluses dans notre étude présentaient des co-portages des anticorps contre le WNV et l'USUV. Ce qui peut rendre l'interprétation des résultats de séroneutralisation complexe. Les échantillons qui étaient positifs à la fois pour le WNV et l'USUV ont été considérés comme positifs pour l'un ou l'autre virus, lorsque le titre d'anticorps pour un virus était 4 fois plus élevé que le titre d'anticorps pour l'autre virus. Le WNV ET l'USUV ne faisant pas partie des arbovirus systématiquement recherchés par le LNR-FHV donc des cas cliniques ont pu passer inaperçus.

❖ **Chez les animaux**

En plus des études réalisées sur des échantillons humains nous avons ciblé des animaux pouvant être des hôtes potentiels d'un point de vue épidémiologique. Nous avons mis en évidence la présence des anticorps contre ces deux virus chez les chevaux, les chiens et les pigeons domestiques. Plusieurs études ont permis d'identifier les chevaux, les chiens, les oiseaux domestiques et les poulets comme des hôtes accidentels de l'USUV et du WNV [59,210,520–523]. Les chevaux sont connus comme une espèce particulièrement sensible à l'infection par le WNV et l'USUV, et jouent un rôle important dans le risque de transmission

épizootique du WNV [272,524]. Nous avons trouvé une séroprévalence élevée du WNV (17,28 %) par rapport à l'USUV (6,17 %) chez les chevaux. Des études antérieures ont rapporté une séroprévalence élevée du WNV chez les chevaux en Afrique sub-saharienne, en particulier en Côte d'Ivoire, au Nigeria et au Tchad [525,526]. Une autre étude réalisée au Maroc a rapporté des preuves sérologiques de la circulation de l'USUV et du WNV chez les chevaux mais aussi chez les chiens [521].

Bien que les chiens ne soient pas décrits comme développant des signes cliniques après une infection par l'USUV et le WNV, notre étude les a inclus comme candidats pertinents pour la surveillance en raison de leur proximité avec les humains et de leur taux d'exposition élevé au WNV, comme cela a été précédemment documenté [521]. Nous avons trouvé un seul chien positif aux anticorps anti-WNV et aucun aux anticorps anti-USUV. Le faible nombre de chiens inclus dans l'étude (52) ne nous permet néanmoins pas de conclure concernant l'importance de la circulation de ces virus chez ces animaux.

Bien que nous ayons détecté des oiseaux domestiques positifs aux anticorps contre l'USUV et le WNV (un positif USUV et un positif WNV), le faible échantillon de pigeons (21) collectés ne nous a pas permis comme dans le cas des études sur les canidés de mesurer l'étendue réelle de la circulation de ces virus dans cette population d'oiseaux domestiques. Le mode de vie des pigeons (déplacements réguliers) suggèrent que cette population pourrait être plus exposée que les mammifères aux infections par ces virus. A ce jour, il y a eu très peu d'études sur les pigeons domestiques, alors que la première infection par le WNV chez les oiseaux a été détectée dans les organes et le sang d'un pigeon, en 1955 [527]. Notre étude est la première à montrer des preuves sérologiques de l'USUV chez les pigeons domestiques en Afrique de l'Ouest. Les rares études réalisées sur la circulation d'USUV chez les pigeons domestiques concernent les pays européens notamment la Grèce et l'Espagne [255,528]. Pour le WNV, une étude sérologique chez les pigeons domestiques au Nigeria a rapporté une séroprévalence de 3,5% [529]. Une

autre étude menée au Mali a montré la présence d'anticorps USUV et WNV chez d'autres espèces d'oiseaux domestiques : le canard et le poulet [210]. Ainsi une étude à grande échelle sur les pigeons domestiques au Burkina Faso permettrait de mieux évaluer le rôle de ce réservoir dans la circulation de l'USUV et du WNV dans le pays.

2.3 Le virus Chikungunya et le virus O'nyong nyong

Nous avons obtenu des séroprévalences élevées de CHIKV (56,6%) et d'ONNV (54,6%) au sein des donneurs de sang de notre cohorte. Une étude publiée en 2022 a rapporté une séroprévalence de CHIKV de 29% sur des échantillons collectés en 2015 en population générale dans la capitale Burkinabè (Ouagadougou) [56]. Ce sont les seules données qui existent sur la circulation de ce virus au Burkina Faso. Les preuves sérologiques et/ou moléculaires de la circulation du CHIKV ont été rapportées dans plus de 30 pays africains dont la Côte d'Ivoire et le Bénin, deux pays limitrophes du Burkina Faso avec lesquels ils existent de nombreux échanges de biens et de personnes [434,435]. A la différence de la plupart des arbovirus, l'infection au CHIKV est symptomatique dans près de 75% des cas. [405]. Les patients développent principalement des symptômes de type de fièvre, d'arthralgies, d'éruptions cutanées et une fatigue générale [89]. Ces symptômes sont semblables à ceux d'autres infections courantes au Burkina Faso telles que le paludisme et la dengue. Nos résultats suggèrent que le virus a circulé dans la population et a pu être confondu avec le paludisme, la dengue ou d'autres maladies fébriles.

La circulation d'ONNV n'a jamais été mise en évidence au Burkina Faso avant notre étude. Contrairement au CHIKV, l'ONNV circule moins en Afrique même si nous pensons que cette circulation est largement sous-estimée du fait du manque de système de surveillance du virus dans les différents pays. Les résultats de notre étude en sont une illustration parfaite. Aussi il n'existe pas de kits commerciaux pour les tests moléculaires et sérologiques et la cinétique des

marqueurs biologiques est mal connue [488]. L'ONNV a été détecté dans deux pays limitrophes du Burkina Faso : le Ghana et la Côte d'Ivoire avec une épidémie en Côte d'Ivoire en 2013 [58,477]. L'infection à l'ONNV présente une symptomatologie semblable à celle du CHIKV et il pourrait avoir également circulé en étant confondu avec d'autres pathologies.

33,6% de co-portage d'anticorps anti-CHIKV et anti-ONNV ont été identifiés. Des tests de séroneutralisation seraient intéressants pour mieux comprendre ces co-portages. En effet ces deux virus sont phylogénétiquement proches et il existe des réactions sérologiques croisées entre ces virus. Une étude réalisée au Kenya avait également rapporté une co-circulation du CHIKV et d'ONNV [471].

3. Circulation des arbovirus chez les vecteurs (moustiques) au Burkina Faso

On trouve principalement 2 genres de moustiques capables de transmettre les arbovirus au Burkina Faso. Il s'agit d'*Aedes* et de *Culex*. Lors d'une étude réalisée en 2019 au Burkina Faso sur les vecteurs potentiels des arbovirus, 98% des vecteurs étaient représentés par l'espèce *Aedes aegypti* [530]. Nos collaborateurs ont ciblé deux espèces de moustiques dans notre étude : *Culex quinquefasciatus* et *Aedes aegypti*. La recherche du DENV, du ZIKV, du WNV, d'USUV et du CHIKV par RT-qPCR dans ces moustiques était négative malgré l'existence de preuves moléculaires de la circulation du DENV chez les humains au Burkina Faso. Nos résultats montrent la difficulté d'identifier et de suivre ces virus chez les moustiques pendant les périodes hors épidémiques. En général, la détection des arbovirus dans les populations naturelles de moustiques n'est pas très sensible, sauf si les collectes de moustiques sont effectuées pendant une circulation importante du virus ou pendant une épidémie [531]. Un échantillonnage plus exhaustif des moustiques ou une collecte ciblée de moustiques dans les

localités où nous avons identifié des animaux positifs augmenterait la probabilité de trouver des spécimens positifs dans la population de vecteurs.

Plusieurs arbovirus ont été identifiés chez les moustiques au Burkina Faso de par le passé. Entre 1983 et 1986, une surveillance des arbovirus chez les moustiques a permis d'identifier le YFV et le DENV-2. Le YFV a été identifiées chez *Aedes luteocephalus* et *Aedes furcifer*, tous des vecteurs sylvatiques. Le DENV-2 a été identifié chez *Aedes luteocephalus* au niveau sylvatique et chez *Aedes aegypti* au niveau urbain [505]. Récemment en 2016 le CHIKV et le DENV-2 ont été détectés chez *Aedes aegypti* lors d'une enquête entomologique [532].

4. Les moyens de lutte contre les arbovirus au Burkina Faso

Dans notre étude nous avons trouvé de façon générale, des séroprévalences plus élevées à Ouagadougou par rapport à Bobo-Dioulasso. La forte densité de la population de Ouagadougou et le manque d'assainissement de la ville pourraient expliquer cette différence. Cela souligne l'importance de l'assainissement dans la lutte contre la prolifération des vecteurs donc de la transmission de la maladie. Le Burkina Faso connaît des inondations ces dernières années et cela pourrait contribuer à une émergence ou à une réémergence de certains arbovirus. En effet, l'émergence de certains arbovirus tels que le RVFV a toujours été étroitement lié à des inondations ou à de très fortes pluviométries [533].

Parmi les arbovirus traités dans notre étude, aucun ne dispose de vaccins homologués chez l'Homme. Seul le WNV possède des vaccins homologués chez les chevaux [503]. Ces vaccins ne sont cependant pas utilisés au Burkina Faso par les propriétaires ou éleveurs de chevaux. En effet lors de la collecte de nos échantillons d'animaux, nous avons discuté avec les propriétaires des écuries et les éleveurs qui disent ignorer l'existence du WNV ainsi que de son vaccin. Il serait donc important d'organiser des campagnes de sensibilisation auprès des éleveurs équins sur les arbovirus dont les chevaux constituent des hôtes ou réservoirs.

Etant donné l'absence de traitement et de vaccin contre la plus part des arbovirus, les autorités sanitaires du Burkina Faso doivent mettre l'accent sur la surveillance et la lutte anti vectorielle. Pour cela, il est nécessaire d'impliquer les communautés à travers des campagnes de sensibilisation. En effet, l'engagement communautaire a montré son efficacité dans la réduction de la transmission de la dengue en Amérique centrale et en Amérique du Sud ce qui n'est pas le cas en Afrique [534]. Les autorités devraient organiser des campagnes de sensibilisation des populations afin de les impliquer davantage dans la lutte contre la prolifération des vecteurs. Des études sur la perception et l'acceptabilité des communautés sur les interventions gouvernementales peuvent s'avérer nécessaires afin de mieux adapter ces interventions aux réalités locales. Une étude réalisée au Burkina Faso rapporte que plus de 95% des ménages approuvaient les interventions proposées par le gouvernement dans la prévention contre la dengue pendant les épidémies de 2016 et 2017 et seraient disposés à s'y investir [534]. Ces interventions concernaient la sensibilisation des ménages sur la transmission de la dengue, l'identification et l'élimination des gîtes de reproduction des moustiques et de l'utilisation d'insecticides non dangereux pour la santé dans les domiciles [534].

5. L'approche « One Health » comme solution pour améliorer la surveillance des arbovirus au Burkina Faso

Des politiques de surveillance selon des approches globales permettraient d'anticiper sur les risques de survenue d'épidémies dues aux arbovirus. En effet plusieurs facteurs interviennent dans la survenue des épidémies parmi lesquels on a : i) l'existence de vecteurs compétents ; ii) les fortes pluviométries et les inondations qui peuvent entraîner une augmentation de la densité des vecteurs (moustiques), iii) l'existence d'hôtes amplificateurs ou réservoirs. Une surveillance intégrée qui prend en compte les données climatiques, les

informations sur les vecteurs, les animaux potentiels réservoirs et les humains permettrait d'identifier le risque précocement et d'anticiper sur les futures épidémies.

Il existe très peu d'étude antérieure réalisée au Burkina Faso sur la circulation des arbovirus au niveau des réservoirs animaux. Les résultats de nos travaux renforcent l'idée selon laquelle les systèmes de surveillance en Afrique doivent être basés sur des approches « One Health ». Au cours de la collecte de nos échantillons de chevaux, les propriétaires et éleveurs ont fait cas de syndromes neurologiques dont certains chevaux souffriraient souvent sans que les causes ne puissent être élucidées. Malheureusement ces informations ne sont pas documentées. La mise en place d'une surveillance syndromiques basés sur un certain nombre de signes cliniques chez les chevaux en accord avec les propriétaires et éleveurs permettrait de mieux comprendre ces phénomènes. En effet des études suggèrent qu'environ 20% des chevaux infectés par le WNV développent des signes cliniques à type de fièvre, d'atteintes musculaires et neurologiques. 30% des chevaux qui développent des signes neurologiques sont susceptibles de mourir et 10 à 20% des chevaux guérissent avec des séquelles neurologiques [389].

L'USUV peut être surveillé chez les oiseaux domestiques notamment chez les pigeons. Au Burkina Faso l'élevage des pigeons est très répandu et est effectué dans les domiciles. Ces oiseaux sont faciles d'accès par rapport aux oiseaux sauvages et les informations cliniques peuvent être également obtenues facilement.

Les chevaux et les oiseaux pourraient alors être utilisés comme des sentinelles dans la surveillance des arbovirus tels que le WNV et l'USUV.

6. Autre arbovirus à surveiller : le virus de la fièvre de la vallée du Rift

Un autre arbovirus dont nous pensons qu'il est important de mettre en place des systèmes de surveillance est le RVFV. La RVF est une zoonose qui touche principalement le bétail (bovins, ovins, caprins et chameaux) mais aussi l'Homme [535]. Le virus responsable de

la maladie appartient à la famille des *Phenuiviridae* et au genre *Phlebovirus* [4]. Le virus est transmis à l'Homme et aux animaux par la piqûre d'un moustique infecté ou par l'exposition aux liquides biologiques, au sang et aux tissus d'animaux infectés [536]. Les vecteurs principalement impliqués dans la transmission du RVFV sont les moustiques *Culex*, *Aedes*, *Mansonia* et *Anopheles* [537].

L'importance de surveiller ce virus réside dans le fait qu'en plus de causer une maladie chez l'homme est qu'il peut avoir un impact socio-économique important lié au taux de mortalité élevé causé par la maladie dans les élevages. En effet le taux de mortalité varie selon l'espèce et l'âge de l'animal, et peut atteindre plus de 90 % à 100 % chez les nouveau-nés et les jeunes agneaux [538] et le taux d'avortement peut atteindre 100 % chez les brebis gestantes [539].

Au Burkina Faso, des enquêtes sérologiques réalisées sur des échantillons animaux entre 1985 et 1987 avaient montré une circulation du virus [540–542]. Une autre étude réalisée plus récemment sur 520 échantillons de bovins, caprins et ovins collectés entre 2005 et 2007 a rapporté un taux de prévalence des anticorps spécifiques du RVFV de 7,67% [543]. Depuis lors il n'y a plus eu de données sur la RVFV au Burkina Faso. La récente épidémie qu'a connu le Niger (pays frontalier du Burkina Faso) en 2016 montre que le risque de réémergence de ce virus au Burkina Faso est plus qu'une réalité. Des cas sporadiques de RVFV ont été également rapportés au Mali en 2016 [544].

Le développement de l'agriculture moderne et les inondations observées ces dernières années au Burkina Faso pourraient être des facteurs favorisant la réémergence du RVFV. Il n'existe pas de chiffres sur les pertes économiques dues à la FVR en Afrique de l'Ouest. Mais des études menées dans d'autres parties du continent montrent que les pertes économiques causées par la RVF peuvent être énormes. Par exemple, l'épizootie égyptienne survenue en 1977 aurait coûté à l'industrie de l'élevage du pays (bovins/moutons/chèvres) 82 millions de dollars

US en pertes directes et indirectes [545]. Au Burkina Faso, l'élevage représente l'activité phare des populations les plus démunies. Les populations dans les villages pratiquent l'élevage pour subvenir aux besoins de leurs familles. Ainsi, certains vendent leurs animaux pour payer la scolarité de leurs enfants ou pour régler des situations urgentes qui nécessitent de l'argent. La RVF pourrait représenter également une menace pour la sécurité alimentaire en réduisant la production de lait et de viande.

La mise en place d'un système de surveillance ciblé sur le bétail et les personnes à risque permettrait une détection précoce des cas et de prévenir la survenue d'épidémie. En effet certaines études ont permis d'identifier les vétérinaires, les agriculteurs et éleveurs de bétail et les travailleurs des abattoirs comme des populations à risque [546–548]. La survenue d'avortements massifs dans des troupeaux doit être considérée comme des signes d'alerte.

Il existe des vaccins efficaces pour les animaux, même s'ils ne sont pas utilisés dans de nombreux pays [549,550]. La vaccination des animaux pourrait être un moyen efficace d'arrêter la propagation de la maladie et sa transmission à l'Homme. La meilleure stratégie pour lutter efficacement contre les conséquences de la FVR dans les exploitations est sans aucun doute la vaccination du bétail. Les autorités sanitaires devraient également sensibiliser les populations notamment les éleveurs sur la manipulation des avortons des animaux, la consommation de viande d'animaux morts et la consommation de produits laitiers crus.

Conclusion générale

Notre étude a permis de mettre en évidence la circulation des arbovirus dont la circulation n'avait jamais été démontrée au Burkina Faso. L'étude permet également d'avoir un aperçu sur le pourcentage des personnes immunisées contre la dengue dans le pays après les récentes épidémies de 2016 et 2017. Bien que nous n'ayons pas détecté des arbovirus au niveau moléculaire, nous avons pu identifier certains animaux et oiseaux domestiques (chevaux et pigeons) qui peuvent être utilisés comme des sentinelles dans la surveillance des arbovirus au Burkina Faso. Des études supplémentaires sont nécessaires pour identifier les souches des virus circulants et pour cela il faudrait renforcer la surveillance en mettant l'accent sur les fièvres d'étiologie inconnue en se basant sur des définitions de cas assez claires. Nos collaborateurs de ASTRE ont développé une technique d'identification des nouveaux virus par métagénomique.

Cette technique à l'avantage de rechercher la présence des arbovirus dans les échantillons sans a priori par rapport aux techniques ciblées telles que la PCR. Cette technique sera utilisée pour analyser prochainement les échantillons de fièvres d'étiologie inconnue collectés dans le cadre de cette thèse.

Références

1. Beckham, J.D.; Tyler, K.L. Arbovirus Infections. *Contin. Lifelong Learn. Neurol.* 2015, *21*, 1599–1611.
2. Davis, L.E.; Beckham, J.D.; Tyler, K.L. North American Encephalitic Arboviruses. *Neurol. Clin.* 2008, *26*, 727–757.
3. Figueiredo, L.T.M. Emergent Arboviruses in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 2007, *40*, 224–229.
4. Abudurexiti, A.; Adkins, S.; Alioto, D.; Alkhovsky, S. V.; Avšič-Županc, T.; Ballinger, M.J.; Bente, D.A.; Beer, M.; Bergeron, É.; Blair, C.D.; et al. Taxonomy of the Order Bunyavirales: Update 2019. *Arch. Virol.* **2019**, *164*, 1949–1965, doi:10.1007/S00705-019-04253-6.
5. Liang, G.; Gao, X.; Gould, E.A. Factors Responsible for the Emergence of Arboviruses; Strategies, Challenges and Limitations for Their Control. *Emerg. Microbes Infect.* 2015, *4*.
6. Adelman, Z.N.; Miller, D.M.; Myles, K.M. Bed Bugs and Infectious Disease: A Case for the Arboviruses. *PLoS Pathog.* **2013**, *9*, e1003462, doi:10.1371/journal.ppat.1003462.

7. Wesula Olivia, L.; Obanda, V.; Bucht, G.; Mosomtai, G.; Otieno, V.; Ahlm, C.; Evander, M. Global Emergence of Alphaviruses That Cause Arthritis in Humans. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2015**, *5*, 29853, doi:10.3402/iee.v5.29853.
8. Ananth, S.; Shrestha, N.; Treviño C., J.A.; Nguyen, U.S.; Haque, U.; Angulo-Molina, A.; Lopez-Lemus, U.A.; Lubinda, J.; Sharif, R.M.; Zaki, R.A.; et al. Clinical Symptoms of Arboviruses in Mexico. *Pathogens* **2020**, *9*, 1–16, doi:10.3390/PATHOGENS9110964.
9. Piantadosi, A.; Kanjilal, S. Diagnostic Approach for Arboviral Infections in the United States. *J. Clin. Microbiol.* **2020**, *58*, doi:10.1128/JCM.01926-19.
10. Go, Y.Y.; Balasuriya, U.B.R.; Lee, C. Zoonotic Encephalitides Caused by Arboviruses: Transmission and Epidemiology of Alphaviruses and Flaviviruses. *Clin. Exp. Vaccine Res.* **2014**, *3*, 58, doi:10.7774/cevr.2014.3.1.58.
11. Galán-Huerta, K.A.; Rivas-Estilla, A.M.; Martinez-Landeros, E.A.; Arellanos-Soto, D.; Ramos-Jiménez, J. The Zika Virus Disease: An Overview. *Med. Univ.* **2016**, *18*, 115–124, doi:10.1016/J.RMU.2016.05.003.
12. Braack, L.; Gouveia De Almeida, A.P.; Cornel, A.J.; Swanepoel, R.; De Jager, C. Mosquito-Borne Arboviruses of African Origin: Review of Key Viruses and Vectors. *Parasites and Vectors* **2018**, *11*, 1–26.
13. André Durand, G.; Grarda, G.; Leparc-Goffart, I. Les Arbovirus En France Métropolitaine : Diagnostic et Actualités Épidémiologiques. *Rev. Francoph. des Lab.* **2021**, *2021*, 49–57, doi:10.1016/s1773-035x(21)00038-1.
14. Simonin, Y.; Sillam, O.; Carles, M.J.; Gutierrez, S.; Gil, P.; Constant, O.; Martin, M.F.; Girard, G.; Van de Perre, P.; Salinas, S.; et al. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 875–878, doi:10.3201/eid2405.171122.
15. Dick, O.B.; San Martín, J.L.; Montoya, R.H.; Del Diego, J.; Zambrano, B.; Dayan, G.H. Review: The History of Dengue Outbreaks in the Americas. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *87*, 584–593.
16. Wilder-Smith, A.; Gubler, D.J.; Weaver, S.C.; Monath, T.P.; Heymann, D.L.; Scott, T.W. Epidemic Arboviral Diseases: Priorities for Research and Public Health. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e101–e106.
17. Cleton, N.B.; Reusken, C.B.E.M.; Wagenaar, J.F.P.; van der Vaart, E.E.; Reimerink, J.; van der Eijk, A.A.; Koopmans, M.P.G. Syndromic Approach to Arboviral Diagnostics for Global Travelers as a Basis for Infectious Disease Surveillance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, doi:10.1371/journal.pntd.0004073.
18. Lequime, S.; Paul, R.E.; Lambrechts, L. Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*.
19. Tinto, B.; Kania, D.; Samdapawindé Kagone, T.; Dicko, A.; Traore, I.; De Rekeneire, N.; Bicaba, B.W.; Hien, H.; Van de Perre, P.; Simonin, Y.; et al. Dengue Virus Circulation in West Africa: An Emerging Public Health Issue. *Medecine/Sciences* **2022**, *38*, 152–158, doi:10.1051/medsci/2022007.
20. Sow, A.; Nikolay, B.; Faye, O.; Cauchemez, S.; Cano, J.; Diallo, M.; Faye, O.; Sadio, B.; Ndiaye, O.; Weaver, S.C.; et al. Changes in the Transmission Dynamic of

- Chikungunya Virus in Southeastern Senegal. *Viruses* **2020**, *12*, doi:10.3390/V12020196.
21. Faye, O.; de Lourdes Monteiro, M.; Vrancken, B.; Prot, M.; Lequime, S.; Diarra, M.; Ndiaye, O.; Valdez, T.; Tavarez, S.; Ramos, J.; et al. Genomic Epidemiology of 2015-2016 Zika Virus Outbreak in Cape Verde. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26*, 1084–1090, doi:10.3201/EID2606.190928.
 22. Sow, A.; Faye, O.; Ba, Y.; Diallo, D.; Fall, G.; Faye, O.; Bob, N.S.; Loucoubar, C.; Richard, V.; Dia, A.T.; et al. Widespread Rift Valley Fever Emergence in Senegal in 2013-2014. *Open Forum Infect. Dis.* **2016**, *3*, doi:10.1093/ofid/ofw149.
 23. Lagare, A.; Fall, G.; Ibrahim, A.; Ousmane, S.; Sadio, B.; Abdoulaye, M.; Alhassane, A.; Mahaman, A.E.; Issaka, B.; Sidikou, F.; et al. First Occurrence of Rift Valley Fever Outbreak in Niger, 2016. *Vet. Med. Sci.* **2019**, *5*, 70–78, doi:10.1002/vms3.135.
 24. Masmajan, S.; Musso, D.; Vouga, M.; Pomar, L.; Dashraath, P.; Stojanov, M.; Panchaud, A.; Baud, D. Zika Virus. *Pathog. (Basel, Switzerland)* **2020**, *9*, 1–14, doi:10.3390/PATHOGENS9110898.
 25. Mallah, S.I.; Ghorab, O.K.; Al-Salmi, S.; Abdellatif, O.S.; Tharmaratnam, T.; Iskandar, M.A.; Sefen, J.A.N.; Sidhu, P.; Atallah, B.; El-Lababidi, R.; et al. COVID-19: Breaking down a Global Health Crisis. *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.* **2021**, *20*, doi:10.1186/S12941-021-00438-7.
 26. Kamorudeen, R.T.; Adedokun, K.A.; Olarinmoye, A.O. Ebola Outbreak in West Africa, 2014 – 2016: Epidemic Timeline, Differential Diagnoses, Determining Factors, and Lessons for Future Response. *J. Infect. Public Health* **2020**, *13*, 956–962, doi:10.1016/J.JIPH.2020.03.014.
 27. Stramer, S.L.; Hollinger, F.B.; Katz, L.M.; Kleinman, S.; Metzler, P.S.; Gregory, K.R.; Dodd, R.Y. Emerging Infectious Disease Agents and Their Potential Threat to Transfusion Safety: *Transfusion* **2009**, *49*, doi:10.1111/j.1537-2995.2009.02279.x.
 28. Antia, R.; Regoes, R.R.; Koella, J.C.; Bergstrom, C.T. The Role of Evolution in the Emergence of Infectious Diseases. *Nature* **2003**, *426*, 658–661, doi:10.1038/nature02104.
 29. Cleton, N.B.; Reusken, C.B.E.M.; Wagenaar, J.F.P.; van der Vaart, E.E.; Reimerink, J.; van der Eijk, A.A.; Koopmans, M.P.G. Syndromic Approach to Arboviral Diagnostics for Global Travelers as a Basis for Infectious Disease Surveillance. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0004073, doi:10.1371/journal.pntd.0004073.
 30. Weaver, S.C.; Reisen, W.K. Present and Future Arboviral Threats. *Antiviral Res.* **2010**, *85*, 328–345.
 31. Gould, E.A.; Higgs, S. Impact of Climate Change and Other Factors on Emerging Arbovirus Diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 109–121.
 32. Bellone, R.; Failloux, A.B. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*.
 33. Sukhralia, S.; Verma, M.; Gopirajan, S.; Dhanaraj, P.S.; Lal, R.; Mehla, N.; Kant, C.R. From Dengue to Zika: The Wide Spread of Mosquito-Borne Arboviruses. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2019**, *38*, 3–14.

34. Mayer, S. V.; Tesh, R.B.; Vasilakis, N. The Emergence of Arthropod-Borne Viral Diseases: A Global Prospective on Dengue, Chikungunya and Zika Fevers. *Acta Trop.* 2017, *166*, 155–163.
35. Taylor, L.H.; Latham, S.M.; Woolhouse, M.E.J. Risk Factors for Human Disease Emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2001**, *356*, 983–989, doi:10.1098/rstb.2001.0888.
36. Jones, K.E.; Patel, N.G.; Levy, M.A.; Storeygard, A.; Balk, D.; Gittleman, J.L.; Daszak, P. Global Trends in Emerging Infectious Diseases. *Nature* **2008**, *451*, 990–993, doi:10.1038/nature06536.
37. Lloyd-Smith, J.O.; George, D.; Pepin, K.M.; Pitzer, V.E.; Pulliam, J.R.C.; Dobson, A.P.; Hudson, P.J.; Grenfell, B.T. Epidemic Dynamics at the Human-Animal Interface. *Science (80-.)*. 2009, *326*, 1362–1367.
38. Gubler, D.J. The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases as Public Health Problems. In Proceedings of the Archives of Medical Research; Arch Med Res, July 2002; Vol. 33, pp. 330–342.
39. Weaver, S.C. Urbanization and Geographic Expansion of Zoonotic Arboviral Diseases: Mechanisms and Potential Strategies for Prevention. *Trends Microbiol.* 2013, *21*, 360–363.
40. Weaver, S.C. Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2921, doi:10.1371/journal.pntd.0002921.
41. Aranda, C.; Martínez, M.J.; Montalvo, T.; Eritja, R.; Navero-Castillejos, J.; Herreros, E.; Marqués, E.; Escosa, R.; Corbella, I.; Bigas, E.; et al. Arbovirus Surveillance: First Dengue Virus Detection in Local *Aedes Albopictus* Mosquitoes in Europe, Catalonia, Spain, 2015. *Eurosurveillance* **2018**, *23*, 1, doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.23.47.1700837.
42. Mariconti, M.; Obadia, T.; Mousson, L.; Malacrida, A.; Gasperi, G.; Failloux, A.B.; Yen, P.S. Estimating the Risk of Arbovirus Transmission in Southern Europe Using Vector Competence Data. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–10, doi:10.1038/s41598-019-54395-5.
43. Brown, C.R.; O’Brien, V.A. Are Wild Birds Important in the Transport of Arthropod-Borne Viruses? *Ornithol. Monogr.* **2011**, *71*, 1–64, doi:10.1525/om.2011.71.1.1.
44. Sigfrid, L.; Reusken, C.; Eckerle, I.; Nussenblatt, V.; Lipworth, S.; Messina, J.; Kraemer, M.; Ergonul, O.; Papa, A.; Koopmans, M.; et al. Preparing Clinicians for (Re-)Emerging Arbovirus Infectious Diseases in Europe. *Clin. Microbiol. Infect.* 2018, *24*, 229–239.
45. Beck, C.; Jimenez-Clavero, M.A.; Leblond, A.; Durand, B.; Nowotny, N.; Leparco-Goffart, I.; Zientara, S.; Jourdain, E.; Lecollinet, S. Flaviviruses in Europe: Complex Circulation Patterns and Their Consequences for the Diagnosis and Control of West Nile Disease. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2013, *10*, 6049–6083.
46. Bisset, J.A.; Marín, R.; Rodríguez, M.M.; Severson, D.W.; Ricardo, Y.; French, L.; Díaz, M.; Pérez, O. Insecticide Resistance in Two *Aedes Aegypti* (Diptera: Culicidae) Strains from Costa Rica. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 352–361, doi:10.1603/ME12064.
47. Kilpatrick, A.M.; Randolph, S.E. Drivers, Dynamics, and Control of Emerging Vector-

- Borne Zoonotic Diseases. *Lancet* 2012, 380, 1946–1955.
48. Liang, G.; Gao, X.; Gould, E.A. Factors Responsible for the Emergence of Arboviruses; Strategies, Challenges and Limitations for Their Control. *Emerg. Microbes Infect.* 2015, 4.
 49. Gubler, D.J. Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21 St Century. *Trop. Med. Health* 2011, 39, 3–11.
 50. Tarnagda, Z.; Cissé, A.; Bicaba, B.W.; Diagbouga, S.; Sagna, T.; Ilboudo, A.K.; Tialla, D.; Lingani, M.; Sondo, K.A.; Yougbaré, I.; et al. Dengue Fever in Burkina Faso, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2018, 24, 170–172.
 51. Sanou, A.S.; Dirlikov, E.; Sondo, K.A.; Kagoné, T.S.; Yameogo, I.; Sow, H.E.; Adjami, A.G.; Traore, S.M.; Dicko, A.; Tinto, B.; et al. Building Laboratory-Based Arbovirus Sentinel Surveillance Capacity During an Ongoing Dengue Outbreak, Burkina Faso, 2017. *Heal. Secur.* **2018**, 16, S-103-S-110, doi:10.1089/hs.2018.0048.
 52. Braack, L.; Gouveia De Almeida, A.P.; Cornel, A.J.; Swanepoel, R.; De Jager, C. Mosquito-Borne Arboviruses of African Origin: Review of Key Viruses and Vectors. *Parasites and Vectors* 2018, 11, 1–26.
 53. Thomson, M.C.; Muñoz, Á.G.; Cousin, R.; Shumake-Guillemot, J. Climate Drivers of Vector-Borne Diseases in Africa and Their Relevance to Control Programmes. *Infect. Dis. Poverty* **2018**, 7, 1–22, doi:10.1186/s40249-018-0460-1.
 54. Leta, S.; Beyene, T.J.; De Clercq, E.M.; Amenu, K.; Kraemer, M.U.G.; Revie, C.W. Global Risk Mapping for Major Diseases Transmitted by *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*. *Int. J. Infect. Dis.* **2018**, 67, 25–35, doi:10.1016/j.ijid.2017.11.026.
 55. Weetman, D.; Kamgang, B.; Badolo, A.; Moyes, C.L.; Shearer, F.M.; Coulibaly, M.; Pinto, J.; Lambrechts, L.; McCall, P.J. *Aedes* Mosquitoes and *Aedes*-Borne Arboviruses in Africa: Current and Future Threats. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018, 15, 220.
 56. Kyungah Lim, J.; Ridde, V.; Todagbe Agnandji, S.; Lell, B.; Yaro, S.; Seung Yang, J.; Hoinard, D.; Weaver, S.C.; Vanhomwegen, J.; Salje, H.; et al. Seroepidemiological Reconstruction of Long-Term Chikungunya Virus Circulation in Burkina Faso and Gabon. *J. Infect. Dis.* **2022**, doi:10.1093/infdis/jiac246.
 57. Mencattelli, G.; Ndione, M.H.D.; Rosà, R.; Marini, G.; Diagne, C.T.; Diagne, M.M.; Fall, G.; Faye, O.; Diallo, M.; Faye, O.; et al. Epidemiology of West Nile Virus in Africa: An Underestimated Threat. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, 16, e0010075, doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0010075.
 58. Rezza, G.; Chen, R.; Weaver, S.C. O'nyong-Nyong Fever: A Neglected Mosquito-Borne Viral Disease. *Pathog. Glob. Health* 2017, 111, 271–275.
 59. Roesch, F.; Moratorio, G.; Moratorio, G.; Vignuzzi, M. Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses* 2019, 11, 640.
 60. Raulino, R.; Thaurignac, G.; Keita, A.K.; Esteban, A.; Goumou, S.; Diallo, R.; Ndimbo-Kumugo, S.P.; Ndong Bass, I.; Mbala Kingebeni, P.; Toure, A.; et al. Seroprevalence of IgG Antibodies Against Multiple Arboviruses in Bats from Cameroon, Guinea, and the Democratic Republic of Congo. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2022**, 22, 252–262, doi:10.1089/vbz.2021.0076.

61. Blahove, M.R.; Carter, J.R. Flavivirus Persistence in Wildlife Populations. *Viruses* 2021, *13*.
62. Brites-Neto, J.; Duarte, K.M.R.; Martins, T.F. Tick-Borne Infections in Human and Animal Population Worldwide. *Vet. World* **2015**, *8*, 301–315, doi:10.14202/vetworld.2015.301-315.
63. 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. *Vet. Microbiol.* 2017, *201*, 85–92.
64. Mendoza-Roldan, J.A.; Mendoza-Roldan, M.A.; Otranto, D. Reptile Vector-Borne Diseases of Zoonotic Concern. *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.* 2021, *15*, 132–142.
65. Michel, F.; Sieg, M.; Fischer, D.; Keller, M.; Eiden, M.; Reuschel, M.; Schmidt, V.; Schwehn, R.; Rinder, M.; Urbaniak, S.; 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.
66. Weaver, S.C.; Winegar, R.; Manger, I.D.; Forrester, N.L. Alphaviruses: Population Genetics and Determinants of Emergence. *Antiviral Res.* 2012, *94*, 242–257.
67. Mao, Q.; Wu, W.; Liao, Z.; Li, J.; Jia, D.; Zhang, X.; Chen, Q.; Chen, H.; Wei, J.; Wei, T. Viral Pathogens Hitchhike with Insect Sperm for Paternal Transmission. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, doi:10.1038/s41467-019-08860-4.
68. Madewell, Z.J. Arboviruses and Their Vectors. *South. Med. J.* 2020, *113*, 520–523.
69. Williams, M.C.; Woodall, J.P.; Corbet, P.S.; Gillett, J.D. O'nyong-Nyong Fever: An Epidemic Virus Disease in East Africa VIII. Virus Isolations from Anopheles Mosquitoes. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1965**, *59*, 300–306, doi:10.1016/0035-9203(65)90012-X.
70. Halstead, S.B. Dengue Virus-Mosquito Interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 2008, *53*, 273–291.
71. Shi, J.; Hu, Z.; Deng, F.; Shen, S. Tick-Borne Viruses. *Viol. Sin.* 2018, *33*, 21–43.
72. Chastel, C.; Camicas, J.-L. Arbovirus Transmis Par Des Tiques et Pathogènes Pour l'homme Ou Pour Les Animaux Domestiques. *Bull. la Société Entomol. Fr.* **1984**, *89*, 775–794, doi:10.3406/bsef.1984.18122.
73. Germain, M.; Saluzzo, J.F.; Cornet, J.P.; Hervé, J.P.; Sureau, P.; Camicas, J.L.; Robin, Y.; Salaün, J.J.; Hème, G. Isolement Du Virus de La Fièvre Jaune à Partir de La Ponte et de Larves d'une Tique Amblyomma Variegatum. *Comptes rendus des seances l'Academie des Sci. Ser. D, Sci. Nat.* **1979**, *289*, 635–637.
74. Taufflieb, R.; Cornet, M.; Camicas, J.-L. Les Vecteurs d' Arbovirus Au Sénégal. *Ent. Med* **1968**, *4*, 221–223.
75. Gresikova, M.; Sekeyova, M.; Tempera, G.; Guglielmino, S.; Castro, A. Identification of a Sindbis Virus Strain Isolated from Hyalomarginatum Ticks in Sicily. *Acta Virol.* **1978**, *22*, 231–232.
76. Weaver, S.C.; Barrett, A.D.T. Transmission Cycles, Host Range, Evolution and Emergence of Arboviral Disease. *Nat. Rev. Microbiol.* 2004, *2*, 789–801.

77. Clé, M.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Beck, C.; Gutierrez, S.; Baldet, T.; Vande Perre, P.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Le Virus Usutu : La Menace Fantôme. *médecine/sciences* **2018**, *34*, 709–716, doi:10.1051/MEDSCI/20183408018.
78. Musso, D.; Desprès, P. Serological Diagnosis of Flavivirus-Associated Human Infections. *Diagnostics* **2020**, *10*.
79. Hall, R.A.; Blitvich, B.J.; Johansen, C.A.; Blacksell, S.D. Advances in Arbovirus Surveillance, Detection and Diagnosis. *J. Biomed. Biotechnol.* **2012**, *2012*.
80. Fagour, L.; Santamaria, C.; Césaire, R. Les Tests de Diagnostic Rapide Dans Le Diagnostic Des Arboviroses. *Rev. Francoph. des Lab.* **2015**, *2015*, 51–62, doi:10.1016/S1773-035X(15)30201-X.
81. Parida, M.; Posadas, G.; Inoue, S.; Hasebe, F.; Morita, K. Real-Time Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification for Rapid Detection of West Nile Virus. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 257–263, doi:10.1128/JCM.42.1.257-263.2004.
82. Linke, S.; MacKay, W.G.; Scott, C.; Wallace, P.; Niedrig, M. Second External Quality Assessment of the Molecular Diagnostic of West Nile Virus: Are There Improvements towards the Detection of WNV? *J. Clin. Virol.* **2011**, *52*, 257–260, doi:10.1016/j.jcv.2011.08.010.
83. Muller, D.A.; Depelsenaire, A.C.I.; Young, P.R. Clinical and Laboratory Diagnosis of Dengue Virus Infection. *J. Infect. Dis.* **2017**, *215*, S89–S95, doi:10.1093/infdis/jiw649.
84. Greiser-Wilke, I.M.; Moennig, V.; Kaaden, O.R.; Shope, R.E. Detection of Alphaviruses in a Genus-Specific Antigen Capture Enzyme Immunoassay Using Monoclonal Antibodies. *J. Clin. Microbiol.* **1991**, *29*, 131–137, doi:10.1128/jcm.29.1.131-137.1991.
85. Musso, D.; Gubler, D.J. Zika Virus. *Clin. Microbiol. Rev.* **2016**, *29*, 487–524, doi:10.1128/CMR.00072-15.
86. Rabe, I.B.; Staples, J.E.; Villanueva, J.; Hummel, K.B.; Johnson, J.A.; Rose, L.; Hills, S.; Wasley, A.; Fischer, M.; Powers, A.M. Interim Guidance for Interpretation of Zika Virus Antibody Test Results. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 543–546, doi:10.15585/mmwr.mm6521e1.
87. Lanciotti, R.S.; Kosoy, O.L.; Laven, J.J.; Velez, J.O.; Lambert, A.J.; Johnson, A.J.; Stanfield, S.M.; Duffy, M.R. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 1232–1239, doi:10.3201/eid1408.080287.
88. Guzman, M.G.; Halstead, S.B.; Artsob, H.; Buchy, P.; Farrar, J.; Gubler, D.J.; Hunsperger, E.; Kroeger, A.; Margolis, H.S.; Martí-nez, E.; et al. Dengue: A Continuing Global Threat. *Nat. Rev. Microbiol.* **2010**, *8*, S7–S16, doi:10.1038/nrmicro2460.
89. Adam, A.; Jassoy, C. Epidemiology and Laboratory Diagnostics of Dengue, Yellow Fever, Zika, and Chikungunya Virus Infections in Africa. *Pathogens* **2021**, *10*.
90. Tuiskunen Bäck, A.; Lundkvist, Å. Dengue Viruses – an Overview. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2013**, *3*, 19839, doi:10.3402/iee.v3i0.19839.

91. Fondation Mérieux Renforcement Des Capacités de Biosûreté Des Pays Du G5 Sahel : Exercice de Déploiement Du Laboratoire Mobile Au Burkina Faso Available online: <https://www.fondation-merieux.org/actualites/renforcement-des-capacites-de-biosurete-des-pays-du-g5-sahel-exercice-de-deploiement-du-laboratoire-mobile-au-burkina-faso/> (accessed on 31 August 2022).
92. Dieng, I.; Hedible, B.G.; Diagne, M.M.; El Wahed, A.A.; Diagne, C.T.; Fall, C.; Richard, V.; Vray, M.; Weidmann, M.; Faye, O.; et al. Mobile Laboratory Reveals the Circulation of Dengue Virus Serotype I of Asian Origin in Medina Gounass (Guediawaye), Senegal. *Diagnostics* **2020**, *10*, doi:10.3390/diagnostics10060408.
93. Rastogi, M.; Sharma, N.; Singh, S.K. Flavivirus NS1: A Multifaceted Enigmatic Viral Protein. *Virol. J.* 2016, *13*.
94. Edeling, M.A.; Diamond, M.S.; Fremont, D.H. Structural Basis of Flavivirus NS1 Assembly and Antibody Recognition. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2014**, *111*, 4285–4290, doi:10.1073/pnas.1322036111.
95. Zhang, X.; Jia, R.; Shen, H.; Wang, M.; Yin, Z.; Cheng, A. Structures and Functions of the Envelope Glycoprotein in Flavivirus Infections. *Viruses* 2017, *9*, 338.
96. van Leur, S.W.; Heunis, T.; Munnur, D.; Sanyal, S. Pathogenesis and Virulence of Flavivirus Infections. *Virulence* 2021, *12*, 2814–2838.
97. Guzman, M.G.; Gubler, D.J.; Izquierdo, A.; Martinez, E.; Halstead, S.B. Dengue Infection. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2016**, *2*, 1–25, doi:10.1038/nrdp.2016.55.
98. Whitehorn, J.; Farrar, J. Dengue. *Br. Med. Bull.* 2010, *95*, 161–173.
99. Franco, L.; di Caro, A.; Carletti, F.; Vapalahti, O.; Renaudat, C.; Zeller, H.; Tenorio, A. Recent Expansion of Dengue Virus Serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 1–4, doi:10.2807/ese.15.07.19490-en.
100. Murray, N.E.A.; Quam, M.B.; Wilder-Smith, A. Epidemiology of Dengue: Past, Present and Future Prospects. *Clin. Epidemiol.* 2013, *5*, 299–309.
101. Amarasinghe, A.; Kuritsky, J.N.; William Letson, G.; Margolis, H.S. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1349–1354, doi:10.3201/eid1708.101515.
102. Ridde, V.; Agier, I.; Bonnet, E.; Carabali, M.; Dabiré, K.R.; Fournet, F.; Ly, A.; Meda, I.B.; Parra, B. Presence of Three Dengue Serotypes in Ouagadougou (Burkina Faso): Research and Public Health Implications. *Infect. Dis. Poverty* **2016**, *5*, 23, doi:10.1186/s40249-016-0120-2.
103. Eldin, C.; Gautret, P.; Nougairede, A.; Sentis, M.; Ninove, L.; Saidani, N.; Million, M.; Brouqui, P.; Charrel, R.; Parola, P. Identification of Dengue Type 2 Virus in Febrile Travellers Returning from Burkina Faso to France, Related to an Ongoing Outbreak, October to November 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.50.30425.
104. Lim, J.K.; Seydou, Y.; Carabali, M.; Barro, A.; Dahourou, D.L.; Lee, K.S.; Nikiema, T.; Namkung, S.; Lee, J.S.; Shin, M.Y.; et al. Clinical and Epidemiologic Characteristics Associated with Dengue during and Outside the 2016 Outbreak Identified in Health Facility-Based Surveillance in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2019**, *13*, doi:10.1371/journal.pntd.0007882.

105. Ninove, L.; Parola, P.; Baronti, C.; De Lamballerie, X.; Gautret, P.; Doudier, B.; Charrel, R.N. Dengue Virus Type 3 Infection in Traveler Returning from West Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, *15*, 1871–1872.
106. Onoja, A.B.; Adeniji, J.A.; Olaleye, O.D. High Rate of Unrecognized Dengue Virus Infection in Parts of the Rainforest Region of Nigeria. *Acta Trop.* **2016**, *160*, 39–43, doi:10.1016/j.actatropica.2016.04.007.
107. Fagbami, A.H.; Onoja, A.B. Dengue Haemorrhagic Fever: An Emerging Disease in Nigeria, West Africa. *J. Infect. Public Health* 2018, *11*, 757–762.
108. Manu, S.K.; Bonney, J.H.K.; Pratt, D.; Abdulai, F.N.; Agbosu, E.E.; Frimpong, P.O.; Adiku, T.K. Arbovirus Circulation among Febrile Patients at the Greater Accra Regional Hospital, Ghana. *BMC Res. Notes* **2019**, *12*, doi:10.1186/s13104-019-4378-x.
109. Phoutrides, E.K.; Coulibaly, M.B.; George, C.M.; Sacko, A.; Traore, S.; Bessoff, K.; Wiley, M.R.; Kolivras, K.N.; Adelman, Z.; Traore, M.; et al. Dengue Virus Seroprevalence among Febrile Patients in Bamako, Mali: Results of a 2006 Surveillance Study. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1479–1485, doi:10.1089/vbz.2011.0622.
110. World Health Organization *Report of the Scientific Working Group Meeting on Dengue, Geneva, 1-5 October 2006*; 2006;
111. Perera, R.; Kuhn, R.J. Structural Proteomics of Dengue Virus. *Curr. Opin. Microbiol.* 2008, *11*, 369–377.
112. Libraty, D.H.; Young, P.R.; Pickering, D.; Endy, T.P.; Kalayanarooj, S.; Green, S.; Vaughn, D.W.; Nisalak, A.; Ennis, F.A.; Rothman, A.L. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *J. Infect. Dis.* **2002**, *186*, 1165–1168, doi:10.1086/343813.
113. Diamond, M.S.; Pierson, T.C. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* 2015, *162*, 488–492.
114. Hanley, K.A.; Monath, T.P.; Weaver, S.C.; Rossi, S.L.; Richman, R.L.; Vasilakis, N. Fever versus Fever: The Role of Host and Vector Susceptibility and Interspecific Competition in Shaping the Current and Future Distributions of the Sylvatic Cycles of Dengue Virus and Yellow Fever Virus. *Infect. Genet. Evol.* **2013**, *19*, 292–311, doi:10.1016/j.meegid.2013.03.008.
115. Wilder-Smith, A.; Chen, L.H.; Massad, E.; Wilson, M.E. Threat of Dengue to Blood Safety in Dengue-Endemic Countries. *Emerg. Infect. Dis.* 2009, *15*, 8–11.
116. Chen, L.H.; Wilson, M.E. Transmission of Dengue Virus without a Mosquito Vector: Nosocomial Mucocutaneous Transmission and Other Routes of Transmission. *Clin. Infect. Dis.* **2004**, *39*, e56–e60, doi:10.1086/423807.
117. Basurko, C.; Matheus, S.; Hildéral, H.; Everhard, S.; Restrepo, M.; Cuadro-Alvarez, E.; Lambert, V.; Boukhari, R.; Duvernois, J.P.; Favre, A.; et al. Estimating the Risk of Vertical Transmission of Dengue: A Prospective Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *98*, 1826–1832, doi:10.4269/ajtmh.16-0794.
118. Van de Perre, P.; Molès, J.P.; Nagot, N.; Tuailon, E.; Ceccaldi, P.E.; Goga, A.; Prendergast, A.J.; Rollins, N. Revisiting Koch’s Postulate to Determine the Plausibility

- of Viral Transmission by Human Milk. *Pediatr. Allergy Immunol.* **2021**, *00*, pai.13473, doi:10.1111/pai.13473.
119. Siler, J.F.; Hall, M.W.; Hitchens, A.P. Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity, and Prevention. *Philipp. J. Sci* **1926**, *29*.
 120. Balmaseda, A.; Hammond, S.N.; Pérez, L.; Tellez, Y.; Saborío, S.I.; Mercado, J.C.; Cuadra, R.; Rocha, J.; Pérez, M.A.; Silva, S.; et al. Serotype-Specific Differences in Clinical Manifestations of Dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 449–456, doi:10.4269/ajtmh.2006.74.449.
 121. Mangada, M.M.; Rothman, A.L. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4 + T Cells to Heterologous Serotypes . *J. Immunol.* **2005**, *175*, 2676–2683, doi:10.4049/jimmunol.175.4.2676.
 122. Mongkolsapaya, J.; Dejnirattisai, W.; Xu, X.N.; Vasanawathana, S.; Tangthawornchaikul, N.; Chairunsri, A.; Sawasdivorn, S.; Duangchinda, T.; Dong, T.; Rowland-Jones, S.; et al. Original Antigenic Sin and Apoptosis in the Pathogenesis of Dengue Hemorrhagic Fever. *Nat. Med.* **2003**, *9*, 921–927, doi:10.1038/nm887.
 123. Gubler, D.J. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*; 1998; Vol. 11;.
 124. Katzelnick, L.C.; Narvaez, C.; Arguello, S.; Mercado, B.L.; Collado, D.; Ampie, O.; Elizondo, D.; Miranda, T.; Carillo, F.B.; Mercado, J.C.; et al. Zika Virus Infection Enhances Future Risk of Severe Dengue Disease. *Science (80-.)*. **2020**, *369*, 1123–1128, doi:10.1126/science.abb6143.
 125. Sierra, B.D.L.C.; Kourí, G.; Guzmán, M.G. Race: A Risk Factor for Dengue Hemorrhagic Fever. *Arch. Virol.* **2007**, *152*, 533–542, doi:10.1007/s00705-006-0869-x.
 126. Puccioni-Sohler, M.; Orsini, M.; Soares, C.N. Dengue: A New Challenge. *Neurol. Int.* **2012**, *4*, 65–70.
 127. Chaturvedi, U.C.; Dhawan, R.; Khanna, M.; Mathur, A. Breakdown of the Blood-Brain Barrier during Dengue Virus Infection of Mice. *J. Gen. Virol.* **1991**, *72*, 859–866, doi:10.1099/0022-1317-72-4-859.
 128. Baud, D.; Gubler, D.J.; Schaub, B.; Lanteri, M.C.; Musso, D. An Update on Zika Virus Infection. *Lancet* **2017**, *390*, 2099–2109, doi:10.1016/S0140-6736(17)31450-2.
 129. Katzelnick, L.C.; Zambrana, J.V.; Elizondo, D.; Collado, D.; Garcia, N.; Arguello, S.; Mercado, J.C.; Miranda, T.; Ampie, O.; Mercado, B.L.; et al. Dengue and Zika Virus Infections in Children Elicit Cross-Reactive Protective and Enhancing Antibodies That Persist Long Term. *Sci. Transl. Med.* **2021**, *13*, doi:10.1126/scitranslmed.abg9478.
 130. Marbán-Castro, E.; Goncé, A.; Fumadó, V.; Romero-Acevedo, L.; Bardají, A. Zika Virus Infection in Pregnant Women and Their Children: A Review. *Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.* **2021**, *265*, 162–168, doi:10.1016/j.ejogrb.2021.07.012.
 131. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543, doi:10.1056/NEJM0A0805715.
 132. Grard, G.; Caron, M.; Mombo, I.M.; Nkoghe, D.; Mboui Ondo, S.; Jiolle, D.;

- Fontenille, D.; Paupy, C.; Leroy, E.M. Zika Virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A New Threat from *Aedes Albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e2681, doi:10.1371/journal.pntd.0002681.
133. Diouf, B.; Gaye, A.; Diagne, C.T.; Diallo, M.; Diallo, D. Zika Virus in Southeastern Senegal: Survival of the Vectors and the Virus during the Dry Season. *BMC Infect. Dis.* **2020**, *20*, 1–9, doi:10.1186/s12879-020-05093-5.
134. Schuler-Faccini, L.; Ribeiro, E.M.; Feitosa, I.M.L.; Horovitz, D.D.G.; Cavalcanti, D.P.; Pessoa, A.; Doriqui, M.J.R.; Neri, J.I.; Neto, J.M. de P.; Wanderley, H.Y.C.; et al. Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly — Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 59–62, doi:10.15585/mmwr.mm6503e2.
135. Pacheco, O.; Beltrán, M.; Nelson, C.A.; Valencia, D.; Tolosa, N.; Farr, S.L.; Padilla, A. V.; Tong, V.T.; Cuevas, E.L.; Espinosa-Bode, A.; et al. Zika Virus Disease in Colombia — Preliminary Report. *N. Engl. J. Med.* **2020**, *383*, e44, doi:10.1056/nejmoa1604037.
136. Musso, D.; Bossin, H.; Mallet, H.P.; Besnard, M.; Brout, J.; Baudouin, L.; Levi, J.E.; Sabino, E.C.; Ghawche, F.; Lanteri, M.C.; et al. Zika Virus in French Polynesia 2013–14: Anatomy of a Completed Outbreak. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, e172–e182.
137. Lourenço, J.; Monteiro, M.; Tomás, T.; Monteiro Rodrigues, J.; Pybus, O.; Rodrigues Faria, N. Epidemiology of the Zika Virus Outbreak in the Cabo Verde Islands, West Africa. *PLoS Curr.* **2018**, *10*, doi:10.1371/currents.outbreaks.19433b1e4d007451c691f138e1e67e8c.
138. Simon, O.; Acket, B.; Forfait, C.; Girault, D.; Gourinat, A.C.; Millon, P.; Daures, M.; Vanhomwegen, J.; Billot, S.; Biron, A.; et al. Zika Virus Outbreak in New Caledonia and Guillain-Barré Syndrome: A Case-Control Study. *J. Neurovirol.* **2018**, *24*, 362–368, doi:10.1007/s13365-018-0621-9.
139. Marshall, J.; Scott, B.; Delva, J.; Ade, C.; Hernandez, S.; Patel, J.; Moreno-Cheek, M.; Rojas, D.; Tanner, J.P.; Kirby, R.S. An Evaluation of Florida’s Zika Response Using the WHO Health Systems Framework: Can We Apply These Lessons to COVID-19? *Matern. Child Health J.* **2020**, *24*, 1212–1223, doi:10.1007/s10995-020-02969-5.
140. Giron, S.; Franke, F.; Decoppet, A.; Cadiou, B.; Travaglini, T.; Thirion, L.; Durand, G.; Jeannin, C.; L’Ambert, G.; Grard, G.; et al. Vector-Borne Transmission of Zika Virus in Europe, Southern France, August 2019. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1.
141. Sanou, A.S.; Dirlikov, E.; Sondo, K.A.; Kagoné, T.S.; Yameogo, I.; Sow, H.E.; Adjami, A.G.; Traore, S.M.; Dicko, A.; Tinto, B.; et al. Building Laboratory-Based Arbovirus Sentinel Surveillance Capacity during an Ongoing Dengue Outbreak, Burkina Faso, 2017. *Heal. Secur.* **2018**, *16*, S103–S110, doi:10.1089/hs.2018.0048.
142. Brès, P. Données Récentes Apportées Par Les Enquêtes Sérologiques Sur La Prévalence Des Arbovirus En Afrique, Avec Référence Spéciale à La Fièvre Jaune. *Bull. World Health Organ.* **1970**, *43*, 223–267.
143. Shi, Y.; Gao, G.F. Structural Biology of the Zika Virus. *Trends Biochem. Sci.* **2017**, *42*, 443–456.
144. Sirohi, D.; Kuhn, R.J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S935–S944.

145. Beaver, J.T.; Lelutiu, N.; Habib, R.; Skountzou, I. Evolution of Two Major Zika Virus Lineages: Implications for Pathology, Immune Response, and Vaccine Development. *Front. Immunol.* 2018, *9*, 1.
146. Brasil, P.; Calvet, G.A.; Siqueira, A.M.; Wakimoto, M.; de Sequeira, P.C.; Nobre, A.; Quintana, M. de S.B.; Mendonça, M.C.L. de; Lupi, O.; de Souza, R.V.; et al. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0004636.
147. Aubry, F.; Jacobs, S.; Darmuzey, M.; Lequime, S.; Delang, L.; Fontaine, A.; Jupatanakul, N.; Miot, E.F.; Dabo, S.; Manet, C.; et al. Recent African Strains of Zika Virus Display Higher Transmissibility and Fetal Pathogenicity than Asian Strains. *Nat. Commun.* 2021 *121* **2021**, *12*, 1–14, doi:10.1038/s41467-021-21199-z.
148. Shao, Q.; Herrlinger, S.; Zhu, Y.N.; Yang, M.; Goodfellow, F.; Stice, S.L.; Qi, X.P.; Brindley, M.A.; Chen, J.F. The African Zika Virus Mr-766 Is More Virulent and Causes More Severe Brain Damage than Current Asian Lineage and Dengue Virus. *Dev.* **2017**, *144*, 4114–4124, doi:10.1242/dev.156752.
149. Nutt, C.; Adams, P. Zika in Africa—the Invisible Epidemic? *Lancet* **2017**, *389*, 1595–1596, doi:10.1016/S0140-6736(17)31051-6.
150. Simonin, Y.; van Riel, D.; Van de Perre, P.; Rockx, B.; Salinas, S. Differential Virulence between Asian and African Lineages of Zika Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, doi:10.1371/journal.pntd.0005821.
151. Tinto, B.; Kania, D.; Samdapawindé Kagone, T.; Dicko, A.; Traore, I.; De Rekeneire, N.; Bicaba, B.W.; Hien, H.; Van de Perre, P.; Simonin, Y.; et al. Dengue Virus Circulation in West Africa: An Emerging Public Health Issue. *Medecine/Sciences* **2022**, *38*, 152–158, doi:10.1051/medsci/2022007.
152. Sharma, A.; Lal, S.K. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. *Front. Microbiol.* 2017, *8*, 110.
153. Salinas, S.; Foulongne, V.; Loustalot, F.; Fournier-Wirth, C.; Molès, J.P.; Briant, L.; Nagot, N.; Van De Perre, P.; Simonin, Y. Zika Virus, an Emerging Threat. *Medecine/Sciences* **2016**, *32*, 378–386, doi:10.1051/medsci/20163204016.
154. Barjas-Castro, M.L.; Angerami, R.N.; Cunha, M.S.; Suzuki, A.; Nogueira, J.S.; Rocco, I.M.; Maeda, A.Y.; Vasami, F.G.S.; Katz, G.; Boin, I.F.S.F.; et al. Probable Transfusion-Transmitted Zika Virus in Brazil. *Transfusion* **2016**, *56*, 1684–1688, doi:10.1111/trf.13681.
155. Motta, I.J.F.; Spencer, B.R.; Cordeiro da Silva, S.G.; Arruda, M.B.; Dobbin, J.A.; Gonzaga, Y.B.M.; Arcuri, I.P.; Tavares, R.C.B.S.; Atta, E.H.; Fernandes, R.F.M.; et al. Evidence for Transmission of Zika Virus by Platelet Transfusion. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 1101–1103, doi:10.1056/nejmc1607262.
156. Musso, D.; Nhan, T.; Robin, E.; Roche, C.; Bierlaire, D.; Zisou, K.; Shan Yan, A.; Cao-Lormeau, V.M.; Broult, J. Potential for Zika Virus Transmission through Blood Transfusion Demonstrated during an Outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761.

157. Kuehnert, M.J.; Basavaraju, S. V.; Moseley, R.R.; Pate, L.L.; Galel, S.A.; Williamson, P.C.; Busch, M.P.; Alsina, J.O.; Climent-Peris, C.; Marks, P.W.; et al. Screening of Blood Donations for Zika Virus Infection — Puerto Rico, April 3–June 11, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 627–628, doi:10.15585/mmwr.mm6524e2.
158. Galel, S.A.; Williamson, P.C.; Busch, M.P.; Stanek, D.; Bakkour, S.; Stone, M.; Lu, K.; Jones, S.; Rossmann, S.N.; Pate, L.L.; et al. First Zika-Positive Donations in the Continental United States. *Transfusion* **2017**, *57*, 762–769, doi:10.1111/trf.14029.
159. Simpson, D.I.H. Zika Virus Infection in Man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1964**, *58*, 335–338, doi:10.1016/0035-9203(64)90201-9.
160. Filipe, A.R.; Martins, C.M.V.; Rocha, H. Laboratory Infection with Zika Virus after Vaccination against Yellow Fever. *Arch. Gesamte Virusforsch.* **1973**, *43*, 315–319, doi:10.1007/BF01556147.
161. Scherer, W.F.; Eddy, G.A.; Monath, T.P. Laboratory Safety for Arboviruses and Certain Other Viruses of Vertebrates. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1980**, *29*, 1359–1381, doi:10.4269/ajtmh.1980.29.1359.
162. Hills, S.L.; Morrison, A.; Stuck, S.; Sandhu, K.; Mason, K.L.; Stanek, D.; Gabel, J.; Osborne, M.A.; Schroeder, B.A.; Rico, E.; et al. Case Series of Laboratory-Associated Zika Virus Disease, United States, 2016–2019. *Emerg. Infect. Dis.* **2021**, *27*, 1296–1300, doi:10.3201/eid2705.203602.
163. Foy, B.D.; Kobylinski, K.C.; Foy, J.L.C.; Blitvich, B.J.; da Rosa, A.T.; Haddock, A.D.; Lanciotti, R.S.; Tesh, R.B. Probable Non-Vector-Borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 880–882, doi:10.3201/eid1705.101939.
164. Musso, D.; Roche, C.; Robin, E.; Nhan, T.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.M. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 359–361, doi:10.3201/eid2102.141363.
165. Fréour, T.; Mirallié, S.; Hubert, B.; Splingart, C.; Barrière, P.; Maquart, M.; Leparco-Goffart, I. Sexual Transmission of Zika Virus in an Entirely Asymptomatic Couple Returning from a Zika Epidemic Area, France, April 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.23.30254.
166. Davidson, A.; Slavinski, S.; Komoto, K.; Rakeman, J.; Weiss, D. Suspected Female-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — New York City, 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 716–717, doi:10.15585/mmwr.mm6528e2.
167. Deckard, D.T.; Chung, W.M.; Brooks, J.T.; Smith, J.C.; Woldai, S.; Hennessey, M.; Kwit, N.; Mead, P. Male-to-Male Sexual Transmission of Zika Virus — Texas, January 2016. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 372–374, doi:10.15585/mmwr.mm6514a3.
168. Arsuaga, M.; Bujalance, S.G.; Díaz-Menéndez, M.; Vázquez, A.; Arribas, J.R. Probable Sexual Transmission of Zika Virus from a Vasectomised Man. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 1107.
169. D’Ortenzio, E.; Matheron, S.; de Lamballerie, X.; Hubert, B.; Piorkowski, G.; Maquart, M.; Descamps, D.; Damond, F.; Yazdanpanah, Y.; Leparco-Goffart, I. Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *374*, 2195–2198,

- doi:10.1056/nejmc1604449.
170. Mansuy, J.M.; Dutertre, M.; Mengelle, C.; Fourcade, C.; Marchou, B.; Delobel, P.; Izopet, J.; Martin-Blondel, G. Zika Virus: High Infectious Viral Load in Semen, a New Sexually Transmitted Pathogen? *Lancet Infect. Dis.* 2016, *16*, 405.
 171. Nicastri, E.; Castilletti, C.; Liuzzi, G.; Iannetta, M.; Capobianchi, M.R.; Ippolito, G. Persistent Detection of Zika Virus RNA in Semen for Six Months after Symptom Onset in a Traveller Returning from Haiti to Italy, February 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.32.30314.
 172. Polen, K.D.; Gilboa, S.M.; Hills, S.; Oduyebo, T.; Kohl, K.S.; Brooks, J.T.; Adamski, A.; Simeone, R.M.; Walker, A.T.; Kissin, D.M.; et al. Update: Interim Guidance for Preconception Counseling and Prevention of Sexual Transmission of Zika Virus for Men with Possible Zika Virus Exposure — United States, August 2018. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2018**, *67*, doi:10.15585/mmwr.mm6731e2.
 173. Guzeloglu-Kayisli, O.; Kayisli, U.A.; Schatz, F.; Lockwood, C.J. Vertical Zika Virus Transmission at the Maternal-Fetal Interface. *Front. Virol.* **2022**, *2*, 22, doi:10.3389/fviro.2022.801778.
 174. Besnard, M.; Lastère, S.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.M.; Musso, D. Evidence of Perinatal Transmission of Zika Virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, 20751, doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20751.
 175. Liang, B.; Guida, J.P.; Costa Do Nascimento, M.L.; Mysorekar, I.U. Host and Viral Mechanisms of Congenital Zika Syndrome. *Virulence* 2019, *10*, 768–775.
 176. Freitas, D.A.; Souza-Santos, R.; Carvalho, L.M.A.; Barros, W.B.; Neves, L.M.; Brasil, P.; Wakimoto, M.D. Congenital Zika Syndrome: A Systematic Review. *PLoS One* **2020**, *15*, doi:10.1371/JOURNAL.PONE.0242367.
 177. de Araújo, T.V.B.; Ximenes, R.A. de A.; Miranda-Filho, D. de B.; Souza, W.V.; Montarroyos, U.R.; de Melo, A.P.L.; Valongueiro, S.; de Albuquerque, M. de F.P.M.; Braga, C.; Filho, S.P.B.; et al. Association between Microcephaly, Zika Virus Infection, and Other Risk Factors in Brazil: Final Report of a Case-Control Study. *Lancet Infect. Dis.* **2018**, *18*, 328–336, doi:10.1016/S1473-3099(17)30727-2.
 178. Brasil, P.; Pereira, J.P.; Moreira, M.E.; Ribeiro Nogueira, R.M.; Damasceno, L.; Wakimoto, M.; Rabello, R.S.; Valderramos, S.G.; Halai, U.-A.; Salles, T.S.; et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N. Engl. J. Med.* **2016**, *375*, 2321–2334, doi:10.1056/nejmoa1602412.
 179. Ades, A.E.; Soriano-Arandes, A.; Alarcon, A.; Bonfante, F.; Thorne, C.; Peckham, C.S.; Giaquinto, C. Vertical Transmission of Zika Virus and Its Outcomes: A Bayesian Synthesis of Prospective Studies. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, 537–545, doi:10.1016/S1473-3099(20)30432-1.
 180. Dupont-Rouzeyrol, M.; Biron, A.; O'Connor, O.; Huguon, E.; Descloux, E. Infectious Zika Viral Particles in Breastmilk. *Lancet* **2016**, *387*, 1051, doi:10.1016/S0140-6736(16)00624-3/ATTACHMENT/1570D5AB-2450-4C58-B7E0-F9A2E42227F4/MMC1.PDF.
 181. Blohm, G.M.; Lednicky, J.A.; Márquez, M.; White, S.K.; Loeb, J.C.; Pacheco, C.A.; Nolan, D.J.; Paisie, T.; Salemi, M.; Rodríguez-Morales, A.J.; et al. Complete Genome

- Sequences of Identical Zika Virus Isolates in a Nursing Mother and Her Infant. *Genome Announc.* **2017**, *5*, doi:10.1128/genomeA.00231-17.
182. Sotelo, J.R.; Sotelo, A.B.; Sotelo, F.J.B.; Doi, A.M.; Pinho, J.R.R.; Oliveira, R. de C.; Bezerra, A.M.P.S.; Deutsch, A.D.; Villas-Boas, L.S.; Felix, A.C.; et al. Persistence of Zika Virus in Breast Milk after Infection in Late Stage of Pregnancy. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 856–857, doi:10.3201/eid2305.161538.
183. Cavalcanti, M.G.; Cabral-Castro, M.J.; Gonçalves, J.L.S.; Santana, L.S.; Pimenta, E.S.; Peralta, J.M. Zika Virus Shedding in Human Milk during Lactation: An Unlikely Source of Infection? *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *57*, 70–72, doi:10.1016/j.ijid.2017.01.042.
184. Colt, S.; Garcia-Casal, M.N.; Peña-Rosas, J.P.; Finkelstein, J.L.; Rayco-Solon, P.; Weise Prinzo, Z.C.; Mehta, S. Transmission of Zika Virus through Breast Milk and Other Breastfeeding-Related Bodily-Fluids: A Systematic Review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, doi:10.1371/journal.pntd.0005528.
185. Sun, J.; Wu, D.; Zhong, H.; Guan, D.; Zhang, H.; Tan, Q.; Ke, C. Presence of Zika Virus in Conjunctival Fluid. *JAMA Ophthalmol.* **2016**, *134*, 1330–1332.
186. Bonaldo, M.C.; Ribeiro, I.P.; Lima, N.S.; dos Santos, A.A.C.; Menezes, L.S.R.; da Cruz, S.O.D.; de Mello, I.S.; Furtado, N.D.; de Moura, E.E.; Damasceno, L.; et al. Isolation of Infective Zika Virus from Urine and Saliva of Patients in Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004816, doi:10.1371/journal.pntd.0004816.
187. Calvet, G.; Aguiar, R.S.; Melo, A.S.O.; Sampaio, S.A.; de Filippis, I.; Fabri, A.; Araujo, E.S.M.; de Sequeira, P.C.; de Mendonça, M.C.L.; de Oliveira, L.; et al. Detection and Sequencing of Zika Virus from Amniotic Fluid of Fetuses with Microcephaly in Brazil: A Case Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 653–660, doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5.
188. Troumani, Y.; Touhami, S.; Jackson, T.L.; Ventura, C. V.; Stanescu-Segall, D.M.; Errera, M.H.; Rousset, D.; Bodaghi, B.; Cartry, G.; David, T.; et al. Association of Anterior Uveitis with Acute Zika Virus Infection in Adults. *JAMA Ophthalmol.* **2021**, *139*, 95–102, doi:10.1001/jamaophthalmol.2020.5131.
189. Gubler, D.J.; Vasilakis, N.; Musso, D. History and Emergence of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* **2017**, *216*, S860–S867.
190. Cao-Lormeau, V.M.; Roche, C.; Teissier, A.; Robin, E.; Berry, A.L.; Mallet, H.P.; Sall, A.A.; Musso, D. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1085–1086, doi:10.3201/EID2006.140138.
191. Sharp, T.M.; Fischer, M.; Muñoz-Jordán, J.L.; Paz-Bailey, G.; Erin Staples, J.; Gregory, C.J.; Waterman, S.H. Dengue and Zika Virus Diagnostic Testing for Patients with a Clinically Compatible Illness and Risk for Infection with Both Viruses. *MMWR Recomm. Reports* **2019**, *68*, 1, doi:10.15585/MMWR.RR6801A1.
192. Calvet, G.; Aguiar, R.S.; Melo, A.S.O.; Sampaio, S.A.; de Filippis, I.; Fabri, A.; Araujo, E.S.M.; de Sequeira, P.C.; de Mendonça, M.C.L.; de Oliveira, L.; et al. Detection and Sequencing of Zika Virus from Amniotic Fluid of Fetuses with Microcephaly in Brazil: A Case Study. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 653–660, doi:10.1016/S1473-3099(16)00095-5.
193. Cauchemez, S.; Besnard, M.; Bompard, P.; Dub, T.; Guillemette-Artur, P.; Eyrolle-

- Guignot, D.; Salje, H.; Van Kerkhove, M.D.; Abadie, V.; Garel, C.; et al. Association between Zika Virus and Microcephaly in French Polynesia, 2013–15: A Retrospective Study. *Lancet (London, England)* **2016**, *387*, 2125–2132, doi:10.1016/S0140-6736(16)00651-6.
194. Honein, M.A.; Dawson, A.L.; Petersen, E.E.; Jones, A.M.; Lee, E.H.; Yazdy, M.M.; Ahmad, N.; Macdonald, J.; Evert, N.; Bingham, A.; et al. Birth Defects Among Fetuses and Infants of US Women With Evidence of Possible Zika Virus Infection During Pregnancy. *JAMA* **2017**, *317*, 59–68, doi:10.1001/JAMA.2016.19006.
195. Kleber de Oliveira, W.; Cortez-Escalante, J.; De Oliveira, W.T.G.H.; do Carmo, G.M.I.; Henriques, C.M.P.; Coelho, G.E.; Araújo de França, G.V. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy — Brazil, 2015. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, doi:10.15585/mmwr.mm6509e2er.
196. van der Linden, V.; Pessoa, A.; Dobyns, W.; Barkovich, A.J.; Júnior, H. van der L.; Filho, E.L.R.; Ribeiro, E.M.; Leal, M. de C.; Coimbra, P.P. de A.; Aragão, M. de F.V.V.; et al. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2016**, *65*, 1343–1348, doi:10.15585/mmwr.mm6547e2.
197. Duffy, M.R.; Chen, T.-H.; Hancock, W.T.; Powers, A.M.; Kool, J.L.; Lanciotti, R.S.; Pretrick, M.; Marfel, M.; Holzbauer, S.; Dubray, C.; et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N. Engl. J. Med.* **2009**, *360*, 2536–2543, doi:10.1056/nejmoa0805715.
198. Focosi, D.; Maggi, F.; Pistello, M. Zika Virus: Implications for Public Health. *Clin. Infect. Dis.* **2016**, *63*, 227–233.
199. Wong, S.S.Y.; Poon, R.W.S.; Wong, S.C.Y. Zika Virus Infection—the next Wave after Dengue? *J. Formos. Med. Assoc.* **2016**, *115*, 226–242.
200. Marano, G.; Pupella, S.; Vaglio, S.; Liunbruno, G.M.; Grazzini, G. Zika Virus and the Never-Ending Story of Emerging Pathogens and Transfusion Medicine. *Blood Transfus.* **2016**, *14*, 95–100, doi:10.2450/2015.0066-15.
201. Charrel, R.N.; Leparç-Goffart, I.; Pas, S.; de Lamballerie, X.; Koopmans, M.; Reusken, C. Background Review for Diagnostic Test Development for Zika Virus Infection. *Bull. World Health Organ.* **2016**, *94*, 574–584D, doi:10.2471/BLT.16.171207.
202. Vorou, R. Zika Virus, Vectors, Reservoirs, Amplifying Hosts, and Their Potential to Spread Worldwide: What We Know and What We Should Investigate Urgently. *Int. J. Infect. Dis.* **2016**, *48*, 85–90.
203. Musso, D.; Roche, C.; Nhan, T.X.; Robin, E.; Teissier, A.; Cao-Lormeau, V.M. Detection of Zika Virus in Saliva. *J. Clin. Virol.* **2015**, *68*, 53–55, doi:10.1016/j.jcv.2015.04.021.
204. Gourinat, A.C.; O’Connor, O.; Calvez, E.; Goarant, C.; Dupont-Rouzeyrol, M. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21*, 84–86, doi:10.3201/eid2101.140894.
205. Huzly, D.; Hanselmann, I.; Schmidt-Chanasit, J.; Panning, M. High Specificity of a Novel Zika Virus ELISA in European Patients after Exposure to Different Flaviviruses.

- Eurosurveillance* **2016**, *21*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.16.30203.
206. Nikolay, B.; Diallo, M.; Boye, C.S.B.; Sall, A.A. Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 2011, *11*, 1417–1423.
207. Santos, P.D.; Michel, F.; Wylezich, C.; Höper, D.; Keller, M.; Holicki, C.M.; Szentiks, C.A.; Eiden, M.; Muluneh, A.; Neubauer-Juric, A.; et al. Co-Infections: Simultaneous Detections of West Nile Virus and Usutu Virus in Birds from Germany. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, *69*, 776–792, doi:10.1111/tbed.14050.
208. Ochieng, C.; Lutomiah, J.; Makio, A.; Koka, H.; Chepkorir, E.; Yalwala, S.; Mutisya, J.; Musila, L.; Khamadi, S.; Richardson, J.; et al. Mosquito-Borne Arbovirus Surveillance at Selected Sites in Diverse Ecological Zones of Kenya; 2007 - 2012. *Viol. J.* **2013**, *10*, 1–10, doi:10.1186/1743-422X-10-140.
209. Figuerola, J.; Baouab, R.E.; Soriguer, R.; Fassi-Fihri, O.; Llorente, F.; Jiménez-Clavero, M.A. West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Morocco, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1651–1653, doi:10.3201/eid1510.090340.
210. Chevalier, V.; Marsot, M.; Molia, S.; Rasamoelina, H.; Rakotondraivo, R.; Pedrono, M.; Lowenski, S.; Durand, B.; Lecollinet, S.; Beck, C. Serological Evidence of West Nile and Usutu Viruses Circulation in Domestic and Wild Birds in Wetlands of Mali and Madagascar in 2008. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 1998, doi:10.3390/ijerph17061998.
211. Ben Hassine, T.; De Massis, F.; Calistri, P.; Savini, G.; BelHaj Mohamed, B.; Ranen, A.; Di Gennaro, A.; Sghaier, S.; Hammami, S. First Detection of Co-Circulation of West Nile and Usutu Viruses in Equids in the South-West of Tunisia. *Transbound. Emerg. Dis.* **2014**, *61*, 385–389, doi:10.1111/tbed.12259.
212. Diagne, M.M.; Ndione, M.H.D.; Di Paola, N.; Fall, G.; Bedekelabou, A.P.; Sembène, P.M.; Faye, O.; De Andrade Zanotto, P.M.; Sall, A.A. Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. *Viruses* **2019**, *11*, 181, doi:10.3390/v11020181.
213. Weissenböck, H.; Bakonyi, T.; Rossi, G.; Mani, P.; Nowotny, N. Usutu Virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 274–277, doi:10.3201/eid1902.121191.
214. Weissenböck, H.; Kolodziejek, J.; Url, A.; Lussy, H.; Rebel-Bauder, B.; Nowotny, N. Emergence of Usutu Virus, an African Mosquito-Borne Flavivirus of the Japanese Encephalitis Virus Group, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 652–656, doi:10.3201/eid0807.020094.
215. Cavrini, F.; Gaibani, P.; Longo, G.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Bonilauri, P.; Gerundi, G.E.; Di Benedetto, F.; Pasetto, A.; Girardis, M.; et al. Usutu Virus Infection in a Patient Who Underwent Orthotropic Liver Transplantation, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* **2009**, *14*, doi:10.2807/ese.14.50.19448-en.
216. Pecorari, M.; Longo, G.; Gennari, W.; Grottola, A.; Sabbatini, A.; Tagliazucchi, S.; Savini, G.; Monaco, F.; Simone, M.; Lelli, R.; et al. First Human Case of Usutu Virus Neuroinvasive Infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveill.* **2009**, *14*, 19446, doi:10.2807/ese.14.50.19446-en.
217. Bakonyi, T.; Jungbauer, C.; Aberle, S.W.; Kolodziejek, J.; Dimmel, K.; Stiasny, K.; Allerberger, F.; Nowotny, N. Usutu Virus Infections among Blood Donors, Austria, July and August 2017 – Raising Awareness for Diagnostic Challenges.

- Eurosurveillance* **2017**, 22, doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644.
218. Engel, D.; Jöst, H.; Wink, M.; Börstler, J.; Bosch, S.; Garigliany, M.M.; Jöst, A.; Czajka, C.; Lühken, R.; Ziegler, U.; et al. Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa. *MBio* **2016**, 7, doi:10.1128/mBio.01938-15.
 219. Camp, J. V.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N. Targeted Surveillance Reveals Native and Invasive Mosquito Species Infected with Usutu Virus. *Parasites and Vectors* **2019**, 12, 1–5, doi:10.1186/s13071-019-3316-z.
 220. Graninger, M.; Hubmer, S.; Riederer, F.; Kettner, S.; Hauk, M.; Auf, T.; Aberle, J.H.; Stiasny, K.; Aberle, S.W.; Camp, J. V. The First Case of Usutu Virus Neuroinvasive Disease in Austria, 2021. *Open Forum Infect. Dis.* **2022**, 9, doi:10.1093/ofid/ofac255.
 221. Weidinger, P.; Kolodziejek, J.; Bakonyi, T.; Brunthaler, R.; Erdélyi, K.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Different Dynamics of Usutu Virus Infections in Austria and Hungary, 2017–2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, 67, 298–307, doi:10.1111/tbed.13351.
 222. Bakran-Lebl, K.; Camp, J. V.; Kolodziejek, J.; Weidinger, P.; Hufnagl, P.; Cabal Rosel, A.; Zwickelstorfer, A.; Allerberger, F.; Nowotny, N. Diversity of West Nile and Usutu Virus Strains in Mosquitoes at an International Airport in Austria. *Transbound. Emerg. Dis.* **2022**, 69, 2096–2109, doi:10.1111/tbed.14198.
 223. Cadar, D.; Lühken, R.; van der Jeugd, H.; Garigliany, M.; Ziegler, U.; Keller, M.; Lahoreau, J.; Lachmann, L.; Becker, N.; Kik, M.; et al. Widespread Activity of Multiple Lineages of Usutu Virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance* **2017**, 22, doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452.
 224. Benzarti, E.; Sarlet, M.; Franssen, M.; Cadar, D.; Schmidt-Chanasit, J.; Rivas, J.F.; Linden, A.; Desmecht, D.; Garigliany, M. Usutu Virus Epizootic in Belgium in 2017 and 2018: Evidence of Virus Endemization and Ongoing Introduction Events. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2020**, 20, 43–50, doi:10.1089/vbz.2019.2469.
 225. Garigliany, M.M.; Marlier, D.; Tenner-Racz, K.; Eiden, M.; Cassart, D.; Gandar, F.; Beer, M.; Schmidt-Chanasit, J.; Desmecht, D. Detection of Usutu Virus in a Bullfinch (*Pyrrhula Pyrrhula*) and a Great Spotted Woodpecker (*Dendrocopos Major*) in North-West Europe. *Vet. J.* **2014**, 199, 191–193, doi:10.1016/j.tvjl.2013.10.017.
 226. Barbic, L.; Vilibic-Cavlek, T.; Listes, E.; Stevanovic, V.; Gjenero-Margan, I.; Ljubin-Sternak, S.; Pem-Novosel, I.; Listes, I.; Mlinaric-Galinovic, G.; Di Gennaro, A.; et al. Demonstration of Usutu Virus Antibodies in Horses, Croatia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2013**, 13, 772–774, doi:10.1089/vbz.2012.1236.
 227. Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Sabadi, D.; Peric, L.; Barbic, L.; Klobucar, A.; Miklausic, B.; Tabain, I.; Santini, M.; Vucelja, M.; et al. Prevalence and Molecular Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Croatia in the ‘One Health’ Context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, 66, 1946–1957, doi:10.1111/tbed.13225.
 228. Vilibic-Cavlek, T.; Kaic, B.; Barbic, L.; Pem-Novosel, I.; Slavic-Vrzic, V.; Lesnikar, V.; Kurecic-Filipovic, S.; Babic-Erceg, A.; Listes, E.; Stevanovic, V.; et al. First Evidence of Simultaneous Occurrence of West Nile Virus and Usutu Virus Neuroinvasive Disease in Humans in Croatia during the 2013 Outbreak. *Infection* **2014**,

- 42, 689–695, doi:10.1007/s15010-014-0625-1.
229. Klobucar, A.; Benic, N.; Krajcar, D.; Kosanovic-Licina, M.L.; Tesic, V.; Merdic, E.; Vrucina, I.; Savic, V.; Barbic, L.; Stevanovic, V.; et al. An Overview of Mosquitoes and Emerging Arboviral Infections in the Zagreb Area, Croatia. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2016**, *10*, 1286–1293, doi:10.3855/jidc.7988.
230. Klobucar, A.; Savic, V.; Posavec, M.C.; Petrinic, S.; Kuhar, U.; Toplak, I.; Madic, J.; Vilibic-Cavlek, T. Screening of Mosquitoes for West Nile Virus and Usutu Virus in Croatia, 2015–2020. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2021**, *6*, 45, doi:10.3390/tropicalmed6020045.
231. Rudolf, I.; Bakonyi, T.; Šebesta, O.; Mendel, J.; Peško, J.; Betášová, L.; Blažejová, H.; Venclíková, K.; Straková, P.; Nowotny, N.; et al. Co-Circulation of Usutu Virus and West Nile Virus in a Reed Bed Ecosystem. *Parasites and Vectors* **2015**, *8*, doi:10.1186/s13071-015-1139-0.
232. Hubálek, Z.; Halouzka, J.; Juřicová, Z.; Šikutová, S.; Rudolf, I.; Honza, M.; Janková, J.; Chytil, J.; Marec, F.; Sitko, J. Serologic Survey of Birds for West Nile Flavivirus in Southern Moravia (Czech Republic). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2008**, *8*, 659–666, doi:10.1089/vbz.2007.0283.
233. Eiden, M.; Gil, P.; Ziegler, U.; Rakotoarivony, I.; Marie, A.; Frances, B.; L’Ambert, G.; Simonin, Y.; Foulongne, V.; Groschup, M.H.; et al. Emergence of Two Usutu Virus Lineages in *Culex pipiens* Mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *61*, 151–154, doi:10.1016/j.meegid.2018.03.020.
234. Lecollinet, S.; Blanchard, Y.; Manson, C.; Lowenski, S.; Laloy, E.; Quenault, H.; Touzain, F.; Lucas, P.; Eraud, C.; Bahuon, C.; et al. Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 2225–2227.
235. Allering, L.; Jöst, H.; Emmerich, P.; Günther, S.; Lattwein, E.; Schmidt, M.; Seifried, E.; Sambri, V.; Hourfar, K.; Schmidt-Chanasit, J. Detection of Usutu Virus Infection in a Healthy Blood Donor from South-West Germany, 2012. *Eurosurveillance* **2012**, *17*, doi:10.2807/ese.17.50.20341-en.
236. Cadar, D.; Becker, N.; de Mendonca Campos, R.; Börstler, J.; Jöst, H.; Schmidt-Chanasit, J. Usutu Virus in Bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1771–1773.
237. Jöst, H.; Bialonski, A.; Maus, D.; Sambri, V.; Eiden, M.; Groschup, M.H.; Günther, S.; Becker, N.; Schmidt-Chanasit, J. Isolation of Usutu Virus in Germany. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2011**, *85*, 551–553, doi:10.4269/ajtmh.2011.11-0248.
238. Becker, N.; Jöst, H.; Ziegler, U.; Eiden, M.; Höper, D.; Emmerich, P.; Fichet-Calvet, E.; Ehichioya, D.U.; Czajka, C.; Gabriel, M.; et al. Epizootic Emergence of Usutu Virus in Wild and Captive Birds in Germany. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0032604.
239. Ziegler, U.; Fast, C.; Eiden, M.; Bock, S.; Schulze, C.; Hoepfer, D.; Ochs, A.; Schlieben, P.; Keller, M.; Zielke, D.E.; et al. Evidence for an Independent Third Usutu Virus Introduction into Germany. *Vet. Microbiol.* **2016**, *192*, 60–66, doi:10.1016/j.vetmic.2016.06.007.
240. Bakonyi, T.; Erdélyi, K.; Brunthaler, R.; Dán, Á.; Weissenböck, H.; Nowotny, N.

- Usutu Virus, Austria and Hungary, 2010-2016. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*, e85, doi:10.1038/emi.2017.72.
241. Nagy, A.; Mezei, E.; Nagy, O.; Bakonyi, T.; Csonka, N.; Kaposi, M.; Koroknai, A.; Szomor, K.; Rigó, Z.; Molnár, Z.; et al. Extraordinary Increase in West Nile Virus Cases and First Confirmed Human Usutu Virus Infection in Hungary, 2018. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1, doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038.
242. Savini, G.; Monaco, F.; Terregino, C.; Di Gennaro, A.; Bano, L.; Pinoni, C.; De Nardi, R.; Bonilauri, P.; Pecorari, M.; Di Gialleonardo, L.; et al. Usutu Virus in ITALY: An Emergence or a Silent Infection? *Vet. Microbiol.* **2011**, *151*, 264–274, doi:10.1016/j.vetmic.2011.03.036.
243. Tamba, M.; Bonilauri, P.; Bellini, R.; Calzolari, M.; Albieri, A.; Sambri, V.; Dottori, M.; Angelini, P. Detection of Usutu Virus within a West Nile Virus Surveillance Program in Northern Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 551–557, doi:10.1089/vbz.2010.0055.
244. Calzolari, M.; Chiapponi, C.; Bonilauri, P.; Lelli, D.; Baioni, L.; Barbieri, I.; Lavazza, A.; Pongolini, S.; Dottori, M.; Moreno, A. Co-Circulation of Two Usutu Virus Strains in Northern Italy between 2009 and 2014. *Infect. Genet. Evol.* **2017**, *51*, 255–262, doi:10.1016/J.MEEGID.2017.03.022.
245. Rijks, J.M.; Kik, M.; Slaterus, R.; Foppen, R.; Stroo, A.; Ijzer, J.; Stahl, J.; Gröne, A.; Koopmans, M.; van der Jeugd, H.; et al. Widespread Usutu Virus Outbreak in Birds in The Netherlands, 2016. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, 30391, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.45.30391.
246. Ashraf, U.; Ye, J.; Ruan, X.; Wan, S.; Zhu, B.; Cao, S. Usutu Virus: An Emerging Flavivirus in Europe. *Viruses* **2015**, *7*, 219–238, doi:10.3390/v7010219.
247. Escribano-Romero, E.; Lupulović, D.; Merino-Ramos, T.; Blázquez, A.B.; Lazić, G.; Lazić, S.; Saiz, J.C.; Petrović, T. West Nile Virus Serosurveillance in Pigs, Wild Boars, and Roe Deer in Serbia. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176*, 365–369, doi:10.1016/j.vetmic.2015.02.005.
248. Lupulovic, D.; Martín-Acebes, M.A.; Lazic, S.; Alonso-Padilla, J.; Blázquez, A.B.; Escribano-Romero, E.; Petrovic, T.; Saiz, J.C. First Serological Evidence of West Nile Virus Activity in Horses in Serbia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1303–1305, doi:10.1089/vbz.2010.0249.
249. Vanhomwegen, J.; Beck, C.; Desprès, P.; Figuerola, A.; García, R.; Lecollinet, S.; López-Roig, M.; Manuguerra, J.C.; Serra-Cobo, J. Circulation of Zoonotic Arboviruses in Equine Populations of Mallorca Island (Spain). *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 340–346, doi:10.1089/vbz.2016.2042.
250. Llorente, F.; Pérez-Ramírez, E.; Fernández-Pinero, J.; Soriguer, R.; Figuerola, J.; Jiménez-Clavero, M.Á. Flaviviruses in Game Birds, Southern Spain, 2011-2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1023–1025.
251. Jurado-Tarifa, E.; Napp, S.; Lecollinet, S.; Arenas, A.; Beck, C.; Cerdà-Cuéllar, M.; Fernández-Morente, M.; García-Bocanegra, I. Monitoring of West Nile Virus, Usutu Virus and Meaban Virus in Waterfowl Used as Decoys and Wild Raptors in Southern Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *49*, 58–64, doi:10.1016/j.cimid.2016.10.001.

252. Busquets, N.; Alba, A.; Allepuz, A.; Aranda, C.; Núñez, J.I. Usutu Virus Sequences in *Culex Pipiens* (Diptera: Culicidae), Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2008, *14*, 861–863.
253. Höfle, U.; Gamino, V.; Fernández de Mera, I.G.; Mangold, A.J.; Ortíz, J.A.; de la Fuente, J. Usutu Virus in Migratory Song Thrushes, Spain. *Emerg. Infect. Dis.* 2013, *19*, 1173–1175.
254. Steinmetz, H.W.; Bakonyi, T.; Weissenböck, H.; Hatt, J.M.; Eulenberger, U.; Robert, N.; Hoop, R.; Nowotny, N. Emergence and Establishment of Usutu Virus Infection in Wild and Captive Avian Species in and around Zurich, Switzerland-Genomic and Pathologic Comparison to Other Central European Outbreaks. *Vet. Microbiol.* **2011**, *148*, 207–212, doi:10.1016/j.vetmic.2010.09.018.
255. Chaintoutis, S.C.; Dovas, C.I.; Papanastassopoulou, M.; Gewehr, S.; Danis, K.; Beck, C.; Lecollinet, S.; Antalis, V.; Kalaitzopoulou, S.; Panagiotopoulos, T.; et al. Evaluation of a West Nile Virus Surveillance and Early Warning System in Greece, Based on Domestic Pigeons. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *37*, 131–141, doi:10.1016/j.cimid.2014.01.004.
256. Hubálek, Z.; Wegner, E.; Halouzka, J.; Tryjanowski, P.; Jerzak, L.; Šikutová, S.; Rudolf, I.; Kruszewicz, A.G.; Jaworski, Z.; Włodarczyk, R. Serologic Survey of Potential Vertebrate Hosts for West Nile Virus in Poland. *Viral Immunol.* **2008**, *21*, 247–253, doi:10.1089/VIM.2007.0111.
257. Bażanów, B.; Jansen van Vuren, P.; Szymański, P.; Stygar, D.; Fraćka, A.; Twardoń, J.; Kozdrowski, R.; Pawęska, J.T. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **2018**, *10*, doi:10.3390/v10020087.
258. Csank, T.; Drzewnioková, P.; Korytár, L.; Major, P.; Gyuranecz, M.; Pistl, J.; Bakonyi, T. A Serosurvey of Flavivirus Infection in Horses and Birds in Slovakia. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 206–213, doi:10.1089/vbz.2017.2216.
259. Čabanová, V.; Šikutová, S.; Straková, P.; Šebesta, O.; Vichová, B.; Zubříková, D.; Miterpáková, M.; Mendel, J.; Hurníková, Z.; Hubálek, Z.; et al. Co-Circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in Mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses* **2019**, *11*, doi:10.3390/v11070639.
260. Buckley, A.; Dawson, A.; Moss, S.R.; Hinsley, S.A.; Bellamy, P.E.; Gould, E.A. Serological Evidence of West Nile Virus, Usutu Virus and Sindbis Virus Infection of Birds in the UK. *J. Gen. Virol.* **2003**, *84*, 2807–2817, doi:10.1099/vir.0.19341-0.
261. Gaibani, P.; Rossini, G. An Overview of Usutu Virus. *Microbes Infect.* **2017**, *19*, 382–387, doi:10.1016/j.micinf.2017.05.003.
262. Vilibic-Cavlek, T.; Petrovic, T.; Savic, V.; Barbic, L.; Tabain, I.; Stevanovic, V.; Klobucar, A.; Mrzljak, A.; Ilic, M.; Bogdanic, M.; et al. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens* 2020, *9*, 1–19.
263. Bakonyi, T.; Gould, E.A.; Kolodziejek, J.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Complete Genome Analysis and Molecular Characterization of Usutu Virus That Emerged in Austria in 2001: Comparison with the South African Strain SAAR-1776 and Other Flaviviruses. *Virology* **2004**, *328*, 301–310, doi:10.1016/j.virol.2004.08.005.
264. Engel, D.; Jöst, H.; Wink, M.; Börstler, J.; Bosch, S.; Garigliany, M.M.; Jöst, A.; Czajka, C.; Lühken, R.; Ziegler, U.; et al. Reconstruction of the Evolutionary History

- and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa. *MBio* **2016**, *7*, doi:10.1128/mBio.01938-15.
265. C.h, C.; E.a, G.; Calisher, C.H.; Gould, E.A. Taxonomy of the Virus Family Flaviviridae. *Adv. Virus Res.* **2003**, *59*, 3527, doi:10.1016/S0065-3527(03)59001-7.
266. Nikolay, B.; Dupressoir, A.; Firth, C.; Faye, O.; Boye, C.S.; Diallo, M.; Sall, A.A. Comparative Full Length Genome Sequence Analysis of Usutu Virus Isolates from Africa. *Viol. J.* **2013**, *10*, doi:10.1186/1743-422X-10-217.
267. Smit, J.M.; Moesker, B.; Rodenhuis-Zybert, I.; Wilschut, J. Flavivirus Cell Entry and Membrane Fusion. *Viruses* **2011**, *3*, 160–171, doi:10.3390/v3020160.
268. Li, L.; Lok, S.M.; Yu, I.M.; Zhang, Y.; Kuhn, R.J.; Chen, J.; Rossmann, M.G. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science (80-.)*. **2008**, *319*, 1830–1834, doi:10.1126/science.1153263.
269. Murray, C.L.; Jones, C.T.; Rice, C.M. Architects of Assembly: Roles of Flaviviridae Non-Structural Proteins in Virion Morphogenesis. *Nat. Rev. Microbiol.* **2008**, *6*, 699–708, doi:10.1038/nrmicro1928.
270. Watterson, D.; Modhiran, N.; Young, P.R. The Many Faces of the Flavivirus NS1 Protein Offer a Multitude of Options for Inhibitor Design. *Antiviral Res.* **2016**, *130*, 7–18.
271. Gaibani, P.; Rossini, G. An Overview of Usutu Virus. *Microbes Infect.* **2017**, *19*, 382–387, doi:10.1016/j.micinf.2017.05.003.
272. Clé, M.; Beck, C.; Salinas, S.; Lecollinet, S.; Gutierrez, S.; Van de Perre, P.; Baldet, T.; Foulongne, V.; Simonin, Y. Usutu Virus: A New Threat? *Epidemiol. Infect.* **2019**, *147*, 1–11.
273. Foulongne, V.; Clé, M.; Gutierrez, S.; Vande Perre, P.; Salinas, S.; Simonin, Y. Le Virus Usutu: Soyons Vigilants. *Virologie* **2018**, *22*, 233–236, doi:10.1684/VIR.2018.0749.
274. Nikolay, B.; Diallo, M.; Faye, O.; Boye, C.S.; Sall, A.A. Vector Competence of *Culex Neavei* (Diptera: Culicidae) for Usutu Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2012**, *86*, 993–996, doi:10.4269/ajtmh.2012.11-0509.
275. Eiden, M.; Gil, P.; Ziegler, U.; Rakotoarivony, I.; Marie, A.; Frances, B.; L’Ambert, G.; Simonin, Y.; Foulongne, V.; Groschup, M.H.; et al. Emergence of Two Usutu Virus Lineages in *Culex Pipiens* Mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect. Genet. Evol.* **2018**, *61*, 151–154, doi:10.1016/j.meegid.2018.03.020.
276. Ochieng, C.; Lutomia, J.; Makio, A.; Koka, H.; Chepkorir, E.; Yalwala, S.; Mutisya, J.; Musila, L.; Khamadi, S.; Richardson, J.; et al. Mosquito-Borne Arbovirus Surveillance at Selected Sites in Diverse Ecological Zones of Kenya; 2007 - 2012. *Viol. J.* **2013**, *10*, 1–10, doi:10.1186/1743-422X-10-140.
277. Fros, J.J.; Miesen, P.; Vogels, C.B.; Gaibani, P.; Sambri, V.; Martina, B.E.; Koenraadt, C.J.; van Rij, R.P.; Vlak, J.M.; Takken, W.; et al. Comparative Usutu and West Nile Virus Transmission Potential by Local *Culex Pipiens* Mosquitoes in North-Western Europe. *One Heal.* **2015**, *1*, 31–36, doi:10.1016/j.onehlt.2015.08.002.
278. Figuerola, J.; Baouab, R.E.; Soriguer, R.; Fassi-Fihri, O.; Llorente, F.; Jiménez-

- Clavero, M.A. West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Morocco, 2008. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1651–1653, doi:10.3201/eid1510.090340.
279. Meister, T.; Lussy, H.; Bakonyi, T.; Šikutová, S.; Rudolf, I.; Vogl, W.; Winkler, H.; Frey, H.; Hubálek, Z.; Nowotny, N.; et al. Serological Evidence of Continuing High Usutu Virus (Flaviviridae) Activity and Establishment of Herd Immunity in Wild Birds in Austria. *Vet. Microbiol.* **2008**, *127*, 237–248, doi:10.1016/j.vetmic.2007.08.023.
280. García-Bocanegra, I.; Paniagua, J.; Gutiérrez-Guzmán, A. V.; Lecollinet, S.; Boadella, M.; Arenas-Montes, A.; Cano-Terriza, D.; Lowenski, S.; Gortázar, C.; Höfle, U. Spatio-Temporal Trends and Risk Factors Affecting West Nile Virus and Related Flavivirus Exposure in Spanish Wild Ruminants. *BMC Vet. Res.* **2016**, *12*, 1–9, doi:10.1186/s12917-016-0876-4.
281. Escribano-Romero, E.; Lupulović, D.; Merino-Ramos, T.; Blázquez, A.B.; Lazić, G.; Lazić, S.; Saiz, J.C.; Petrović, T. West Nile Virus Serosurveillance in Pigs, Wild Boars, and Roe Deer in Serbia. *Vet. Microbiol.* **2015**, *176*, 365–369, doi:10.1016/j.vetmic.2015.02.005.
282. Cavrini, F.; Gaibani, P.; Longo, G.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Bonilauri, P.; Gerundi, G.E.; Di Benedetto, F.; Pasetto, A.; Girardis, M.; et al. Usutu Virus Infection in a Patient Who Underwent Orthotropic Liver Transplantation, Italy, August–September 2009. *Euro Surveill.* **2009**, *14*, 19448, doi:10.2807/ese.14.50.19448-en.
283. Cavrini, F.; Pepa, M.E. Della; Gaibani, P.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Landini, M.P.; Sambri, V. A Rapid and Specific Real-Time RT-PCR Assay to Identify Usutu Virus in Human Plasma, Serum, and Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50*, 221–223, doi:10.1016/j.jcv.2010.11.008.
284. Grottola, A.; Marcacci, M.; Tagliazucchi, S.; Gennari, W.; Di Gennaro, A.; Orsini, M.; Monaco, F.; Marchegiano, P.; Marini, V.; Meacci, M.; et al. Usutu Virus Infections in Humans: A Retrospective Analysis in the Municipality of Modena, Italy. *Clin. Microbiol. Infect.* **2017**, *23*, 33–37, doi:10.1016/j.cmi.2016.09.019.
285. Santini, M.; Vilibic-Cavlek, T.; Barsic, B.; Barbic, L.; Savic, V.; Stevanovic, V.; Listes, E.; Di Gennaro, A.; Savini, G. First Cases of Human Usutu Virus Neuroinvasive Infection in Croatia, August–September 2013: Clinical and Laboratory Features. *J. Neurovirol.* **2015**, *21*, 92–97, doi:10.1007/s13365-014-0300-4.
286. Vilibic-Cavlek, T.; Savic, V.; Sabadi, D.; Peric, L.; Barbic, L.; Klobucar, A.; Miklausic, B.; Tabain, I.; Santini, M.; Vucelja, M.; et al. Prevalence and Molecular Epidemiology of West Nile and Usutu Virus Infections in Croatia in the ‘One Health’ Context, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 1946–1957, doi:10.1111/tbed.13225.
287. Chvala, S.; Kolodziejek, J.; Nowotny, N.; Weissenböck, H. Pathology and Viral Distribution in Fatal Usutu Virus Infections of Birds from the 2001 and 2002 Outbreaks in Austria. *J. Comp. Pathol.* **2004**, *131*, 176–185, doi:10.1016/j.jcpa.2004.03.004.
288. Cadar, D.; Becker, N.; de Mendonca Campos, R.; Börstler, J.; Jöst, H.; Schmidt-Chanasit, J. Usutu Virus in Bats, Germany, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1771–1773.
289. Cadar, D.; Maier, P.; Müller, S.; Kress, J.; Chudy, M.; Bialonski, A.; Schlaphof, A.;

- Jansen, S.; Jöst, H.; Tannich, E.; et al. Blood Donor Screening for West Nile Virus (WNV) Revealed Acute Usutu Virus (USUV) Infection, Germany, September 2016. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.14.30501.
290. Bakonyi, T.; Jungbauer, C.; Aberle, S.W.; Kolodziejek, J.; Dimmel, K.; Stiasny, K.; Allerberger, F.; Nowotny, N. Usutu Virus Infections among Blood Donors, Austria, July and August 2017 – Raising Awareness for Diagnostic Challenges. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00644.
291. Saiz, J.C.; Blázquez, A.B. Usutu Virus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Virus Adapt. Treat.* **2017**, *9*, 27–40, doi:10.2147/VAAT.S123619.
292. Cavrini, F.; Pepa, M.E. Della; Gaibani, P.; Pierro, A.M.; Rossini, G.; Landini, M.P.; Sambri, V. A Rapid and Specific Real-Time RT-PCR Assay to Identify Usutu Virus in Human Plasma, Serum, and Cerebrospinal Fluid. *J. Clin. Virol.* **2011**, *50*, 221–223, doi:10.1016/j.jcv.2010.11.008.
293. Nikolay, B.; Weidmann, M.; Dupressoir, A.; Faye, O.; Boye, C.S.; Diallo, M.; Sall, A.A. Development of a Usutu Virus Specific Real-Time Reverse Transcription PCR Assay Based on Sequenced Strains from Africa and Europe. *J. Virol. Methods* **2014**, *197*, 51–54, doi:10.1016/j.jviromet.2013.08.039.
294. Del Amo, J.; Sotelo, E.; Fernández-Pinero, J.; Gallardo, C.; Llorente, F.; Agüero, M.; Jiménez-Clavero, M.A. A Novel Quantitative Multiplex Real-Time RT-PCR for the Simultaneous Detection and Differentiation of West Nile Virus Lineages 1 and 2, and of Usutu Virus. *J. Virol. Methods* **2013**, *189*, 321–327, doi:10.1016/j.jviromet.2013.02.019.
295. Smithburn, K.C.; Hughes, T.P.; Burke, A.W.; Paul, J.H. A Neurotropic Virus Isolated from the Blood of a Native of Uganda. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1940**, *s1-20*, 471–492, doi:10.4269/ajtmh.1940.s1-20.471.
296. Rossi, S.L.; Ross, T.M.; Evans, J.D. West Nile Virus. *Clin. Lab. Med.* **2010**, *30*, 47–65.
297. Joubert, L.; Oudar, J.; Hannoun, C.; Beytout, D.; Corniou, B.; Guillon, J.C.; Panthier, R. [Epidemiology of the West Nile Virus: Study of a Focus in Camargue. IV. Meningo-Encephalomyelitis of the Horse]. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*. **1970**, *118*, 239–247.
298. Platonov, A.E.; Shipulin, G.A.; Shipulina, O.Y.; Tyutyunnik, E.N.; Frolochkina, T.I.; Lanciotti, R.S.; Yazyshina, S.; Platonova, O. V.; Obukhov, I.L.; Zhukov, A.N.; et al. Outbreak of West Nile Virus Infection, Volgograd Region, Russia, 1999. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 128–132, doi:10.3201/eid0701.010118.
299. Tsai, T.F.; Popovici, F.; Cernescu, C.; Campbell, G.L.; Nedelcu, N.I. West Nile Encephalitis Epidemic in Southeastern Romania. *Lancet* **1998**, *352*, 767–771, doi:10.1016/S0140-6736(98)03538-7.
300. Kalaycioglu, H.; Korukluoglu, G.; Ozkul, A.; Oncul, O.; Tosun, S.; Karabay, O.; Gozalan, A.; Uyar, Y.; Caglayik, D.Y.; Atasoylu, G.; et al. Emergence of West Nile Virus Infections in Humans in Turkey, 2010 to 2011. *Eurosurveillance* **2012**, *17*, doi:10.2807/ese.17.21.20182-en.
301. Radda, A. Studies on the Activity and Ecology of Arboviruses in Turkey (Author's Transl). *Zentralbl Bakteriol [Orig A]* **1973**, *225*, 19–26.
302. Ergunay, K.; Ozer, N.; Us, D.; Ozkul, A.; Simsek, F.; Kaynas, S.; Ustacelebi, S.

- Seroprevalence of West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus in Southeastern Turkey: First Evidence for Tick-Borne Encephalitis Virus Infections. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2007**, *7*, 157–161, doi:10.1089/vbz.2006.0574.
303. Martin, M.F.; Simonin, Y. West Nile Virus Historical Progression in Europe. *Virologie* **2019**, *23*, 265–270, doi:10.1684/vir.2019.0787.
304. Bakonyi, T.; Ivanics, É.; Erdélyi, K.; Ursu, K.; Ferenczi, E.; Weissenböck, H.; Nowotny, N. Lineage 1 and 2 Strains of Encephalitic West Nile Virus, Central Europe. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 618–623, doi:10.3201/eid1204.051379.
305. Popović, N.; Milošević, B.; Urošević, A.; Poluga, J.; Lavadinović, L.; Nedeljković, J.; Jevtović, D.; Dulović, O. Outbreak of West Nile Virus Infection among Humans in Serbia, August to October 2012. *Eurosurveillance* **2013**, *18*, doi:10.2807/1560-7917.ES2013.18.43.20613.
306. Sribu, A.; Ceianu, C.S.; Panculescu-Gatej, R.I.; Vázquez, A.; Tenorio, A.; Rebreanu, R.; Niedrig, M.; Nicolescu, G.; Pistol, A. Outbreak of West Nile Virus Infection in Humans, Romania, July to October 2010. *Eurosurveillance* **2011**, *16*, doi:10.2807/ese.16.02.19762-en.
307. Platonov, A.E.; Karan', L.S.; Shopenskaia, T.A.; Fedorova, M. V.; Koliashnikova, N.M.; Rusakova, N.M.; Shishkina, L. V.; Arshba, T.E.; Zhuravlev, V.I.; Govorukhina, M. V.; et al. [Genotyping of West Nile Fever Virus Strains Circulating in Southern Russia as an Epidemiological Investigation Method: Principles and Results]. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.* **2011**, 29–37.
308. Savini, G.; Capelli, G.; Monaco, F.; Polci, A.; Russo, F.; Di Gennaro, A.; Marini, V.; Teodori, L.; Montarsi, F.; Pinoni, C.; et al. Evidence of West Nile Virus Lineage 2 Circulation in Northern Italy. *Vet. Microbiol.* **2012**, *158*, 267–273, doi:10.1016/j.vetmic.2012.02.018.
309. Barzon, L.; Pacenti, M.; Franchin, E.; Pagni, S.; Lavezzo, E.; Squarzon, L.; Martello, T.; Russo, F.; Nicoletti, L.; Rezza, G.; et al. Large Human Outbreak of West Nile Virus Infection in North-Eastern Italy in 2012. *Viruses* **2013**, *5*, 2825–2839, doi:10.3390/v5112825.
310. Nash, D.; Mostashari, F.; Fine, A.; Miller, J.; O'Leary, D.; Murray, K.; Huang, A.; Rosenberg, A.; Greenberg, A.; Sherman, M.; et al. The Outbreak of West Nile Virus Infection in the New York City Area in 1999. *N. Engl. J. Med.* **2001**, *344*, 1807–1814, doi:10.1056/nejm200106143442401.
311. Bernkopf, H.; Levine, S.; Nerson, R. Isolation of West Nile Virus in Israel. *J. Infect. Dis.* **1953**, *93*, 207–218, doi:10.1093/infdis/93.3.207.
312. Goldblum, N.; Sterk, V.; Paderski, B. West Nile Fever: The Clinical Features of the Disease and the Isolation of West Nile Virus from the Blood of Nine Human Cases. *Am. J. Epidemiol.* **1954**, *59*, 89–103, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a119626.
313. Marberg, K.; Goldblum, N.; Sterk, V. V.; Jasinska-klingberg, W.; Klingberg, M.A. The Natural History of West Nile Fever I. Clinical Observations during an Epidemic in Israel. *Am. J. Epidemiol.* **1956**, *64*, 259–269, doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a119838.
314. Weinberger, M.; Pitlik, S.D.; Gandacu, D.; Lang, R.; Nassar, F.; Ben David, D.; Rubinstein, E.; Izthaki, A.; Mishal, J.; Kitzes, R.; et al. West Nile Fever Outbreak,

- Israel, 2000: Epidemiologic Aspects. *Emerg. Infect. Dis.* **2001**, *7*, 686–691, doi:10.3201/eid0704.010416.
315. Lourenço, J.; Thompson, R.N.; Thézé, J.; Obolski, U. Characterising West Nile Virus Epidemiology in Israel Using a Transmission Suitability Index. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.25.46.1900629.
316. Kopel, E.; Amitai, Z.; Bin, H.; Shulman, L.M.; Mendelson, E.; Shefer, R. Surveillance of West Nile Virus Disease, Tel Aviv District, Israel, 2005 to 2010. *Eurosurveillance* **2011**, *16*, doi:10.2807/ese.16.25.19894-en.
317. Lustig, Y.; Kaufman, Z.; Mendelson, E.; Orshan, L.; Anis, E.; Glazer, Y.; Cohen, D.; Shohat, T.; Bassal, R. Spatial Distribution of West Nile Virus in Humans and Mosquitoes in Israel, 2000–2014. *Int. J. Infect. Dis.* **2017**, *64*, 20–26, doi:10.1016/j.ijid.2017.08.011.
318. Anis, E.; Grotto, I.; Mendelson, E.; Bin, H.; Orshan, L.; Gandacu, D.; Warshavsky, B.; Shinar, E.; Slater, P.E.; Lev, B. West Nile Fever in Israel: The Reemergence of an Endemic Disease. *J. Infect.* **2014**, *68*, 170–175, doi:10.1016/j.jinf.2013.10.009.
319. Abutarbush, S.M.; Al-Majali, A.M. West Nile Virus Infection in Horses in Jordan: Clinical Cases, Seroprevalence and Risk Factors. *Transbound. Emerg. Dis.* **2014**, *61*, 1–6, doi:10.1111/tbed.12191.
320. Gallian, P.; De Micco, P.; Ghorra, P. Seroprevalence of West Nile Virus in Blood Donors at Hôtel Dieu de France, Beirut, Lebanon. *Transfusion* **2010**, *50*, 1156–1158.
321. Batieha, A.; Saliba, E.K.; Graham, R.; Mohareb, E.; Hijazi, Y.; Wijeyaratne, P. Seroprevalence of West Nile, Rift Valley, and Sandfly Arboviruses in Hashimiah, Jordan. *Emerg. Infect. Dis.* **2000**, *6*, 358–362, doi:10.3201/eid0604.000405.
322. Ahmadnejad, F.; Otarod, V.; Fallah, M.H.; Lowenski, S.; Sedighi-Moghaddam, R.; Zavareh, A.; Durand, B.; Lecollinet, S.; Sabatier, P. Spread of West Nile Virus in Iran: A Cross-Sectional Serosurvey in Equines, 2008–2009. *Epidemiol. Infect.* **2011**, *139*, 1587–1593, doi:10.1017/S0950268811000173.
323. Chinikar, S.; Javadi, A.; Ataei, B.; Shakeri, H.; Moradi, M.; Mostafavi, E.; Ghiasi, S.M. Detection of West Nile Virus Genome and Specific Antibodies in Iranian Encephalitis Patients. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 1525–1529, doi:10.1017/S0950268811002056.
324. Chancey, C.; Grinev, A.; Volkova, E.; Rios, M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*.
325. Macnamara, F.N.; Horn, D.W.; Porterfield, J.S. Yellow Fever and Other Arthropod-Borne Viruses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1959**, *53*, 202–212, doi:10.1016/0035-9203(59)90072-0.
326. Kokernot, R.H.; Smithburn, K.C.; Kluge, E. Neutralizing Antibodies against Arthropod-Borne Viruses in the Sera of Domestic Quadrupeds Ranging in Tongaland, Union of South Africa. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1961**, *55*, 73–85, doi:10.1080/00034983.1961.11686021.
327. TAYLOR, R.M.; HURLBUT, H.S.; DRESSLER, H.R.; SPANGLER, E.W.; THRASHER, D. Isolation of West Nile Virus from Culex Mosquitoes. *J. Egypt. Med. Assoc.* **1953**, *36*, 199–208.

328. SMITHBURN, K.C.; TAYLOR, R.M.; RIZK, F.; KADER, A. Immunity to Certain Arthropod-Borne Viruses among Indigenous Residents of Egypt. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1954**, 3, 9–18, doi:10.4269/ajtmh.1954.3.9.
329. Melnick, J.L.; Paul, J.R.; Riordan, J.T.; Barnett, V.H.; Goldblum, N.; Zabin, E. Isolation from Human Sera in Egypt of a Virus Apparently Identical to West Nile Virus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1951**, 77, 661–665, doi:10.3181/00379727-77-18884.
330. Fares, W.; Gdoura, M.; Dhrif, H.; Touzi, H.; Hogga, N.; Hannachi, N.; Mhalla, S.; Kacem, S.; Karray, H.; Bougatef, S.; et al. Genetic Characterization of West Nile Virus Strains during Neuroinvasive Infection Outbreak in Tunisia, 2018. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, 68, 2414–2421, doi:10.1111/tbed.13905.
331. Monastiri, A.; Mechri, B.; Vázquez-González, A.; Ar Gouilh, M.; Chakroun, M.; Loussaief, C.; Mastouri, M.; Dimassi, N.; Boughzala, L.; Aouni, M.; 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.
332. Bahri, O.; Dhifallah, I.; Alaya-Bouafif, N. Ben; Fekih, H.; Gargouri, J.; Triki, H. Étude Séroépidémiologique de La Circulation Du Virus West Nile Chez l'Homme En Tunisie. *Bull. la Soc. Pathol. Exot.* **2011**, 104, 272–276, doi:10.1007/s13149-010-0100-x.
333. Feki, I.; Marrakchi, C.; Hmida, M. Ben; Belahsen, F.; Jemaa, M. Ben; Maaloul, I.; Kanoun, F.; Hamed, S. Ben; Mhiri, C. Epidemic West Nile Virus Encephalitis in Tunisia. *Neuroepidemiology* **2005**, 24, 1–7, doi:10.1159/000081042.
334. El Rhaffouli, H.; El Harrak, M.; Lotfi, C.; El Boukhrissi, F.; Bajjou, T.; Laraoui, A.; Hilali, F.; Kenfaoui, M.; Lahlou-Amine, I. Serologic Evidence of West Nile Virus Infection among Humans, Morocco. *Emerg. Infect. Dis.* 2012, 18, 880–881.
335. Fassil, H.; El Harrak, M.; Marié, J.L. Aspects Épidémiologiques de l'infection à Virus West-Nile Au Maroc. *Med. Sante Trop.* **2012**, 22, 123–125, doi:10.1684/mst.2012.0045.
336. El Harrack, M.; Le Guenno, B.; Gounon, P. Isolement Du Virus West Nile Au Maroc. *Virologie* **1997**, 1, 248–249.
337. Faulde, M.K.; Spiesberger, M.; Abbas, B. Sentinel Site-Enhanced near-Real Time Surveillance Documenting West Nile Virus Circulation in Two Culex Mosquito Species Indicating Different Transmission Characteristics, Djibouti City, Djibouti. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* **2012**, 42, 461–474, doi:10.12816/0006332.
338. Jentes, E.S.; Robinson, J.; Johnson, B.W.; Conde, I.; Sakouvougui, Y.; Iverson, J.; Beecher, S.; Bah, M.A.; Diakite, F.; Coulibaly, M.; et al. Acute Arboviral Infections in Guinea, West Africa, 2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, 83, 388–394, doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0688.
339. Wang, W.; Sarkodie, F.; Danso, K.; Addo-Yobo, E.; Owusu-Ofori, S.; Allain, J.P.; Li, C. Seroprevalence of West Nile Virus in Ghana. *Viral Immunol.* **2009**, 22, 17–22, doi:10.1089/vim.2008.0066.
340. Mandji Lawson, J.M.; MOUNGUENGUI, D.; Ondounda, M.; Nguema Edzang, B.; Vandji, J.; Tchoua, R. Un Cas de Méningoencéphalite à Virus West Nile à Libreville, Gabon.

- Med. Trop.* **2009**, *69*, 501–502.
341. Baba, M.; Logue, C.H.; Oderinde, B.; Abdulmaleek, H.; Williams, J.; Lewis, J.; Laws, T.R.; Hewson, R.; Marcello, A.; D’Agaro, P. Evidence of Arbovirus Co-Infection in Suspected Febrile Malaria and Typhoid Patients in Nigeria. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2013**, *7*, 51–59, doi:10.3855/jidc.2411.
 342. Chevalier, V.; Lancelot, R.; Diaité, A.; Mondet, B.; Sall, B.; De Lamballerie, X. Serological Assessment of West Nile Fever Virus Activity in the Pastoral System of Ferlo, Senegal. In Proceedings of the Annals of the New York Academy of Sciences; Ann N Y Acad Sci, 2006; Vol. 1081, pp. 216–225.
 343. Boisen, M.L.; Schieffelin, J.S.; Goba, A.; Oottamasathien, D.; Jones, A.B.; Shaffer, J.G.; Hastie, K.M.; Hartnett, J.N.; Momoh, M.; Fullah, M.; et al. Multiple Circulating Infections Can Mimic the Early Stages of Viral Hemorrhagic Fevers and Possible Human Exposure to Filoviruses in Sierra Leone Prior to the 2014 Outbreak. *Viral Immunol.* **2015**, *28*, 19–31, doi:10.1089/vim.2014.0108.
 344. Fall, G.; Diallo, M.; Loucoubar, C.; Faye, O.; Sall, A.A. 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**, *90*, 747–754, doi:10.4269/ajtmh.13-0405.
 345. Burt, F.J.; Grobbelaar, A.A.; Leman, P.A.; Anthony, F.S.; Gibson, G.V.F.; Swanepoel, R. Phylogenetic Relationships of Southern African West Nile Virus Isolates. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 820–826, doi:10.3201/eid0808.020027.
 346. Charrel, R.N.; Brault, A.C.; Gallian, P.; Lemasson, J.J.; Murgue, B.; Murri, S.; Pastorino, B.; Zeller, H.; De Chesse, R.; De Micco, P.; et al. Evolutionary Relationship between Old World West Nile Virus Strains: Evidence for Viral Gene Flow between Africa, the Middle East, and Europe. *Virology* **2003**, *315*, 381–388, doi:10.1016/S0042-6822(03)00536-1.
 347. Fall, G.; Di Paola, N.; Faye, M.; Dia, M.; Freire, C.C. de M.; Loucoubar, C.; Zanotto, P.M. de A.; Faye, O.; Sall, A.A. Biological and Phylogenetic Characteristics of West African Lineages of West Nile Virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006078, doi:10.1371/journal.pntd.0006078.
 348. May, F.J.; Davis, C.T.; Tesh, R.B.; Barrett, A.D.T. Phylogeography of West Nile Virus: From the Cradle of Evolution in Africa to Eurasia, Australia, and the Americas. *J. Virol.* **2011**, *85*, 2964–2974, doi:10.1128/jvi.01963-10.
 349. Schlesinger, J.J. Flavivirus Nonstructural Protein NS1: Complementary Surprises. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2006, *103*, 18879–18880.
 350. Kimura, T.; Ohyama, A. Association between the PH-Dependent Conformational Change of West Nile Flavivirus E Protein and Virus-Mediated Membrane Fusion. *J. Gen. Virol.* **1988**, *69* (Pt 6), 1247–1254, doi:10.1099/0022-1317-69-6-1247.
 351. Suthar, M.S.; Diamond, M.S.; Gale, M. West Nile Virus Infection and Immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* 2013, *11*, 115–128.
 352. Brinton, M.A. Replication Cycle and Molecular Biology of the West Nile Virus. *Viruses* **2013**, *6*, 13–53, doi:10.3390/v6010013.
 353. Baronti, C.; Sire, J.; de Lamballerie, X.; Quérat, G. Nonstructural NS1 Proteins of

- Several Mosquito-Borne Flavivirus Do Not Inhibit TLR3 Signaling. *Virology* **2010**, *404*, 319–330, doi:10.1016/j.virol.2010.05.020.
354. Falconar, A.K.I. Monoclonal Antibodies That Bind to Common Epitopes on the Dengue Virus Type 2 Nonstructural-1 and Envelope Glycoproteins Display Weak Neutralizing Activity and Differentiated Responses to Virulent Strains: Implications for Pathogenesis and Vaccines. *Clin. Vaccine Immunol.* **2008**, *15*, 549–561, doi:10.1128/CVI.00351-07.
355. Zhou, Y.; Ray, D.; Zhao, Y.; Dong, H.; Ren, S.; Li, Z.; Guo, Y.; Bernard, K.A.; Shi, P.-Y.; Li, H. Structure and Function of Flavivirus NS5 Methyltransferase. *J. Virol.* **2007**, *81*, 3891–3903, doi:10.1128/jvi.02704-06.
356. Leung, J.Y.; Pijlman, G.P.; Kondratieva, N.; Hyde, J.; Mackenzie, J.M.; Khromykh, A.A. Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *J. Virol.* **2008**, *82*, 4731–4741, doi:10.1128/jvi.00002-08.
357. MacKenzie, J.M.; Khromykh, A.A.; Jones, M.K.; Westaway, E.G. Subcellular Localization and Some Biochemical Properties of the Flavivirus Kunjin Nonstructural Proteins NS2A and NS4A. *Virology* **1998**, *245*, 203–215, doi:10.1006/viro.1998.9156.
358. Evans, J.D.; Seeger, C. Differential Effects of Mutations in NS4B on West Nile Virus Replication and Inhibition of Interferon Signaling. *J. Virol.* **2007**, *81*, 11809–11816, doi:10.1128/jvi.00791-07.
359. Lanciotti, R.S.; Roehrig, J.T.; Deubel, V.; Smith, J.; Parker, M.; Steele, K.; Crise, B.; Volpe, K.E.; Crabtree, M.B.; Scherret, J.H.; et al. Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science* (80-.). **1999**, *286*, 2333–2337, doi:10.1126/science.286.5448.2333.
360. Murray, K.O.; Mertens, E.; Desprès, P. West Nile Virus and Its Emergence in the United States of America. *Vet. Res.* 2010, *41*.
361. Bagnarelli, P.; Marinelli, K.; Trotta, D.; Monachetti, A.; Tavio, M.; Gobbo, R. Del; Capobianchi, M.R.; Menzo, S.; Nicoletti, L.; Magurano, F.; et al. Human Case of Autochthonous West Nile Virus Lineage 2 Infection in Italy, September 2011. *Eurosurveillance* **2011**, *16*, doi:10.2807/ese.16.43.20002-en.
362. Papa, A.; Bakonyi, T.; Xanthopoulou, K.; Vázquez, A.; Tenorio, A.; Nowotny, N. Genetic Characterization of West Nile Virus Lineage 2, Greece, 2010. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 920–922, doi:10.3201/eid1705.101759.
363. Botha, E.M.; Markotter, W.; Wolfaardt, M.; Paweska, J.T.; Swanepoel, R.; Palacios, G.; Nel, L.H.; Venter, M. Genetic Determinants of Virulence in Pathogenic Lineage 2 West Nile Virus Strains. *Emerg. Infect. Dis.* **2008**, *14*, 222–230, doi:10.3201/eid1402.070457.
364. Martín-Acebes, M.A. West Nile Virus: A Re-Emerging Pathogen Revisited. *World J. Virol.* **2012**, *1*, 51, doi:10.5501/wjv.v1.i2.51.
365. Ayers, V.B.; Huang, Y.J.S.; Lyons, A.C.; Park, S.L.; Higgs, S.; Dunlop, J.I.; Kohl, A.; Alto, B.W.; Unlu, I.; Blitvich, B.J.; et al. *Culex Tarsalis* Is a Competent Vector Species for Cache Valley Virus. *Parasites and Vectors* **2018**, *11*, 1–6, doi:10.1186/s13071-018-3103-2.
366. Farajollahi, A.; Fonseca, D.M.; Kramer, L.D.; Marm Kilpatrick, A. “Bird Biting”

- Mosquitoes and Human Disease: A Review of the Role of Culex Pipiens Complex Mosquitoes in Epidemiology. *Infect. Genet. Evol.* 2011, *11*, 1577–1585.
367. Venkatesan, M.; Westbrook, C.J.; Hauer, M.C.; Rasgon, J.L. Evidence for a Population Expansion in the West Nile Virus Vector Culex Tarsalis. *Mol. Biol. Evol.* **2007**, *24*, 1208–1218, doi:10.1093/molbev/msm040.
368. Braack, L.; Gouveia De Almeida, A.P.; Cornel, A.J.; Swanepoel, R.; De Jager, C. Mosquito-Borne Arboviruses of African Origin: Review of Key Viruses and Vectors. *Parasites and Vectors* 2018, *11*, 1–26.
369. Bowen, R.A.; Nemeth, N.M. Experimental Infections with West Nile Virus. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 2007, *20*, 293–297.
370. Chianese, A.; Stelitano, D.; Astorri, R.; Serretiello, E.; Teresa, M.; Rocca, D.; Melardo, C.; Vitiello, M.; Galdiero, M.; Franci, G. West Nile Virus: An Overview of Current Information. *Transl. Med. Reports* **2019**, *3*, doi:10.4081/tmr.8145.
371. Brault, A.C. Changing Patterns of West Nile Virus Transmission: Altered Vector Competence and Host Susceptibility. *Vet. Res.* 2009, *40*.
372. Reed, K.D.; Meece, J.K.; Henkel, J.S.; Shukla, S.K. Birds, Migration and Emerging Zoonoses: West Nile Virus, Lyme Disease, Influenza A and Enteropathogens. *Clin. Med. Res.* 2003, *1*, 5–12.
373. Nicholas Komar West Nile Virus: Epidemiology and Ecology in North America. In *Advances in Virus Research*; Adv Virus Res, 2003; Vol. 61, pp. 185–234 ISBN 0120398613.
374. Komar, N.; Langevin, S.; Hinten, S.; Nemeth, N.; Edwards, E.; Hettler, D.; Davis, B.; Bowen, R.; Bunning, M. Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 311–322, doi:10.3201/eid0903.020628.
375. Blázquez, A.B.; Sáiz, J.C. West Nile Virus (WNV) Transmission Routes in the Murine Model: Intrauterine, by Breastfeeding and after Cannibal Ingestion. *Virus Res.* **2010**, *151*, 240–243, doi:10.1016/j.virusres.2010.04.009.
376. Alpert, S.G.; Ferguson, J.; Noël, L.P. Intrauterine West Nile Virus: Ocular and Systemic Findings. *Am. J. Ophthalmol.* **2003**, *136*, 733–735, doi:10.1016/S0002-9394(03)00452-5.
377. Hinckley, A.F.; O’Leary, D.R.; Hayes, E.B. Transmission of West Nile Virus through Human Breast Milk Seems to Be Rare. *Pediatrics* **2007**, *119*, doi:10.1542/peds.2006-2107.
378. Pealer, L.N.; Marfin, A.A.; Petersen, L.R.; Lanciotti, R.S.; Page, P.L.; Stramer, S.L.; Stobierski, M.G.; Signs, K.; Newman, B.; Kapoor, H.; et al. Transmission of West Nile Virus through Blood Transfusion in the United States in 2002. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349*, 1236–1245, doi:10.1056/nejmoa030969.
379. Iwamoto, M.; Jernigan, D.B.; Guasch, A.; Trepka, M.J.; Blackmore, C.G.; Hellinger, W.C.; Pham, S.M.; Zaki, S.; Lanciotti, R.S.; Lance-Parker, S.E.; et al. Transmission of West Nile Virus from an Organ Donor to Four Transplant Recipients. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 2196–2203, doi:10.1056/nejmoa022987.

380. Kelley, R.E.; Berger, J.R.; Kelley, B.P. WEST NILE VIRUS MENINGO-ENCEPHALITIS: POSSIBLE SEXUAL TRANSMISSION. *J. La. State Med. Soc.* **2016**, *168*, 21–22.
381. De Filette, M.; Ulbert, S.; Diamond, M.S.; Sanders, N.N. Recent Progress in West Nile Virus Diagnosis and Vaccination. *Vet. Res.* **2012**, *43*, 1–15.
382. Sejvar, J.J.; Haddad, M.B.; Tierney, B.C.; Campbell, G.L.; Marfin, A.A.; Van Gerpen, J.A.; Fleischauer, A.; Leis, A.A.; Stokic, D.S.; Petersen, L.R. Neurologic Manifestations and Outcome of West Nile Virus Infection. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *290*, 511–515, doi:10.1001/jama.290.4.511.
383. Hayes, E.B.; Sejvar, J.J.; Zaki, S.R.; Lanciotti, R.S.; Bode, A. V.; Campbell, G.L. Virology, Pathology, and Clinical Manifestations of West Nile Virus Disease. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1174–1179.
384. Bai, F.; Ashley Thompson, E.; Vig, P.J.S.; Arturo Leis, A. Current Understanding of West Nile Virus Clinical Manifestations, Immune Responses, Neuroinvasion, and Immunotherapeutic Implications. *Pathogens* **2019**, *8*, 193.
385. Pradhan, S.; Anand, S.; Choudhury, S.S. Cognitive Behavioural Impairment with Irreversible Sensorineural Deafness as a Complication of West Nile Encephalitis. *J. Neurovirol.* **2019**, *25*, 429–433, doi:10.1007/s13365-019-00733-2.
386. Burdmann, E.A. Flaviviruses and Kidney Diseases. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **2019**, *26*, 198–206.
387. Lindsey, N.P.; Sejvar, J.J.; Bode, A. V.; Pape, W.J.; Campbell, G.L. Delayed Mortality in a Cohort of Persons Hospitalized with West Nile Virus Disease in Colorado in 2003. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 230–235, doi:10.1089/vbz.2011.0721.
388. Pepperell, C.; Rau, N.; Krajden, S.; Kern, R.; Humar, A.; Mederski, B.; Simor, A.; Low, D.E.; McGeer, A.; Mazzulli, T.; et al. West Nile Virus Infection in 2002: Morbidity and Mortality among Patients Admitted to Hospital in Southcentral Ontario. *CMAJ* **2003**, *168*, 1399–1405.
389. Paré, J.; Moore, A. West Nile Virus in Horses-What Do You Need to Know to Diagnose the Disease? *Can. Vet. J.* **2018**, *59*, 1119–1120.
390. Tonry, J.H.; Xiao, S.Y.; Siirin, M.; Chen, H.; Travassos Da Rosa, A.P.A.; Tesh, R.B. Persistent Shedding of West Nile Virus in Urine of Experimentally Infected Hamsters. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *72*, 320–324, doi:10.4269/ajtmh.2005.72.320.
391. Nagy, A.; Bán, E.; Nagy, O.; Ferenczi, E.; Farkas, Á.; Bányai, K.; Farkas, S.; Takács, M. Detection and Sequencing of West Nile Virus RNA from Human Urine and Serum Samples during the 2014 Seasonal Period. *Arch. Virol.* **2016**, *161*, 1797–1806, doi:10.1007/s00705-016-2844-5.
392. Kemmerly, S.A. Diagnosis and Treatment of West Nile Infections. *Ochsner J.* **2003**, *5*, 16–17.
393. Sambri, V.; Capobianchi, M.; Charrel, R.; Fyodorova, M.; Gaibani, P.; Gould, E.; Niedrig, M.; Papa, A.; Pierro, A.; Rossini, G.; et al. West Nile Virus in Europe: Emergence, Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, 699–704.

394. Roehrig, J.T.; Nash, D.; Maldin, B.; Labowitz, A.; Martin, D.A.; Lanciotti, R.S.; Campbell, G.L. Persistence of Virus-Reactive Serum Immunoglobulin M Antibody in Confirmed West Nile Virus Encephalitis Cases. *Emerg. Infect. Dis.* **2003**, *9*, 376–379, doi:10.3201/eid0903.020531.
395. Tardei, G.; Ruta, S.; Chitu, V.; Rossi, C.; Tsai, T.F.; Cernescu, C. Evaluation of Immunoglobulin M (IgM) and IgG Enzyme Immunoassays in Serologic Diagnosis of West Nile Virus Infection. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 2232–2239, doi:10.1128/jcm.38.6.2232-2239.2000.
396. Dauphin, G.; Zientara, S. West Nile Virus: Recent Trends in Diagnosis and Vaccine Development. *Vaccine* **2007**, *25*, 5563–5576.
397. Petersen, L.R.; Marfin, A.A. West Nile Virus: A Primer for the Clinician. *Ann. Intern. Med.* **2002**, *137*, 173–179.
398. Kim, A.S.; Kafai, N.M.; Winkler, E.S.; Gilliland, T.C.; Cottle, E.L.; Earnest, J.T.; Jethva, P.N.; Kaplonek, P.; Shah, A.P.; Fong, R.H.; et al. Pan-Protective Anti-Alphavirus Human Antibodies Target a Conserved E1 Protein Epitope. *Cell* **2021**, *184*, 4414–4429.e19, doi:10.1016/j.cell.2021.07.006.
399. Button, J.M.; Qazi, S.A.; Wang, J.C.Y.; Mukhopadhyay, S. Revisiting an Old Friend: New Findings in Alphavirus Structure and Assembly. *Curr. Opin. Virol.* **2020**, *45*, 25–33, doi:10.1016/j.coviro.2020.06.005.
400. Al-Khalifa, M.S.; Diab, F.M.; Khalil, G.M. Man-Threatening Viruses Isolated from Ticks in Saudi Arabia. *Saudi Med. J.* **2007**, *28*, 1864–1867.
401. Guzmán, C.; Calderón, A.; Mattar, S.; Tadeu-Figuereido, L.; Salazar-Bravo, J.; Alvis-Guzmán, N.; Martínez, E.Z.; González, M. Ecoepidemiology of Alphaviruses and Flaviviruses. In *Emerging and Reemerging Viral Pathogens: Volume 1: Fundamental and Basic Virology Aspects of Human, Animal and Plant Pathogens*; Academic Press, 2019; pp. 101–125 ISBN 9780128194003.
402. Toivanen, A. Alphaviruses: An Emerging Cause of Arthritis? *Curr. Opin. Rheumatol.* **2008**, *20*, 486–490.
403. Lumsden, W.H.R. An Epidemic of Virus Disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–1953 II. General Description and Epidemiology. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1955**, *49*, 33–57, doi:10.1016/0035-9203(55)90081-X.
404. Peper, S.M.; Monson, B.J.; Van Schooneveld, T.; Smith, C.J. That Which Bends Up: A Case Report and Literature Review of Chikungunya Virus. *J. Gen. Intern. Med.* **2016**, *31*, 576–581, doi:10.1007/s11606-015-3459-3.
405. Bettis, A.A.; L’Azou Jackson, M.; Yoon, I.K.; Breugelmanns, J.G.; Goios, A.; Gubler, D.J.; Powers, A.M. The Global Epidemiology of Chikungunya from 1999 to 2020: A Systematic Literature Review to Inform the Development and Introduction of Vaccines. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2022**, *16*, doi:10.1371/JOURNAL.PNTD.0010069.
406. Lines, J. Chikungunya in Italy. *Br. Med. J.* **2007**, *335*, 576.
407. Grandadam, M.; Caro, V.; Plumet, S.; Thiberge, J.M.; Souarès, Y.; Failloux, A.B.; Tolou, H.J.; Budelot, M.; Cosserat, D.; Leparç-Goffart, I.; et al. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 910–913, doi:10.3201/eid1705.101873.

408. Delisle, E.; Rousseau, C.; Broche, B.; Leparç-Goffart, I.; L'Ambert, G.; Cochet, A.; Prat, C.; Foulongne, V.; Ferre, J.B.; Catelinois, O.; et al. Chikungunya Outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill.* **2015**, *20*, 21108, doi:10.2807/1560-7917.ES2015.20.17.21108/CITE/PLAINTEXT.
409. Riccardo, F.; Venturi, G.; Luca, M. Di; Manso, M. Del; Severini, F.; Andrianou, X.; Fortuna, C.; Remoli, M.E.; Benedetti, E.; Caporali, M.G.; et al. Secondary Autochthonous Outbreak of Chikungunya, Southern Italy, 2017. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 2093–2095, doi:10.3201/eid2511.180949.
410. Moro, M.L.; Gagliotti, C.; Silvi, G.; Angelini, R.; Sambri, V.; Rezza, G.; Massimiliani, E.; Mattivi, A.; Grilli, E.; Finarelli, A.C.; et al. Chikungunya Virus in North-Eastern Italy: A Seroprevalence Survey. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 508–511, doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0322.
411. Atalay, T.; Kaygusuz, S.; Azkur, A.K. A Study of the Chikungunya Virus in Humans in Turkey. *Turkish J. Med. Sci.* **2017**, *47*, 1161–1164, doi:10.3906/sag-1604-36.
412. Cassadou, S.; Boucau, S.; Petit-Sinturel, M.; Huc, P.; Leparç-Goffart, I.; Ledrans, M. Emergence of Chikungunya Fever on the French Side of Saint Martin Island, October to December 2013. *Eurosurveillance* **2014**, *19*, doi:10.2807/1560-7917.ES2014.19.13.20752.
413. Yactayo, S.; Staples, J.E.; Millot, V.; Cibrelus, L.; Ramon-Pardo, P. Epidemiology of Chikungunya in the Americas. In Proceedings of the Journal of Infectious Diseases; Oxford University Press, December 1 2016; Vol. 214, pp. S441–S445.
414. van Genderen, F.T.; Krishnadath, I.; Sno, R.; Grunberg, M.G.; Zijlmans, W.; Adhin, M.R. First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2016**, *10*, e0004625, doi:10.1371/journal.pntd.0004625.
415. Ball, J.D.; Elbadry, M.A.; Telisma, T.; White, S.K.; Chavannes, S.; Anilis, M.G.; Prospero, M.; Cummings, D.A.T.; Lednicky, J.A.; Morris, J.G.; et al. Clinical and Epidemiologic Patterns of Chikungunya Virus Infection and Coincident Arboviral Disease in a School Cohort in Haiti, 2014–2015. *Clin. Infect. Dis.* **2019**, *68*, 919–926.
416. Kumar, A.; Best, C.; Benskin, G. Epidemiology, Clinical and Laboratory Features and Course of Chikungunya among a Cohort of Children during the First Caribbean Epidemic. *J. Trop. Pediatr.* **2017**, *63*, 43–49, doi:10.1093/tropej/fmw051.
417. Rojas, D.P.; Barrera-Fuentes, G.A.; Pavia-Ruz, N.; Salgado-Rodriguez, M.; Chémendoza, A.; Manrique-Saide, P.; Vazquez-Prokopec, G.M.; Halloran, M.E.; Longini, I.M.; Gomez-Dantes, H. Epidemiology of Dengue and Other Arboviruses in a Cohort of School Children and Their Families in Yucatan, Mexico: Baseline and First Year Follow-Up. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, doi:10.1371/journal.pntd.0006847.
418. Oviedo-Pastrana, M.; Méndez, N.; Mattar, S.; Arrieta, G.; Gomezccaceres, L. Epidemic Outbreak of Chikungunya in Two Neighboring Towns in the Colombian Caribbean: A Survival Analysis. *Arch. Public Heal.* **2017**, *75*, 1–8, doi:10.1186/s13690-016-0169-1.
419. Rico-Mendoza, A.; Porras-Ramírez, A.; Chang, A.; Encinales, L.; Lynch, R. Co-Circulation of Dengue, Chikungunya, and Zika Viruses in Colombia from 2008 to 2018. *Rev. Panam. Salud Publica/Pan Am. J. Public Heal.* **2019**, *43*, doi:10.26633/RPSP.2019.49.

420. Zambrano, L.I.; Sierra, M.; Lara, B.; Rodríguez-Núñez, I.; Medina, M.T.; Lozada-Riascos, C.O.; Rodríguez-Morales, A.J. Estimating and Mapping the Incidence of Dengue and Chikungunya in Honduras during 2015 Using Geographic Information Systems (GIS). *J. Infect. Public Health* **2017**, *10*, 446–456, doi:10.1016/j.jiph.2016.08.003.
421. Dias, J.P.; Costa, M. da C.N.; Campos, G.S.; Paixão, E.S.; Natividade, M.S.; Barreto, F.R.; Itaparica, M.S.C.; Goes, C. de S.B.; Oliveira, F.L.S.; Santana, E.B.; et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus in 2 Urban Areas of Brazil 1 Year after Emergence. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 617–624, doi:10.3201/eid2404.171370.
422. Kendrick, K.; Stanek, D.; Blackmore, C.; Centers for Disease Control and Prevention (CDC) Notes from the Field: Transmission of Chikungunya Virus in the Continental United States--Florida, 2014. *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.* **2014**, *63*, 1137.
423. Wimalasiri-Yapa, B.M.C.R.; Stassen, L.; Huang, X.; Hafner, L.M.; Hu, W.; Devine, G.J.; Yakob, L.; Jansen, C.C.; Faddy, H.M.; Viennet, E.; et al. Chikungunya Virus in Asia–Pacific: A Systematic Review. *Emerg. Microbes Infect.* **2019**, *8*, 70–79, doi:10.1080/22221751.2018.1559708.
424. Nsoesie, E.O.; Kraemer, M.U.G.; Golding, N.; Pigott, D.M.; Brady, O.J.; Moyes, C.L.; Johansson, M.A.; Gething, P.W.; Velayudhan, R.; Khan, K.; et al. Global Distribution and Environmental Suitability for Chikungunya Virus, 1952 to 2015. *Eurosurveillance* **2016**, *21*, doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.20.30234.
425. Chopra, A.; Anuradha, V.; Ghorpade, R.; Saluja, M. Acute Chikungunya and Persistent Musculoskeletal Pain Following the 2006 Indian Epidemic: A 2-Year Prospective Rural Community Study. *Epidemiol. Infect.* **2012**, *140*, 842–850, doi:10.1017/S0950268811001300.
426. Manimunda, S.P.; Sugunan, A.P.; Rai, S.K.; Vijayachari, P.; Shriram, A.N.; Sharma, S.; Muruganandam, N.; Chaitanya, I.K.; Guruprasad, D.R.; Sudeep, A.B. Short Report: Outbreak of Chikungunya Fever, Dakshina Kannada District, South India, 2008. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *83*, 751–754, doi:10.4269/ajtmh.2010.09-0433.
427. Kaur, N.; Jain, J.; Kumar, A.; Narang, M.; Zakaria, M.K.; Marcello, A.; Kumar, D.; Gaiind, R.; Sunil, S. Chikungunya Outbreak in Delhi, India, 2016: Report on Coinfection Status and Comorbid Conditions in Patients. *New Microbes New Infect.* **2017**, *20*, 39–42, doi:10.1016/j.nmni.2017.07.007.
428. Sy, A.K.; Saito-Obata, M.; Medado, I.A.; Tohma, K.; Dapat, C.; Segubre-Mercado, E.; Tandoc, A.; Lupisan, S.; Oshitani, H. Molecular Characterization of Chikungunya Virus, Philippines, 2011–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 887–890, doi:10.3201/eid2205.151268.
429. Ang, L.W.; Kam, Y.W.; Lin, C.; Krishnan, P.U.; Tay, J.; Ng, L.C.; James, L.; Lee, V.J.M.; Goh, K.T.; Ng, L.F.P.; et al. Seroprevalence of Antibodies against Chikungunya Virus in Singapore Resident Adult Population. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0006163, doi:10.1371/journal.pntd.0006163.
430. Humphrey, J.M.; Al-Absi, E.S.; Hamdan, M.M.; Okasha, S.S.; Al-Trmanini, D.M.; El-Dous, H.G.; Dargham, S.R.; Schieffelin, J.; Abu-Raddad, L.J.; Nasrallah, G.K. Dengue and Chikungunya Seroprevalence among Qatari Nationals and Immigrants Residing in Qatar. *PLoS One* **2019**, *14*, doi:10.1371/journal.pone.0211574.

431. Barakat, A.M.; Smura, T.; Kuivanen, S.; Huhtamo, E.; Kurkela, S.; Putkuri, N.; Hasony, H.J.; Al-Hello, H.; Vapalahti, O. The Presence and Seroprevalence of Arthropod-Borne Viruses in Nasiriyah Governorate, Southern Iraq: A Cross-Sectional Study. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2016**, *94*, 794–799, doi:10.4269/ajtmh.15-0622.
432. Pastula, D.M.; Hancock, W.T.; Bel, M.; Biggs, H.; Marfel, M.; Lanciotti, R.; Laven, J.; Chen, T.H.; Staples, J.E.; Fischer, M.; et al. Chikungunya Virus Disease Outbreak in Yap State, Federated States of Micronesia. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2017**, *11*, e0005410, doi:10.1371/journal.pntd.0005410.
433. Aubry, M.; Teissier, A.; Huart, M.; Merceron, S.; Vanhomwegen, J.; Mapotoeke, M.; Mariteragi-Helle, T.; Roche, C.; Vial, A.L.; Teururai, S.; et al. Seroprevalence of Dengue and Chikungunya Virus Antibodies, French Polynesia, 2014–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2018**, *24*, 558–561, doi:10.3201/eid2403.171149.
434. Russo, G.; Subissi, L.; Rezza, G. Chikungunya Fever in Africa: A Systematic Review. *Pathog. Glob. Health* **2020**, *114*, 136–144.
435. Simo, F.B.N.; Bigna, J.J.; Well, E.A.; Kenmoe, S.; Sado, F.B.Y.; Weaver, S.C.; Moundipa, P.F.; Demanou, M. Chikungunya Virus Infection Prevalence in Africa: A Contemporaneous Systematic Review and Meta-Analysis. *Public Health* **2019**, *166*, 79–88.
436. Sergon, K.; Njuguna, C.; Kalani, R.; Ofula, V.; Onyango, C.; Konongoi, L.S.; Bedno, S.; Burke, H.; Dumilla, A.M.; Konde, J.; et al. Seroprevalence of Chikungunya Virus (CHIKV) Infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *78*, 333–337, doi:10.4269/ajtmh.2008.78.333.
437. Eyase, F.; Langat, S.; Berry, I.M.; Mulwa, F.; Nyunja, A.; Mutisya, J.; Owaka, S.; Limbaso, S.; Ofula, V.; Koka, H.; et al. Emergence of a Novel Chikungunya Virus Strain Bearing the E1:V80A Substitution, out of the Mombasa, Kenya 2017-2018 Outbreak. *PLoS One* **2020**, *15*, doi:10.1371/journal.pone.0241754.
438. Sissoko, D.; Malvy, D.; Giry, C.; Delmas, G.; Paquet, C.; Gabrie, P.; Pettinelli, F.; Sanquer, M.A.; Pierre, V. Outbreak of Chikungunya Fever in Mayotte, Comoros Archipelago, 2005-2006. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *102*, 780–786, doi:10.1016/j.trstmh.2008.02.018.
439. Demanou, M.; Antonio-Nkondjio, C.; Ngapana, E.; Rousset, D.; Paupy, C.; Manuguerra, J.C.; Zeller, H. Chikungunya Outbreak in a Rural Area of Western Cameroon in 2006: A Retrospective Serological and Entomological Survey. *BMC Res. Notes* **2010**, *3*, 1–7, doi:10.1186/1756-0500-3-128.
440. Kinimi, E.; Shayo, M.J.; Patrick, B.N.; Angwenyi, S.O.; Kasanga, C.J.; Weyer, J.; Jansen van Vuren, P.; Paweska, J.T.; Mboera, L.E.G.; Misinzo, G. Evidence of Chikungunya Virus Infection among Febrile Patients Seeking Healthcare in Selected Districts of Tanzania. *Infect. Ecol. Epidemiol.* **2018**, *8*, doi:10.1080/20008686.2018.1553460.
441. Paupy, C.; Kassa Kassa, F.; Caron, M.; Nkoghé, D.; Leroy, E.M. A Chikungunya Outbreak Associated with the Vector *Aedes Albopictus* in Remote Villages of Gabon. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2012**, *12*, 167–169, doi:10.1089/vbz.2011.0736.
442. Nkoghe, D.; Kassa, R.F.; Caron, M.; Grard, G.; Mombo, I.; Bikié, B.; Paupy, C.; Becquart, P.; Bisvigou, U.; Leroy, E.M. Clinical Forms of Chikungunya in Gabon,

2010. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, doi:10.1371/journal.pntd.0001517.
443. Moyer, N.; Thiberville, S.D.; Pastorino, B.; Nougairede, A.; Thirion, L.; Mombouli, J.V.; Dimi, Y.; Leparç-Goffart, I.; Capobianchi, M.R.; Lepfoundzou, A.D.; et al. First Reported Chikungunya Fever Outbreak in the Republic of Congo, 2011. *PLoS One* **2014**, *9*, e115938, doi:10.1371/journal.pone.0115938.
444. Vairo, F.; Coussoud-Mavoungou, M.P.A.; Ntoumi, F.; Castilletti, C.; Kitembo, L.; Haider, N.; Carletti, F.; Colavita, F.; Gruber, C.E.M.; Iannetta, M.; et al. Chikungunya Outbreak in the Republic of the Congo, 2019—Epidemiological, Virological and Entomological Findings of a South-North Multidisciplinary Taskforce Investigation. *Viruses* **2020**, *12*, doi:10.3390/v12091020.
445. Sow, A.; Faye, O.; Diallo, M.; Diallo, D.; Chen, R.; Faye, O.; Diagne, C.T.; Guerbois, M.; Weidmann, M.; Ndiaye, Y.; et al. Chikungunya Outbreak in Kedougou, Southeastern Senegal in 2009-2010. *Open Forum Infect. Dis.* **2018**, *5*, doi:10.1093/ofid/ofx259.
446. Takaya, S.; Kutsuna, S.; Nakayama, E.; Taniguchi, S.; Tajima, S.; Katanami, Y.; Yamamoto, K.; Takeshita, N.; Hayakawa, K.; Kato, Y.; et al. Chikungunya Fever in Traveler from Angola to Japan, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 156–158.
447. Geleta, D.; Tesfaye, N.; Ayigeñ, H. Epidemiological Description of Chikungunya Virus Outbreak in Dire Dawa Administrative City, Western Ethiopia, 2019. *Int. J. Clin. Exp. Med. Sci.* **2020**, *6*, 41, doi:10.11648/j.ijcems.20200603.13.
448. Jose, J.; Snyder, J.E.; Kuhn, R. A Structural and Functional Perspective of Alphavirus Replication and Assembly. *Future Microbiol.* **2009**, *4*, 837–856.
449. Weaver, S.C.; Osorio, J.E.; Livengood, J.A.; Chen, R.; Stinchcomb, D.T. Chikungunya Virus and Prospects for a Vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **2012**, *11*, 1087–1101.
450. Powers, A.M.; Brault, A.C.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. Re-Emergence of Chikungunya and o'nyong-Nyong Viruses: Evidence for Distinct Geographical Lineages and Distant Evolutionary Relationships. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 471–479, doi:10.1099/0022-1317-81-2-471.
451. Diallo, M.; Thonnon, J.; Traore-Lamizana, M.; Fontenille, D. Vectors of Chikungunya Virus in Senegal: Current Data and Transmission Cycles. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1999**, *60*, 281–286, doi:10.4269/ajtmh.1999.60.281.
452. Jupp, P.G.; McIntosh, B.M. Aedes Furcifer and Other Mosquitoes as Vectors of Chikungunya Virus at Mica, Northeastern Transvaal, South Africa. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **1990**, *6*, 415–420.
453. Paterson, H.E.; McIntosh, B.M. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1964**, *58*, 52–55, doi:10.1080/00034983.1964.11686214.
454. McIntosh, B.M.; Paterson, H.E.; McGillivray, G.; De Sousa, J. Further Studies on the Chikungunya Outbreak in Southern Rhodesia in 1962. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* **1964**, *58*, 45–51, doi:10.1080/00034983.1964.11686213.
455. Apandi, Y.; Nazni, W.A.; Noor Azleen, Z.A.; Vythilingam, I.; Noorazian, M.Y.; Azahari, A.H.; Zainah, S.; Lee, H.L. The First Isolation of Chikungunya Virus from Non- Human Primates in Malaysia. *J. Gen. Mol. Virol.* **2009**, *1*, 35–39.

456. Tsetsarkin, K.A.; Chen, R.; Sherman, M.B.; Weaver, S.C. Chikungunya Virus: Evolution and Genetic Determinants of Emergence. *Curr. Opin. Virol.* 2011, *1*, 310–317.
457. Tsetsarkin, K.A.; Vanlandingham, D.L.; McGee, C.E.; Higgs, S. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLoS Pathog.* 2007, *3*, 1895–1906, doi:10.1371/journal.ppat.0030201.
458. Contopoulos-Ioannidis, D.; Newman-Lindsay, S.; Chow, C.; LaBeaud, A.D. Mother-to-Child Transmission of Chikungunya Virus: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2018, *12*, e0006510, doi:10.1371/journal.pntd.0006510.
459. Appassakij, H.; Silpapojakul, K.; Promwong, C.; Rujirojindakul, P. The Potential Impact of Chikungunya Virus Outbreaks on Blood Transfusion. *Transfus. Med. Rev.* 2020, *34*, 23–28.
460. Vu, D.M.; Jungkind, D.; LaBeaud, A.D. Chikungunya Virus. *Clin. Lab. Med.* 2017, *37*, 371–382.
461. Feldstein, L.R.; Rowhani-Rahbar, A.; Staples, J.E.; Weaver, M.R.; Halloran, M.E.; Ellis, E.M. Persistent Arthralgia Associated with Chikungunya Virus Outbreak, US Virgin Islands, December 2014–February 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 2017, *23*, 673–676, doi:10.3201/eid2304.161562.
462. Schilte, C.; Staikovsky, F.; Couderc, T.; Madec, Y.; Carpentier, F.; Kassab, S.; Albert, M.L.; Lecuit, M.; Michault, A. Chikungunya Virus-Associated Long-Term Arthralgia: A 36-Month Prospective Longitudinal Study. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013, *7*, doi:10.1371/journal.pntd.0002137.
463. Zeana, C.; Kelly, P.; Heredia, W.; Cifuentes, A.; Franchin, G.; Purswani, M.; Tieng, A.; Hagmann, S.H.F. Post-Chikungunya Rheumatic Disorders in Travelers after Return from the Caribbean. *Travel Med. Infect. Dis.* 2016, *14*, 21–25, doi:10.1016/j.tmaid.2016.01.009.
464. Tandale, B. V.; Sathe, P.S.; Arankalle, V.A.; Wadia, R.S.; Kulkarni, R.; Shah, S. V.; Shah, S.K.; Sheth, J.K.; Sudeep, A.B.; Tripathy, A.S.; et al. Systemic Involvements and Fatalities during Chikungunya Epidemic in India, 2006. *J. Clin. Virol.* 2009, *46*, 145–149, doi:10.1016/j.jcv.2009.06.027.
465. Labadie, K.; Larcher, T.; Joubert, C.; Mannioui, A.; Delache, B.; Brochard, P.; Guigand, L.; Dubreil, L.; Lebon, P.; Verrier, B.; et al. Chikungunya Disease in Nonhuman Primates Involves Long-Term Viral Persistence in Macrophages. *J. Clin. Invest.* 2010, *120*, 894–906, doi:10.1172/JCI40104.
466. Mardekian, S.K.; Roberts, A.L. Diagnostic Options and Challenges for Dengue and Chikungunya Viruses. *Biomed Res. Int.* 2015, 2015.
467. Chan, Y.H.; Teo, T.H.; Torres-Ruesta, A.; Hartimath, S. V.; Chee, R.S.L.; Khanapur, S.; Yong, F.F.; Ramasamy, B.; Cheng, P.; Rajarethinam, R.; et al. Longitudinal [18F]FB-IL-2 PET Imaging to Assess the Immunopathogenicity of O’nyong-Nyong Virus Infection. *Front. Immunol.* 2020, *11*, 894, doi:10.3389/fimmu.2020.00894.
468. Chippaux, A.; Chippaux-Hyppolite, C. [Signs of the Spread of O’Nyong-Nyong Virus in the Central African Republic]. *Med Trop* 1968, *28*, 346–362.

469. Monlun, E.; Zeller, H.; Le Guenno, B.; Traoré-Lamizana, M.; Hervy, J.P.; Adam, F.; Ferrara, L.; Fontenille, D.; Sylla, R.; Mondo, M. Surveillance of the Circulation of Arbovirus of Medical Interest in the Region of Eastern Senegal. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1993**, *86*, 21–28.
470. Lanciotti, R.S.; Ludwig, M.L.; Rwaguma, E.B.; Lutwama, J.J.; Kram, T.M.; Karabatsos, N.; Cropp, B.C.; Miller, B.R. Emergence of Epidemic O'nyong-Nyong Fever in Uganda after a 35-Year Absence: Genetic Characterization of the Virus. *Virology* **1998**, *252*, 258–268, doi:10.1006/VIRO.1998.9437.
471. LaBeaud, A.D.; Banda, T.; Brichard, J.; Muchiri, E.M.; Mungai, P.L.; Mutuku, F.M.; Borland, E.; Gildengorin, G.; Pfeil, S.; Teng, C.Y.; et al. High Rates of O'Nyong Nyong and Chikungunya Virus Transmission in Coastal Kenya. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003436, doi:10.1371/journal.pntd.0003436.
472. Tappe, D.; Kapaun, A.; Emmerich, P.; de Mendonca Campos, R.; Cadar, D.; Günther, S.; Schmidt-Chanasit, J. O'nyong-Nyong Virus Infection Imported to Europe from Kenya by a Traveler. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 1766–1767.
473. Fokam, E.B.; Levai, L.D.; Guzman, H.; Amelia, P.A.; Titanji, V.P.K.; Tesh, R.B.; Weaver, S.C. Silent Circulation of Arboviruses in Cameroon. *East Afr. Med. J.* **2010**, *87*, 262–268, doi:10.4314/eamj.v87i6.63085.
474. Kuniholm, M.H.; Wolfe, N.D.; Huang, C.Y.H.; Mpoudi-Ngole, E.; Tamoufe, U.; Burke, D.S.; Gubler, D.J. Seroprevalence and Distribution of Flaviviridae, Togaviridae, and Bunyaviridae Arboviral Infections in Rural Cameroonian Adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 1078–1083, doi:10.4269/ajtmh.2006.74.1078.
475. Kading, R.C.; Borland, E.M.; Cranfield, M.; Powers, A.M. Prevalence of Antibodies to Alphaviruses and Flaviviruses in Free-Ranging Game Animals and Nonhuman Primates in the Greater Congo Basin. *J. Wildl. Dis.* **2013**, *49*, 587–599, doi:10.7589/2012-08-212.
476. Bessaud, M.; Peyrefitte, C.N.; Pastorino, B.A.M.; Gravier, P.; Tock, F.; Boete, F.; Tolou, H.J.; Grandadam, M. O'nyong-Nyong Virus, Chad. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1248–1250, doi:10.3201/eid1208.060199.
477. Posey, D.L.; O'Rourke, T.; Roehrig, J.T.; Lanciotti, R.S.; Weinberg, M.; Maloney, S. Short Report: O'nyong-Nyong Fever in West Africa. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2005**, *73*, 32, doi:10.4269/ajtmh.2005.73.1.0730032.
478. Seymour, R.L.; Rossi, S.L.; Bergren, N.A.; Plante, K.S.; Weaver, S.C. The Role of Innate versus Adaptive Immune Responses in a Mouse Model of O'Nyong-Nyong Virus Infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2013**, *88*, 1170–1179, doi:10.4269/ajtmh.12-0674.
479. Strauss, J.H.; Strauss, E.G. The Alphaviruses: Gene Expression, Replication, and Evolution. *Microbiol. Rev.* **1994**, *58*, 491–562, doi:10.1128/mr.58.3.491-562.1994.
480. Saxton-Shaw, K.D.; Ledermann, J.P.; Borland, E.M.; Stovall, J.L.; Mossel, E.C.; Singh, A.J.; Wilusz, J.; Powers, A.M. O'nyong Nyong Virus Molecular Determinants of Unique Vector Specificity Reside in Non-Structural Protein 3. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, doi:10.1371/journal.pntd.0001931.
481. Vanlandingham, D.L.; Tsetsarkin, K.; Klingler, K.A.; Hong, C.; McElroy, K.L.;

- Lehane, M.J.; Higgs, S. Determinants of Vector Specificity of o'nyong Nyong and Chikungunya Viruses in Anopheles and Aedes Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2006**, *74*, 663–669, doi:10.4269/ajtmh.2006.74.663.
482. Kenea, O.; Balkew, M.; Tekie, H.; Gebre-Michael, T.; Deressa, W.; Loha, E.; Lindtjørn, B.; Overgaard, H.J. Human-Biting Activities of Anopheles Species in South-Central Ethiopia. *Parasites and Vectors* **2016**, *9*, 1–12, doi:10.1186/s13071-016-1813-x.
483. Mwangangi, J.M.; Mbogo, C.M.; Muturi, E.J.; Nzovu, J.G.; Githure, J.I.; Yan, G.; Minakawa, N.; Novak, R.; Beier, J.C. Spatial Distribution and Habitat Characterisation of Anopheles Larvae along the Kenyan Coast. *J. Vector Borne Dis.* **2007**, *44*, 44–51.
484. Smith, D.R.; Lee, J.S.; Jahrling, J.; Kulesh, D.A.; Turell, M.J.; Groebner, J.L.; O'Guinn, M.L. Development of Field-Based Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Assays for Detection of Chikungunya and O'nyong-Nyong Viruses in Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *81*, 679–684, doi:10.4269/ajtmh.2009.09-0138.
485. Liu, J.; Ochieng, C.; Wiersma, S.; Ströher, U.; Towner, J.S.; Whitmer, S.; Nichol, S.T.; Moore, C.C.; Kersh, G.J.; Kato, C.; et al. Development of a TaqMan Array Card for Acute-Febrile-Illness Outbreak Investigation and Surveillance of Emerging Pathogens, Including Ebola Virus. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 49–58, doi:10.1128/JCM.02257-15.
486. Waggoner, J.; Heath, C.J.; Ndenga, B.; Mutuku, F.; Sahoo, M.K.; Mohamed-Hadley, A.; Vulule, J.; Mukoko, D.; Desiree LaBeaud, A.; Pinsky, B.A. Development of a Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction for o'nyong-Nyong Virus and Evaluation with Clinical and Mosquito Specimens from Kenya. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2017**, *97*, 121–124, doi:10.4269/ajtmh.17-0027.
487. Kiwanuka, N.; Sanders, E.J.; Rwaguma, E.B.; Kawamata, J.; Ssenooba, F.P.; Najjemba, R.; Were, W.A.; Lamunu, M.; Bagambisa, G.; Burkot, T.R.; et al. O'nyong-Nyong Fever in South-Central Uganda, 1996-1997: Clinical Features and Validation of a Clinical Case Definition for Surveillance Purposes. *Clin. Infect. Dis.* **1999**, *29*, 1243–1250, doi:10.1086/313462.
488. Pezzi, L.; Reusken, C.B.; Weaver, S.C.; Drexler, J.F.; Busch, M.; LaBeaud, A.D.; Diamond, M.S.; Vasilakis, N.; Drebot, M.A.; Siqueira, A.M.; et al. GloPID-R Report on Chikungunya, O'nyong-Nyong and Mayaro Virus, Part I: Biological Diagnostics. *Antiviral Res.* **2019**, *166*, 66–81.
489. Hozé, N.; Diarra, I.; Sangaré, A.K.; Pastorino, B.; Pezzi, L.; Kouriba, B.; Sagara, I.; Dabo, A.; Djimdé, A.; Thera, M.A.; et al. Model-Based Assessment of Chikungunya and O'nyong-Nyong Virus Circulation in Mali in a Serological Cross-Reactivity Context. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-26707-9.
490. Mostafavi, H.; Abeyratne, E.; Zaid, A.; Taylor, A. Arthritogenic Alphavirus-Induced Immunopathology and Targeting Host Inflammation as a Therapeutic Strategy for Alphaviral Disease. *Viruses* **2019**, *11*.
491. Khan, M.; Santhosh, S.R.; Tiwari, M.; Lakshmana Rao, P. V.; Parida, M. Assessment of in Vitro Prophylactic and Therapeutic Efficacy of Chloroquine against Chikungunya Virus in Vero Cells. *J. Med. Virol.* **2010**, *82*, 817–824, doi:10.1002/jmv.21663.

492. Rothan, H.A.; Bahrani, H.; Mohamed, Z.; Teoh, T.C.; Shankar, E.M.; Rahman, N.A.; Yusof, R. A Combination of Doxycycline and Ribavirin Alleviated Chikungunya Infection. *PLoS One* **2015**, *10*, doi:10.1371/journal.pone.0126360.
493. Akahata, W.; Yang, Z.Y.; Andersen, H.; Sun, S.; Holdaway, H.A.; Kong, W.P.; Lewis, M.G.; Higgs, S.; Rossmann, M.G.; Rao, S.; et al. A Virus-like Particle Vaccine for Epidemic Chikungunya Virus Protects Nonhuman Primates against Infection. *Nat. Med.* **2010**, *16*, 334–338, doi:10.1038/nm.2105.
494. Hansen, C.A.; Barrett, A.D.T. The Present and Future of Yellow Fever Vaccines. *Pharmaceuticals* **2021**, *14*, 891.
495. Mutebi, J.P.; Barrett, A.D.T. The Epidemiology of Yellow Fever in Africa. *Microbes Infect.* **2002**, *4*, 1459–1468.
496. Sridhar, S.; Luedtke, A.; Langevin, E.; Zhu, M.; Bonaparte, M.; Machabert, T.; Savarino, S.; Zambrano, B.; Moureau, A.; Khromava, A.; et al. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N. Engl. J. Med.* **2018**, *379*, 327–340, doi:10.1056/NEJMoa1800820.
497. Erasmus, J.H.; Rossi, S.L.; Weaver, S.C. Development of Vaccines for Chikungunya Fever. In Proceedings of the Journal of Infectious Diseases; J Infect Dis, December 1 2016; Vol. 214, pp. S488–S496.
498. NIH Zika Virus Vaccines | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases Available online: <https://www.niaid.nih.gov/diseases-conditions/zika-vaccines> (accessed on 28 July 2022).
499. Partidos, C.D.; Paykel, J.; Weger, J.; Borland, E.M.; Powers, A.M.; Seymour, R.; Weaver, S.C.; Stinchcomb, D.T.; Osorio, J.E. Cross-Protective Immunity against o'nyong-Nyong Virus Afforded by a Novel Recombinant Chikungunya Vaccine. *Vaccine* **2012**, *30*, 4638–4643, doi:10.1016/j.vaccine.2012.04.099.
500. Whiteman, M.C.; Li, L.; Wicker, J.A.; Kinney, R.M.; Huang, C.; Beasley, D.W.C.; Chung, K.M.; Diamond, M.S.; Solomon, T.; Barrett, A.D.T. Development and Characterization of Non-Glycosylated E and NS1 Mutant Viruses as a Potential Candidate Vaccine for West Nile Virus. *Vaccine* **2010**, *28*, 1075–1083, doi:10.1016/j.vaccine.2009.10.112.
501. Beasley, D.W. Vaccines and Immunotherapeutics for the Prevention and Treatment of Infections with West Nile Virus. *Immunotherapy* **2011**, *3*, 269–285.
502. Pittman, P.R.; Plotkin, S.A. Biodefense and Special Pathogen Vaccines. In *Plotkin's Vaccines*; Elsevier, 2018; pp. 149-160.e7.
503. Colpitts, T.M.; Conway, M.J.; Montgomery, R.R.; Fikrig, E. West Nile Virus: Biology, Transmission, and Human Infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **2012**, *25*, 635–648, doi:10.1128/CMR.00045-12.
504. Desanti-Consoli, H.; Bouillon, J.; Chapuis, R.J.J. Equids' Core Vaccines Guidelines in North America: Considerations and Prospective. *Vaccines* **2022**, *10*, 398, doi:10.3390/vaccines10030398.
505. Robert, V.; Lhuillier, M.; Meunier, D.; Sarthou, J.L.; Monteny, N.; Digoutte, J.P.; Cornet, M.; Germain, M.; Cordellier, R. Yellow Fever Virus, Dengue 2 and Other Arboviruses Isolated from Mosquitos, in Burkina Faso, from 1983 to 1986.

- Entomological and Epidemiological Considerations. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1993**, *86*, 90–100.
506. Sondo, K.A.; Gnamou, A.; Diallo, I.; Ka, D.; Zoungrana, J.; Diendéré, E.A.; Fortes, L.; Poda, A.; Ly, D.; Ouédraogo, A.G.; et al. Etude Descriptive Des Complications de La Dengue Au Cours de La Flambée de 2016 à Ouagadougou Au Burkina Faso. *PAMJ-OH.* **2022**; *727* **2022**, *7*, doi:10.11604/PAMJ-OH.2022.7.27.32454.
507. Sow, A.; Loucoubar, C.; Diallo, D.; Faye, O.; Ndiaye, Y.; Senghor, C.S.; Dia, A.T.; Faye, O.; Weaver, S.C.; Diallo, M.; et al. Concurrent Malaria and Arbovirus Infections in Kedougou, Southeastern Senegal. *Malar. J.* **2016**, *15*, 1–7, doi:10.1186/s12936-016-1100-5.
508. Colombo, T.E.; Versiani, A.F.; Dutra, K.R.; Rubiato, J.G.D.; Galvão, T.M.; Negri Reis, A.F.; Nogueira, M.L. Performance of CDC Triplex QPCR during a Dengue Outbreak in Brazil. *J. Clin. Virol.* **2019**, *121*, 104208, doi:10.1016/j.jcv.2019.104208.
509. Franco, L.; di Caro, A.; Carletti, F.; Vapalahti, O.; Renaudat, C.; Zeller, H.; Tenorio, A. Recent Expansion of Dengue Virus Serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 1–4, doi:10.2807/ese.15.07.19490-en.
510. Amarasinghe, A.; Kuritsky, J.N.; William Letson, G.; Margolis, H.S. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1349–1354, doi:10.3201/eid1708.101515.
511. Phoutrides, E.K.; Coulibaly, M.B.; George, C.M.; Sacko, A.; Traore, S.; Bessoff, K.; Wiley, M.R.; Kolivras, K.N.; Adelman, Z.; Traore, M.; et al. Dengue Virus Seroprevalence among Febrile Patients in Bamako, Mali: Results of a 2006 Surveillance Study. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2011**, *11*, 1479–1485, doi:10.1089/vbz.2011.0622.
512. Fagbami, A.H.; Onoja, A.B. Dengue Haemorrhagic Fever: An Emerging Disease in Nigeria, West Africa. *J. Infect. Public Health* **2018**, *11*, 757–762.
513. Simonin, Y.; Loustalot, F.; Desmetz, C.; Foulongne, V.; Constant, O.; Fournier-Wirth, C.; Leon, F.; Molès, J.P.; Goubaud, A.; Lemaitre, J.M.; et al. Zika Virus Strains Potentially Display Different Infectious Profiles in Human Neural Cells. *EBioMedicine* **2016**, *12*, 161–169, doi:10.1016/j.ebiom.2016.09.020.
514. Aubry, F.; Jacobs, S.; Darmuzey, M.; Lequime, S.; Delang, L.; Fontaine, A.; Jupatanakul, N.; Miot, E.F.; Dabo, S.; Manet, C.; et al. Recent African Strains of Zika Virus Display Higher Transmissibility and Fetal Pathogenicity than Asian Strains. *Nat. Commun.* **2021**, *12*, doi:10.1038/s41467-021-21199-z.
515. Katzelnick, L.C.; Narvaez, C.; Arguello, S.; Mercado, B.L.; Collado, D.; Ampie, O.; Elizondo, D.; Miranda, T.; Carillo, F.B.; Mercado, J.C.; et al. Zika Virus Infection Enhances Future Risk of Severe Dengue Disease. *Science (80-.)*. **2020**, *369*, 1123–1128, doi:10.1126/science.abb6143.
516. García-Carrasco, J.M.; Muñoz, A.R.; Olivero, J.; Segura, M.; Real, R. Mapping the Risk for West Nile Virus Transmission, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2022**, *28*, 777–785, doi:10.3201/eid2804.211103.
517. Percivalle, E.; Sasser, D.; Rovida, F.; Isernia, P.; Fabbi, M.; Baldanti, F.; Marone, P. Usutu Virus Antibodies in Blood Donors and Healthy Forestry Workers in the

- Lombardy Region, Northern Italy. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 658–661, doi:10.1089/vbz.2017.2126.
518. Nagy, A.; Csonka, N.; Takács, M.; Mezei, E.; Barabás, É. West Nile and Usutu Virus Seroprevalence in Hungary: A Nationwide Serosurvey among Blood Donors in 2019. *PLoS One* **2022**, *17*, e0266840, doi:10.1371/journal.pone.0266840.
519. Pierro, A.; Gaibani, P.; Spadafora, C.; Ruggeri, D.; Randi, V.; Parenti, S.; Finarelli, A.C.; Rossini, G.; Landini, M.P.; Sambri, V. Detection of Specific Antibodies against West Nile and Usutu Viruses in Healthy Blood Donors in Northern Italy, 2010–2011. *Clin. Microbiol. Infect.* **2013**, *19*, doi:10.1111/1469-0691.12241.
520. Bażanów, B.; Jansen van Vuren, P.; Szymański, P.; Stygar, D.; Frącka, A.; Twardoń, J.; Kozdrowski, R.; Pawęska, J.T. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **2018**, *10*, doi:10.3390/v10020087.
521. 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, doi:10.1017/S095026881600011X.
522. Yapici, O.; Kale, M.; Gur, S.; Mamak, N.; Yavru, S.; Hasircioglu, S.; Bulut, O. Serologic Investigation for West Nile Virus Infection in Commercial Domestic Chickens (*Gallus Gallus Domesticus*). *J. Anim. Vet. Adv.* **2012**, *11*, 2211–2214, doi:10.3923/javaa.2012.2211.2214.
523. Niczyporuk, J.S.; Samorek-Salamonowicz, E.; Lecollinet, S.; Pancewicz, S.A.; Kozdruń, W.; Czekał, H. Occurrence of West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Horses, and Humans in Poland. *Biomed Res. Int.* **2015**, *2015*, 234181, doi:10.1155/2015/234181.
524. Venter, M.; Pretorius, M.; Fuller, J.A.; Botha, E.; Rakgotho, M.; Stivaktas, V.; Weyer, C.; Romito, M.; Williams, J. West Nile Virus Lineage 2 in Horses and Other Animals with Neurologic Disease, South Africa, 2008–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2060, doi:10.3201/EID2312.162078.
525. Cabre, O.; Grandadam, M.; Marié, J. Lou; Gravier, P.; Prangé, A.; Santinelli, Y.; Rous, V.; Bourry, O.; Durand, J.P.; Tolou, H.; et al. West Nile Virus in Horses, Sub-Saharan Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2006**, *12*, 1958–1960, doi:10.3201/eid1212.060042.
526. Cabre, O.; Durand, J.P.; Prangé, A.; Gomez, J.; Maurizi, L.; Tolou, H.; Davoust, B. West Nile Virus Infection: Serological Investigation among Horses in France and in Africa. *Med. Trop. (Mars)*. **2005**, *65*, 439–443.
527. Sule, W.F.; Oluwayelu, D.O.; Hernández-Triana, L.M.; Fooks, A.R.; Venter, M.; Johnson, N. Epidemiology and Ecology of West Nile Virus in Sub-Saharan Africa. *Parasites and Vectors* **2018**, *11*.
528. Cano-Terriza, D.; Guerra, R.; Lecollinet, S.; Cerdà-Cuéllar, M.; Cabezón, O.; Almería, S.; García-Bocanegra, I. Epidemiological Survey of Zoonotic Pathogens in Feral Pigeons (*Columba Livia* Var. *Domestica*) and Sympatric Zoo Species in Southern Spain. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* **2015**, *43*, 22–27, doi:10.1016/j.cimid.2015.10.003.
529. Waziri, I.J.; Kabir, J.; Kwaga, J.K.P.; Nguku, P. Serosurvey of West Nile Virus in

- Household-Reared Pigeons in Bauchi Metropolis, Nigeria. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2018**, *112*, 169–174, doi:10.1093/trstmh/try035.
530. Ouattara, L.P.E.; Sangaré, I.; Namountougou, M.; Hien, A.; Ouari, A.; Soma, D.D.; Kassié, D.; Diabaté, A.; Gnankiné, O.; Bonnet, E.; et al. Surveys of Arboviruses Vectors in Four Cities Stretching along a Railway Transect of Burkina Faso: Risk Transmission and Insecticide Susceptibility Status of Potential Vectors. *Front. Vet. Sci.* **2019**, *6*, 140, doi:10.3389/FVETS.2019.00140/BIBTEX.
531. Ritchie, S.A.; Cortis, G.; Paton, C.; Townsend, M.; Shroyer, D.; Zborowski, P.; Hall-Mendelin, S.; Van Den Hurk, A.F. A Simple Non-Powered Passive Trap for the Collection of Mosquitoes for Arbovirus Surveillance. *J. Med. Entomol.* **2013**, *50*, 185–194, doi:10.1603/ME12112.
532. Hien, A.S.; Sangaré, I.; Ouattara, E.L.P.; Sawadogo, S.P.; Soma, D.D.; Hamidou, M.; Diabaté, A.; Bonnet, E.; Ridde, V.; Fournet, F.; et al. Chikungunya (Togaviridae) and Dengue 2 (Flaviviridae) Viruses Isolated from *Aedes Aegypti* Mosquitoes by QRT-PCR Technique: Xenosurveillance for Arboviruses Circulating in Burkina Faso. **2021**, doi:10.20944/PREPRINTS202108.0077.V1.
533. Ba, Y.; Sall, A.A.; Diallo, D.; Mondo, M.; Girault, L.; Dia, I.; Diallo, M. Re-Emergence of Rift Valley Fever Virus in Barkedji (Senegal, West Africa) in 20022003: Identification of New Vectors and Epidemiological Implications. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2012**, *28*, 170–178, doi:10.2987/12-5725.1.
534. Ouédraogo, S.; Degroote, S.; Barro, S.A.; Somé, P.A.; Bonnet, E.; Ridde, V. Recurrence of Dengue Epidemics in Burkina Faso: Community Preference for an Intervention to Prevent the Disease. *Rev. Epidemiol. Sante Publique* **2019**, *67*, 375–382, doi:10.1016/j.respe.2019.08.002.
535. Nielsen, S.S.; Alvarez, J.; Bicout, D.J.; Calistri, P.; Depner, K.; Drewe, J.A.; Garin-Bastuji, B.; Rojas, J.L.G.; Schmidt, C.G.; Michel, V.; et al. Rift Valley Fever – Epidemiological Update and Risk of Introduction into Europe. *EFSA J.* **2020**, *18*, e06041, doi:10.2903/J.EFSA.2020.6041.
536. Flick, R.; Bouloy, M. Rift Valley Fever Virus. *Curr. Mol. Med.* **2005**, *5*, 679–690, doi:10.2174/156652405774962263.
537. SMITHBURN, K.C. Rift Valley Fever; the Neurotropic Adaptation of the Virus and the Experimental Use of This Modified Virus as a Vaccine. *Br. J. Exp. Pathol.* **1949**, *30*, 1–16.
538. Paweska, J.T. Rift Valley Fever. In *Emerging Infectious Diseases: Clinical Case Studies*; 2014; Vol. 34, pp. 73–93 ISBN 9780124201095.
539. Quellec, J.; Salinas, S.; Simonin, Y.; Cêtre-Sossah, C. Rift Valley Fever Virus Infection: Physiopathology and Pathogenesis. *Virologie* **2021**, *25*, 263–279, doi:10.1684/VIR.2021.0919.
540. Akakpo, A.J.; Some, M.J.R.; Bornarel, P.; Jouan, A.; Gonzalez, J.P. EPIDEMIOLOGIE DE LA FIEVRE DE LA VALLEE DU RIFT EN AFRIQUE DE L'OUEST. I. ENQUETE SEROLOGIQUE CHEZ LES RUMINANTS DOMESTIQUES AU BURKINA FASO. *Bull. Soc. Pathol. Exot. Filiales* **1989**, *82*, 321–331.

541. Gonzalez, J.P.; Le Guenno, B.; Some, M.J.R.; Akakpo, J.A. Serological Evidence in Sheep Suggesting Phlebovirus Circulation in a Rift Valley Fever Enzootic Area in Burkina Faso. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **1992**, *86*, 680–682, doi:10.1016/0035-9203(92)90190-N.
542. Guillaud, M.; Le Guenno, B.; Wilson, M.L.; Desoutter, D.; Gonzalez, J.P.; Digoutte, J.P. Prévalence En Anticorps Contre Le Virus de La Fièvre de La Vallée Du Rift Chez Les Petits Ruminants Du Sénégal. *Ann. l'Institut Pasteur Virol.* **1988**, *139*, 455–459, doi:10.1016/S0769-2617(88)80082-0.
543. Boussini, H.; Lamien, C.E.; Nacoulma, O.G.; Kaboré, A.; Poda, G.; Viljoen, G. Prevalence of Rift Valley Fever in Domestic Ruminants in the Central and Northern Regions of Burkina Faso. *OIE Rev. Sci. Tech.* **2014**, *33*, 893–901, doi:10.20506/rst.33.3.2327.
544. Tong, C.; Javelle, E.; Grard, G.; Dia, A.; Lacrosse, C.; Fourié, T.; Gravier, P.; Watier-Grillot, S.; Lancelot, R.; Letourneur, F.; et al. Tracking Rift Valley Fever: From Mali to Europe and Other Countries, 2016. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1800213, doi:10.2807/1560-7917.ES.2019.24.8.1800213.
545. AFSSA; Maisons-Alfort: *Avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire Des Aliments Sur Le Risque de Propagation de La Fièvre de La Vallée Du Rift Dans Un Département et Une Collectivité Départementale Française de l'Océan Indien (La Réunion et Mayotte).*; 2008;
546. Msimang, V.; Thompson, P.N.; van Vuren, P.J.; Tempia, S.; Cordel, C.; Kgaladi, J.; Khosa, J.; Burt, F.J.; Liang, J.; Rostal, M.K.; et al. Rift Valley Fever Virus Exposure amongst Farmers, Farm Workers, and Veterinary Professionals in Central South Africa. *Viruses* **2019**, *11*, 140, doi:10.3390/v11020140.
547. Swai, E.S.; Schoonman, L. Prevalence of Rift Valley Fever Immunoglobulin g Antibody in Various Occupational Groups before the 2007 Outbreak in Tanzania. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2009**, *9*, 579–582, doi:10.1089/vbz.2008.0108.
548. Olaleye, O.D.; Tomori, O.; Ladipo, M.A.; Schmitz, H. Rift Valley Fever in Nigeria: Infections in Humans. *Rev. Sci. Tech.* **1996**, *15*, 923–935, doi:10.20506/rst.15.3.967.
549. Faburay, B.; LaBeaud, A.D.; McVey, D.S.; Wilson, W.C.; Richt, J.A. Current Status of Rift Valley Fever Vaccine Development. *Vaccines* **2017**, *5*, 29.
550. Dungu, B.; Lubisi, B.A.; Ikegami, T. Rift Valley Fever Vaccines: Current and Future Needs. *Curr. Opin. Virol.* **2018**, *29*, 8–15.

Annexes

Annexes 1 : Revues

médecine/sciences 2022 ; 38 : 000-0

> La dengue est l'arbovirose la plus répandue dans le monde avec environ 390 millions de cas par an, dont 96 millions présentent des manifestations cliniques, avec plus de 25 000 décès annuels répertoriés. Le diagnostic clinique de la dengue en Afrique de l'Ouest est rendu difficile par l'existence d'autres maladies présentant des tableaux cliniques similaires. Il est donc nécessaire de mettre en place des systèmes de surveillance des infections fébriles d'origine inconnue en Afrique, en renforçant les capacités diagnostiques des laboratoires nationaux. <

Le terme arbovirus (ou *arthropod-borne virus*) regroupe plusieurs familles de virus transmis aux vertébrés par la piqûre de vecteurs arthropodes hématophages, tels que les moustiques, les tiques et les phlébotomes [1]. La dengue est l'arbovirose (maladie causée par un arbovirus) la plus répandue dans le monde, avec environ 390 millions de cas par an dont 96 millions présentent des manifestations cliniques [2]. Selon certaines estimations, environ la moitié de la population mondiale serait exposée à la dengue qui est endémique dans plus de 100 pays en Afrique, en Amérique et en Asie. La dengue serait responsable de 25 000 décès par an [3]. L'adaptation des espèces, le développement du commerce international, le réchauffement climatique, l'urbanisation et la croissance démographique mal contrôlée ont favorisé l'expansion de la circulation de ce virus à travers différents continents.

La dengue constitue un problème de santé publique dans les zones tropicales et en Asie du Sud et du Sud-Est, où les enfants âgés de cinq à quinze ans représentent la classe d'âge de la population la plus touchée [4]. En Afrique de l'Ouest, la circulation du virus chez les populations humaines a été décrite pour la première fois dans les années 1960 au Nigéria [5]. Depuis, plusieurs pays d'Afrique ont signalé des cas sporadiques ou des flambées épidémiques associés à ce virus. En Afrique sub-saharienne, les cas de dengue sont proba-

Vignette

m/s n° 2, vol. 38, février 2022
<https://doi.org/10.1051/medsci/2022007>

Circulation du virus de la dengue en Afrique de l'Ouest

Une problématique émergente de santé publique

Bachirou Tinto¹, Dramane Kania¹,
 Thérèse Samdapawindé Kagone¹, Amadou Dicko²,
 Isidore Traore¹, Nathalie de Rekeneire^{3,4},
 Brice Wilfried Bicaba⁵, Hervé Hien⁶,
 Philippe Van de Perre⁷, Yannick Simonin⁷,
 Sara Salinas⁷

¹Laboratoire national de référence des fièvres hémorragiques virales, Centre Muraz, Institut National de Santé Publique (INSP), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

²Laboratoire central de référence, INSP, Ouagadougou, Burkina Faso.

³Centre Muraz, INSP, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso.

⁴Expertise France, Paris, France.

⁵Centre des opérations de réponse aux urgences sanitaires (CORUS), INSP, Ouagadougou, Burkina Faso.

⁶INSP, Ouagadougou, Burkina Faso.

⁷Pathogenèse et contrôle des infections chroniques, université de Montpellier, Inserm, Établissement français du sang, 60 rue de Navacelles, 34000 Montpellier, France.
tintobachirou@yahoo.fr

blement sous-déclarés, en raison du faible niveau de sensibilisation des soignants, et de la confusion avec d'autres maladies fébriles courantes comme le paludisme [6]. En effet, la forte prévalence du paludisme dans cette région rend difficile la détection des arboviroses ainsi que celle des autres maladies fébriles non-palustres du fait de la similitude des symptômes. Environ 70 % des maladies fébriles diagnostiquées en Afrique Sub-saharienne sont ainsi traitées comme des cas de paludisme [7]. Des études de population sur les maladies fébriles sont donc nécessaires pour déterminer l'épidémiologie et l'incidence réelle de la dengue en Afrique.

Le virus de la dengue

Caractéristiques

Le virus de la dengue (DENV pour *dengue virus*) appartient à la famille des *Flaviviridae*, et au genre *Flavivirus*. Quatre sérotypes de virus de la dengue existent : DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4. Ces sérotypes sont similaires du point de vue antigénique, mais suffisamment diffé-

REVUES



SYNTHÈSE

rents pour ne pas conférer une protection croisée à long terme. Le DENV est un virus enveloppé d'un diamètre d'environ 50 nm. Son génome, constitué d'un ARN simple brin de polarité positive d'environ 10 700 nucléotides (Figure 1), code trois protéines structurales formant les composants du virion, et sept protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) impliquées dans la réplication de l'ARN viral [8]. Les trois protéines structurales sont des composants de la particule virale mature. Elles correspondent à la protéine membranaire (prM/M), la glycoprotéine d'enveloppe (E) et la protéine de capsid (C). La glycoprotéine E est impliquée dans la liaison du virus aux récepteurs cellulaires mais aussi dans l'hémagglutination des érythrocytes et dans l'induction de la réponse immunitaire de l'hôte [8]. Les protéines NS sont uniquement exprimées dans la cellule infectée [8]. NS1 et NS4B sont associées à la pathogénicité de la dengue. Il existe en effet une corrélation entre la concentration plasmatique de NS1 et la sévérité clinique de la maladie [9]. NS1 est ainsi utilisée comme marqueur diagnostique de l'infection. Cette protéine peut également interagir avec le système immunitaire de l'hôte et moduler la réponse des lymphocytes T [10].

Modes de transmission

La dengue est transmise par la piqûre des moustiques du genre *Aedes*, principalement *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* [11]. Originaire d'Afrique [6], *Aedes aegypti* est présent dans tous les pays du continent africain. La transmission de la dengue suit deux cycles : un cycle sylvatique au cours duquel le virus circule entre les primates non humains et des moustiques du genre *Aedes* (*Aedes luteocephalus* et *Aedes furcifer*), et un cycle urbain dans lequel le virus circule entre les hommes et les moustiques urbains (*Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*) [11] (Figure 2). Les moustiques du genre *Aedes* ont une activité diurne : ils effectuent leur repas sanguin principalement pendant la journée. Ils s'infectent à la suite d'un repas sanguin sur des hôtes vertébrés ayant une virémie élevée ; la période habituelle de virémie chez l'homme est d'environ cinq jours [12]. Le virus ingéré par le moustique migre du tractus intestinal de l'insecte jusqu'à ses glandes salivaires : ce processus, appelé phase extrinsèque, dure environ dix jours. Il peut être accéléré lorsque la température ambiante est élevée [12]. Après cette période d'incubation, le moustique sera susceptible d'infecter l'homme lors d'un repas sanguin, en injectant sa salive chargée de particules virales infectieuses [12].

Bien que le mode de transmission privilégié de la dengue soit par piqûre de moustique, plusieurs autres modes de transmission non vectorielle ont été rapportés. Ainsi, des cas de transmission par transfusion sanguine [13], par accident d'exposition aux liquides biologiques chez les personnels de santé (transmission nosocomiale) [14] et de transmission mère-enfant (transmission verticale) [15], en particulier par l'allaitement maternel [16], ont été observés.

Physiopathologie et manifestations cliniques

La période d'incubation de la dengue varie d'une personne à l'autre, en fonction de son statut immunitaire [17]. Cette période dure de

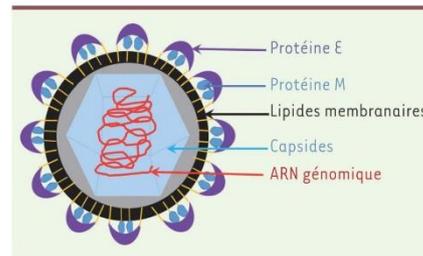


Figure 1. Structure du virus de la dengue.

quatre à sept jours (pouvant atteindre onze jours) chez les personnes partiellement immunisées [17]. À la suite de la contamination, le virus entre dans les cellules dendritiques immatures de la peau en utilisant des récepteurs non spécifiques, comme DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing non-integrin*), un récepteur de lectine de type C. Les cellules dendritiques infectées migrent ensuite vers les ganglions lymphatiques dans lesquels les antigènes viraux qu'elles présentent seront reconnus par les lymphocytes T, déclenchant alors des réponses immunitaires cellulaires et humorales [12]. Une importante réplication virale a également été observée dans les cellules parenchymateuses du foie et dans les macrophages des ganglions lymphatiques du foie et de la rate.

La maladie revêt différentes formes plus ou moins graves. Selon le tableau clinique, l'Organisation mondiale de la santé (OMS) classe ainsi la dengue en deux catégories : la dengue avec ou sans signe d'alerte et la dengue sévère. La gravité de la maladie dépend du sérotype du virus infectant, les sérotypes divergeant génétiquement les uns des autres. Certaines études tendent ainsi à montrer que le sérotype 2 (DENV-2) serait plus susceptible de provoquer des cas graves [18]. Des infections séquentielles par différents sérotypes augmenteraient également le risque de complications, pouvant entraîner un syndrome de choc (diminution aiguë du volume intravasculaire résultant de la fuite plasmatique ou sanguine) et le décès du patient [19]. Ce tableau clinique a pour origine le mécanisme d'ADE (*antibody-dependent enhancement*), un mécanisme de facilitation de l'infection par les anticorps, dont la dengue est l'un des prototypes : les anticorps, produits par les lymphocytes B mémoires éduqués lors de l'infection par un premier sérotype et réactivés lors d'une seconde infection, ne neutralisent pas le virus si son sérotype est différent [20]. Au contraire, ils formeraient avec les nouvelles particules virales des complexes qui favoriseraient l'infection des cellules

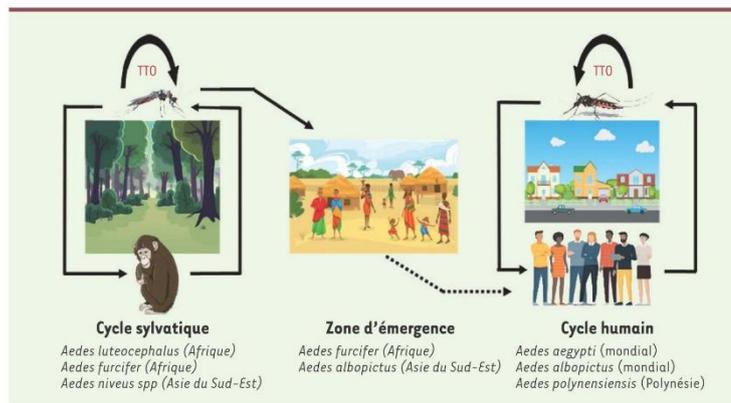


Figure 2. Cycles de transmission du virus de la dengue. Le cycle sylvatique se produit en zone forestière et implique les primates et les moustiques sauvages du genre *Aedes*. La zone d'émergence est constituée par les habitations à proximité de ces forêts. Le cycle avec la transmission aux hommes est induit par l'infection par les moustiques urbains. TTO : transmission transovariante.

Pays	Année	Sérotype	Référence
Burkina Faso	1925, 2007, 2013, 2016, 2017	1, 2, 3, 4	[29-31]
Cote d'Ivoire	2006, 2007, 2008, 2017	3, 2	[27,32]
Nigéria	1964-1968, 1972-1975, 2008, 2014	1, 2, 3, 4	[33,34]
Ghana	1932, 1987, 1993, 2002-2005, 2016-2017	2	[1,6]
Cap vert	2009	3	[6]
Mali	2006	2	[35]
Sénégal	1927, 1928, 2007, 2009	1, 2, 3, 4	[6,27]
Togo	1987, 1993, 1999, 2002	-	[6]
Bénin	1987, 1993, 2006	-	[6,27]

Tableau 1. Situation épidémiologique de la dengue en Afrique de l'Ouest.

myéloïdes (monocytes et macrophages) en permettant l'entrée du virus via la fixation des immunoglobulines complexées au virus à leurs récepteurs (les récepteurs de la région Fc des immunoglobulines, RfC) présents sur ces cellules, augmentant ainsi la réplication virale. L'infection des cellules myéloïdes, qui conduit à une présentation de différents antigènes viraux, induit alors une augmentation du nombre de lymphocytes T mémoire ayant une réactivité croisée contre différents sérotypes du virus [21]. Produits lors d'une primo-infection, ces lymphocytes T se multiplient massivement lors d'une seconde infection. Ils sécrètent alors de grandes quantités de cytokines pro-inflammatoires, telles que l'IFN- γ (interféron gamma) et le TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), [20], ainsi que de médiateurs vasoactifs, qui sont à l'origine d'une augmentation de la perméabilité capillaire, provoquant le syndrome de perméabilité vasculaire aiguë responsable de la dengue hémorragique [3]. La sévérité de ce syndrome est fonction

de l'âge du patient et serait plus sévère chez les jeunes enfants [12]. Le mécanisme d'ADE a également été observé entre des virus différents, chez des patients ayant été exposés au virus Zika et ayant secondairement contracté la dengue [22].

La survenue des formes graves pourrait également être liée à des facteurs génétiques de l'hôte. Les Africains et les personnes d'ascendance africaine pourraient en effet présenter une certaine résistance génétique face à la dengue [23]. Une étude a été menée pour tester l'ADE dans le contexte de l'infection par le virus de la dengue. Elle a été réalisée en utilisant des cellules mononucléées isolées du sang périphérique soit de personnes d'ascendance africaine soit de personnes d'ascendance européenne ayant été exposées au sérotype 1 du virus et présentant, ou non, des anticorps anti-DENV-1. Ces différentes cellules ont été infectées par le sérotype 2 du virus (DENV-2). Dans les cellules des personnes d'ascendance africaine, présentant ou non des anticorps anti-DENV-1, aucune réplication de DENV-2 n'a été observée. Au contraire, dans les cellules des personnes d'ascendance européenne qui avaient des anticorps anti-DENV-1, une importante augmentation de la multiplication virale a été mesurée [23].

Bien que, dans la majorité des cas, la dengue soit asymptomatique ou bénigne, certains patients présentent des manifestations cliniques allant d'une simple fièvre à des formes graves, voire mortelles [19]. La fièvre s'accompagne souvent d'autres symptômes : myalgie, arthralgie, anorexie, douleurs rétro-orbitaires, nausées et vomissements, mal de gorge, céphalées, éruption cutanée. Dans les formes graves (dengues hémorragiques), les patients présentent une thrombocytopénie, une fuite plasmatique (augmentation du taux d'hématocrite), un épanchement

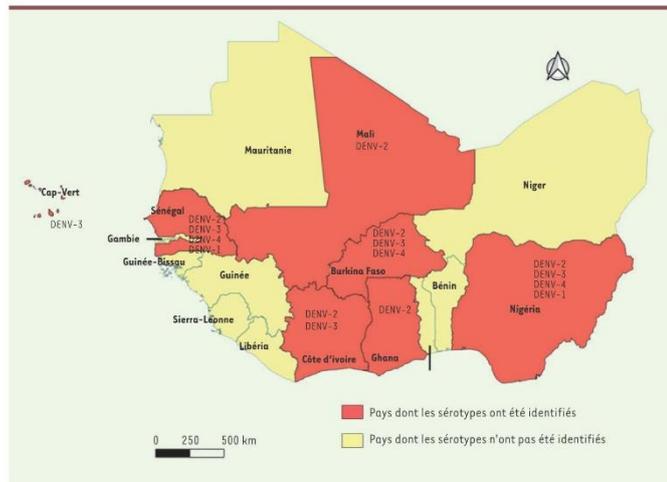


Figure 3. Distribution des sérotypes de la dengue (DENV) en Afrique de l'Ouest.

pleural avec une hypoalbuminémie ou une hypoprotéinémie, ainsi qu'une augmentation de la perméabilité vasculaire pouvant entraîner des complications hémorragiques majeures ou mineures, avec ou sans syndrome de choc. Chez certains patients, des atteintes neurologiques ont également été observées : syndrome de Guillain-Barré, myélite, encéphalites et méningites. Ce sont les sérotypes 2 et 3 qui sont le plus à l'origine de complications neurologiques ; des antigènes viraux ont été détectés dans le système nerveux central et dans le liquide céphalo-rachidien [24]. Une étude réalisée chez la souris a ainsi montré que le virus pouvait entraîner une rupture des jonctions serrées de la barrière hémato-encéphalique et causer un œdème cérébral vasogénique. Ce phénomène qui semble se produire également chez l'homme, est provoqué par une réponse immunitaire marquée par une forte production de cytokines induite lors de l'infection [25].

Épidémiologie : circulation du virus en Afrique

La dengue est endémique dans la plupart des régions tropicales et subtropicales dans lesquelles elle constitue l'une des principales causes de maladie [4]. Cette virose s'est rapidement répandue à travers le monde et, actuellement, plus de la moitié de la population mondiale vit dans des zones à risque [4]. L'Asie est le continent le plus touché, suivi de l'Amérique et, plus récemment, de l'Afrique [26].

La première épidémie de dengue documentée en Afrique est survenue à Durban, en Afrique du Sud, en 1927 [27]. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires pour mieux comprendre l'épidémiologie de la dengue en Afrique, les données publiées rapportent que 22 pays africains ont déclaré entre 1960 et 2010 des cas sporadiques ou des épidémies de dengue [28]. La maladie est aujourd'hui endémique dans plus de 34 pays africains [6]. Une transmission sylvatique du sérotype 2

a été rapportée au Sénégal et au Burkina Faso avec la notification de cas sporadiques. Les sérotypes 1 et 2 ont été rendus responsables de la majorité des épidémies sur le continent [6, 29]. À partir des années 2000, le sérotype 3 a également été détecté en Afrique de l'Ouest, notamment au Burkina Faso (en 2003, 2004, 2007 et 2014) et en Côte d'Ivoire en 2008. En 2009, ce sérotype était responsable des épidémies survenues au Sénégal [30, 31]. Au Mali, une étude de séroprévalence a montré une circulation de la dengue en 2006 [32]. Le sérotype 4, qui n'avait jamais été associé à une épidémie en Afrique, a été détecté pour la première fois en Angola et au Sénégal, en 1980 [27]. Plus récemment, une épidémie de dengue à virus de sérotypes 1, 2 et 3, avec des manifestations hémorragiques, a été signalée au Burkina Faso

en 2016 [33]. La Côte d'Ivoire a également connu une épidémie de dengue en 2017 et le Ghana a enregistré des cas de dengue entre 2016 et 2017 [1] (Figure 3).

Le diagnostic de la dengue et la problématique des ictères fébriles en Afrique

En Afrique de l'Ouest, le diagnostic des ictères fébriles pose un réel problème de santé publique. Les ictères fébriles peuvent être causés par différentes infections : parasitaires (paludisme), bactériennes (fièvre typhoïde, leptospirose), ou virales (dengue, hépatites) [34]. La similarité des symptômes existant entre ces maladies rend difficile le diagnostic, pouvant conduire à des erreurs dans la prise en charge clinique des patients [34]. Il est donc essentiel d'identifier les pathogènes responsables de ces maladies en recourant à un diagnostic biologique spécifique (sérologique ou moléculaire). Ces diagnostics biologiques requièrent des équipements de qualité et un personnel formé, ce qui n'est pas toujours le cas dans les pays à faible revenu où, souvent, les équipements manquent dans les laboratoires nationaux. Les pénuries d'eau et le manque d'électricité dans certaines régions ont également un impact considérable sur la qualité des analyses de laboratoire.

Les causes réelles d'ictères fébriles ne sont donc pas documentées et elles sont le plus souvent traitées par le clinicien, faute d'informations, comme des cas de paludisme, le conduisant à une prise en charge thé-

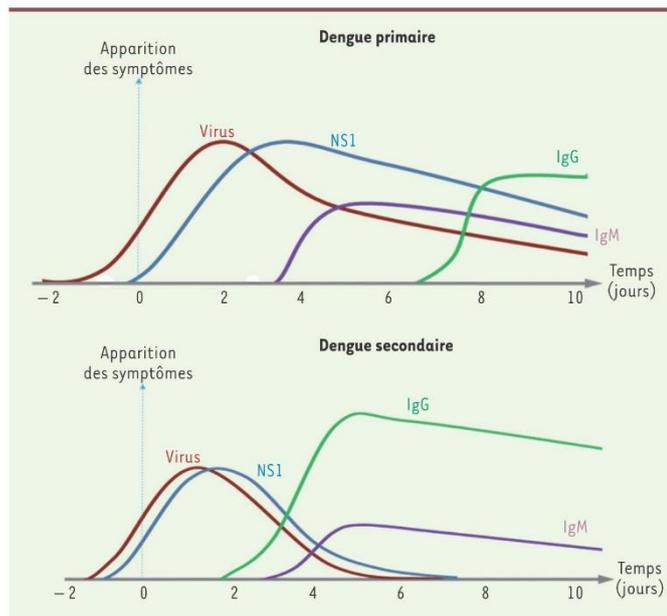


Figure 4. Cinétique de l'apparition des biomarqueurs de la dengue (virus, IgM et IgG spécifiques, protéine non structurale NS1) chez les patients présentant une infection primaire (en haut) et secondaire (en bas).

ce qui n'est pas toujours le cas de nombreux pays à faible revenu comme certains pays d'Afrique de l'Ouest. Bien qu'il existe de nombreux tests commerciaux utilisant la RT-PCR, la plupart sont développés en interne et manquent souvent de standardisation.

De nombreux tests sérologiques commerciaux ou développés par les laboratoires sont disponibles. Cependant, ce type de tests donne des résultats qui sont difficiles à interpréter en Afrique de l'Ouest. En effet, plusieurs Flavivirus circulent dans cette région et des réactions immunitaires croisées, liées à la présence de la protéine d'enveloppe E chez tous ces virus, existent [19].

Ces réactions croisées peuvent donc être à l'origine de résultats faussement positifs et non spécifiques. Il est cependant possible de coupler les tests sérologiques (IgM et IgG) à des tests de capture de l'antigène NS1, pour une meilleure interprétation des résultats [19]. Le test de séroneutralisation, ou test de neutralisation par réduction de plaques, reste une bonne alternative pour remédier au problème des réactions croisées, même si ces tests manquent souvent de standardisation et nécessitent du personnel très bien formé.

Des tests commerciaux de diagnostic rapide de la dengue (*SD Bioline, Abbott®*) ont été homologués par l'OMS. Ils pourraient être utilisés pour orienter les cliniciens dans la prise en charge clinique. Ces tests permettent en effet de détecter la protéine NS1 et les IgM et IgG avec une spécificité de 98 % et une sensibilité de 92 %. Cependant, ces tests ne sont pas toujours accessibles dans les pays à ressources limitées.

Ces dernières décennies, de nombreux efforts ont été consentis par l'OMS afin d'améliorer la surveillance et le contrôle de la dengue par la mise à disposition de nouvelles stratégies et de nouveaux outils pour les acteurs de la santé de différents pays [12]. En Afrique de l'Ouest, certains pays ont mis en place des laboratoires nationaux de référence pour la surveillance et le diagnostic des arbovirus, tels que la dengue. C'est le

rapport erroné qui peut avoir des conséquences importantes sur l'évolution de l'état de santé des patients [7].

Différentes approches permettent le diagnostic biologique de la dengue : isolement du virus, après culture *ex vivo* sur cellules ; détection directe de l'ARN génomique viral par RT-PCR (transcription inverse suivie de réaction en chaîne par polymérase) à partir du sang du patient ; détection de la protéine NS1 virale sécrétée dans le sang, par *enzyme-linked immunoassay* (ELISA) (tests immuno-enzymatiques de capture d'antigène) ; évaluation de la réponse immunitaire de l'hôte par la mesure des taux sanguins d'IgM (immunoglobulines d'isotype M) et d'IgG spécifiques du virus [19]. La RT-PCR et l'ELISA ont progressivement remplacé l'isolement du virus, qui était la méthode de diagnostic traditionnelle pour détecter une infection par la dengue [19]. L'algorithme utilisé pour le diagnostic est fondé sur la cinétique des marqueurs d'infection (Figure 4). Au cours d'une infection primaire, le virus et sa protéine NS1 peuvent être détectés très tôt au début de la maladie. Les IgM spécifiques apparaissent autour du troisième jour de la maladie et les IgG vers la fin de la période aiguë, c'est-à-dire environ sept jours après les premiers signes cliniques. Lors d'une infection secondaire, ce sont les IgG qui apparaissent au début de la phase aiguë de la maladie. La détection de NS1 et celle du virus dans le sang sont également plus précoces [19].

La technique de RT-PCR permet la détection de l'ARN viral dès le début de la maladie avec une bonne spécificité et une bonne sensibilité. Cette technique est rapide, facile à réaliser et moins coûteuse que les méthodes d'isolement viral et de culture cellulaire [19]. Cependant, elle nécessite un équipement spécial avec du personnel formé,

cas du Burkina Faso, avec la création, en 2017, du laboratoire national de référence des fièvres hémorragiques virales qui a en charge la surveillance des arboviroses par site sentinelle, et le diagnostic de la dengue, des ictères fébriles et des autres maladies apparentées.

Traitement et prévention

Il n'existe à ce jour aucun traitement curatif contre la dengue ; le traitement disponible est en effet uniquement symptomatique. En plus du repos, les patients doivent s'hydrater régulièrement pour lutter contre la déshydratation en cas de diarrhées et de vomissements et, en cas de fièvre, des analgésiques et des antipyrétiques sont prescrits. L'aspirine est à éviter, pouvant augmenter les risques d'hémorragie par altération de la fonction plaquettaire [35].

Le meilleur moyen de lutte contre la dengue demeure ainsi la prévention. Celle-ci repose sur la lutte contre les vecteurs (moustiques) et sur le développement d'un vaccin. Depuis 2016, *Sanofi Pasteur* développe un vaccin appelé *Dengvaxia*®. Mais celui-ci a montré de nombreuses limites, notamment une efficacité moindre chez les personnes n'ayant jamais été infectées par rapport à celles ayant déjà fait une primo-infection, ainsi qu'une augmentation de survenue de dengue sévère chez les jeunes enfants. Ce vaccin augmenterait également le risque de survenue d'une dengue sévère chez des sujets vaccinés et n'ayant jamais été en contact avec le virus [36], sans doute en raison du mécanisme d'ADE dû à la réponse immunitaire induite par la vaccination. Ce vaccin n'est ainsi indiqué que pour les personnes vivant dans des zones d'endémie et ayant un antécédent prouvé d'infection. D'autres candidats vaccins sont en cours d'évaluation [12]. La lutte anti-vectorielle et la protection individuelle restent donc actuellement les meilleurs moyens de prévention pour réduire la propagation du virus. La lutte anti-vectorielle repose sur la destruction des gîtes larvaires et la pulvérisation d'insecticides dans les domiciles. Mais cela nécessite d'impliquer les communautés villageoises et citadines avec des campagnes de sensibilisation. Un tel engagement communautaire a montré son efficacité en Amérique centrale et en Amérique du Sud avec la réduction de la transmission de la dengue, ce qui n'est pas le cas en Afrique [37]. Il est nécessaire que les gouvernements mettent en place des stratégies de surveillance entomologique et de lutte anti-vectorielle et organisent des campagnes de sensibilisation des populations afin de les impliquer davantage dans la lutte contre la prolifération des vecteurs. Une étude réalisée au Burkina Faso rapporte que plus de 95 % des ménages approuvaient les interventions proposées par le gouvernement dans la prévention contre la dengue lors des épidémies de 2016 et 2017 et seraient disposés à s'y investir [37]. Ces interventions concernaient la sensibilisation des ménages sur la transmission de la dengue, l'identification et l'élimination des gîtes de reproduction des moustiques et l'utilisation d'insecticides non dangereux pour la santé dans les domiciles [37]. En Afrique de l'Ouest, la lutte anti-vectorielle reste difficile en raison de son coût élevé, et du fait que la dengue n'est pas toujours une priorité dans la majorité des pays endémiques.

Conclusion

La dengue est devenue aujourd'hui la maladie arbovirale la plus répandue dans le monde. Même si, dans la majorité des cas, l'infection est bénigne, elle présente parfois des manifestations cliniques, allant d'une simple fièvre à des formes graves pouvant entraîner le décès du patient. En Afrique de l'Ouest, les cas de dengue sont sous-évalués et la maladie est souvent confondue avec le paludisme, comme c'est le cas de plusieurs autres infections fébriles. Il est donc nécessaire de mettre en place des systèmes de surveillance des infections fébriles d'origine inconnue en Afrique en renforçant les capacités diagnostiques des laboratoires nationaux. Des études de séroprévalence en population générale pourraient également permettre de cartographier plus précisément la circulation de la dengue dans ces régions afin de prévenir sa dissémination. ♦

SUMMARY

Dengue virus circulation in West Africa: An emerging public health issue

Dengue is the most widespread arbovirolosis in the world, with approximately 390 million cases per year, 96 millions of which have clinical manifestations and 25,000 deaths. In West Africa, the circulation of this virus in human populations was first reported in the 1960s in Nigeria. Clinical diagnosis of dengue in West Africa is made difficult by the existence of other diseases with similar clinical presentations, thus, biological diagnosis remains the only alternative. This biological diagnosis requires high quality equipment and well-trained personnel, which are not always available in resource-limited countries. Thus, many cases of dengue fever are consistently reported as malaria, leading to mismanagement, which can have serious consequences on the health status of patients. It is therefore necessary to set up surveillance systems for febrile infections of unknown origin in Africa by strengthening the diagnostic capacities of national laboratories. ♦

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. Manu SK, Bonney JHK, Pratt D, et al. Arbovirus circulation among febrile patients at the greater Accra Regional Hospital, Ghana. *BMC Res Notes* 2019 ; 12.
2. Beltrán-Silva SL, Chacón-Hernández SS, Moreno-Palacios E, et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica del Hospital General de México* 2018 ; 81 : 146-53.
3. Gubler DJ. *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever*. CABI Publishing, 1998, 496 p.

RÉFÉRENCES

4. Guzman MG, Gubler DJ, Izaquierdo A, et al. Dengue infection. *Nat Rev Dis Primers* 2016 ; 2 : 1-25.
5. Moore DL, Causey OR, Carey DE, et al. Arthropod-borne viral infections of man in nigeria, 1964-1970. *Ann Trop Med Parasitol* 1975 ; 69 : 49-64.
6. Amarasinghe A, Kuritsky JN, William Letson G, et al. Dengue virus infection in Africa. *Emerg Infect Dis* 2011 ; 17 : 1349-54.
7. Stoler J, Dashti R al, Anto F, et al. Deconstructing "malaria": West Africa as the next front for dengue fever surveillance and control. *Acta Trop* 2014 ; 134 : 58-65.
8. Perera R, Kuhn RJ. Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol* 2008 ; 11 : 369-77.
9. Libraty DH, Young PR, Pickering D, et al. High Circulating Levels of the Dengue Virus Nonstructural Protein NS1 Early in Dengue Illness Correlate with the Development of Dengue Hemorrhagic Fever. *J Infect Dis* 2002 ; 186 : 1165-8.
10. Diamond MS, Pierson TC. Molecular Insight into Dengue Virus Pathogenesis and Its Implications for Disease Control. *Cell* 2015 ; 162 : 488-92.
11. Hanley KA, Monath TP, Weaver SC, et al. Fever versus fever: The role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infect Genet Evol* 2013 ; 19 : 292-311.
12. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, et al. Dengue: A continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* 2010 ; 8 : S7-S16.
13. Wilder-Smith A, Chen LH, Massad E, et al. Threat of dengue to blood safety in dengue-endemic countries. *Emerg Infect Dis* 2009 ; 15 : 8-11.
14. Chen LH, Wilson ME. Transmission of dengue virus without a mosquito vector: nosocomial mucocutaneous transmission and other routes of transmission. *Clin Infect Dis* 2004 ; 39 : e56-e60.
15. Basurko C, Matheus S, Hildéral H, et al. Estimating the risk of vertical transmission of dengue: A prospective study. *Am J Trop Med Hyg* 2018 ; 98 : 1826-32.
16. Perre P Van de, Molès JP, Nagot N, et al. Revisiting Koch's postulate to determine the plausibility of viral transmission by human milk. *Pediatr Allergy Immunol* 2021 ; 00 : pii.13473.
17. Siler JF, Hall MM, Hitchens AP. Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity, and Prevention. *Philipp J Sci* 1926 ; 29 .
18. Balmaseda A, Hammond SN, Pérez L, et al. Serotype-specific differences in clinical manifestations of dengue. *Am J Trop Med Hyg* 2006 ; 74 : 449-56.
19. Muller DA, Depenseire ACI, Young PR. Clinical and laboratory diagnosis of dengue virus infection. *J Infect Dis* 2017 ; 215 : S89-S95.
20. Mangada MM, Rothman AL. Altered Cytokine Responses of Dengue-Specific CD4 + T Cells to Heterologous Serotypes. *J Immunol* 2005 ; 175 : 2676-83.
21. Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu XN, et al. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 2003 ; 9 : 921-7.
22. Katzelnick LC, Narvaez C, Arguello S, et al. Zika virus infection enhances future risk of severe dengue disease. *Science* 2020 ; 369 : 1123-8.
23. Sierra BDL, Kourí G, Guzmán MG. Race: A risk factor for dengue hemorrhagic fever. *Arch Virol* 2007 ; 152 : 533-42.
24. Puccioni-Sohler M, Orsini M, Soares CN. Dengue: A new challenge. *Neural Int* 2012 ; 4 : 65-70.
25. Chaturvedi UC, Dhawan R, Khanna M, et al. Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice. *J Gen Virol* 1991 ; 72 : 859-66.
26. Whitehorn J, Farrar J. Dengue. *Br Med Bull* 2010 ; 95 : 161-73.
27. Franco L, Caro A di, Carletti F, et al. Recent expansion of dengue virus serotype 3 in West Africa. *Eurosurveillance* 2010 ; 15 : 1-4.
28. Murray NEA, Quam MB, Wilder-Smith A. Epidemiology of dengue: Past, present and future prospects. *Clin Epidemiol* 2013 ; 5 : 299-309.
29. World Health Organization. *Report of the Scientific Working Group meeting on Dengue, Geneva, 1-5 October 2006*. 2006.
30. Ridde V, Agier I, Bonnet E, et al. Presence of three dengue serotypes in Ouagadougou (Burkina Faso): Research and public health implications. *Infect Dis Poverty* 2016 ; 5 : 23.
31. Ninove L, Parola P, Baronti C, et al. Dengue virus type 3 infection in traveler returning from West Africa. *Emerg Infect Dis* 2009 ; 15 : 1871-2.
32. Phourides EK, Coulibaly MB, George CM, et al. Dengue virus seroprevalence among febrile patients in Bamako, Mali: Results of a 2006 surveillance study. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2011 ; 11 : 1479-85.
33. Eldin C, Gautret P, Nougairède A, et al. Identification of dengue type 2 virus in febrile travellers returning from Burkina Faso to France, related to an ongoing outbreak, October to November 2016. *Eurosurveillance* 2016 ; 21 .
34. Gulati S, Maheshwari A. Dengue fever-like illnesses: How different are they from each other? *Scand J Infect Dis* 2012 ; 44 : 522-30.
35. Tuiskunen Bäck A, Lundkvist Å. Dengue viruses – an overview. *Infect Ecol Epidemiol* 2013 ; 3 : 19839.
36. Sridhar S, Luedtke A, Langevin E, et al. Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N Engl J Med* 2018 ; 379 : 327-40.
37. Ouédraogo S, Degroote S, Barro SA, et al. Recurrence of dengue epidemics in Burkina Faso: Community preference for an intervention to prevent the disease. *Revue d'Epidémiologie et de Santé Publique* 2019 ; 67 : 375-82.
38. Lim JK, Seydou Y, Carabali M, et al. Clinical and epidemiologic characteristics associated with dengue during and outside the 2016 outbreak identified in health facility-based surveillance in Ouagadougou, Burkina Faso. *PLoS Negl Trop Dis* 2019 ; 13 : e0007882.
39. Onoja AB, Adeniji JA, Olaleye OD. High rate of unrecognized dengue virus infection in parts of the rainforest region of Nigeria. *Acta Trop* 2016 ; 160 : 39-43.
40. Fagbami AH, Onoja AB. Dengue haemorrhagic fever: An emerging disease in Nigeria, West Africa. *J Infect Public Health* 2018 ; 11 : 757-62.

TIRÉS À PART
B. Tinto

REVUES



SYNTHÈSE



Spreading of SARS-CoV-2 in West Africa and assessment of risk factors

B. Tinto¹ , S. Salinas², A. Dicko³, T. S. Kagone¹, I. Traore¹, N. de Rekeneire^{4,5}, B. W. Bicaba⁶, H. Hien⁷, N. Meda⁸, P. van de Perre², D. Kania^{1,*} and Y. Simonin^{2,*} 

Review

*Equally contributed to this paper.

Cite this article: Tinto B *et al* (2020). Spreading of SARS-CoV-2 in West Africa and assessment of risk factors. *Epidemiology and Infection* **148**, e213, 1–9. <https://doi.org/10.1017/S0950268820002149>

Received: 4 May 2020
Revised: 21 August 2020
Accepted: 28 August 2020

Key words: COVID-19; risk factor; SARS-CoV-2; spreading; West Africa

Author for correspondence: B. Tinto, E-mail: tintobachirou@yahoo.fr

¹Laboratoire National de Référence des Fièvres Hémorragiques Virales, Centre MURAZ, Institut National de Santé Publique (INSP), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso; ²Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier, INSERM, EFS, Montpellier, France; ³Laboratoire Central de Référence, INSP, Ouagadougou, Burkina Faso; ⁴Centre Muraz, INSP, Bobo-Dioulasso, Burkina Faso; ⁵Expertise France, Paris, France; ⁶Centre des Opérations de Réponse aux Urgences Sanitaires (CORUS), INSP, Ouagadougou, Burkina Faso; ⁷INSP, Ouagadougou, Burkina Faso and ⁸UFR/SDS, Université Ouaga I Professeur Joseph KI-ZERBO, Ouagadougou, Burkina Faso

Abstract

Although the African continent is, for the moment, less impacted than the rest of the world, it still faces the risk of a spread of COVID-19. In this study, we have conducted a systematic review of the information available in the literature in order to provide an overview of the epidemiological and clinical features of COVID-19 pandemic in West Africa and of the impact of risk factors such as comorbidities, climatic conditions and demography on the pandemic. Burkina Faso is used as a case study to better describe the situation in West Africa. The epidemiological situation of COVID-19 in West Africa is marked by a continuous increase in the numbers of confirmed cases. This geographic area had on 29 July 2020, 131 049 confirmed cases by polymerase chain reaction, 88 305 recoveries and 2102 deaths. Several factors may influence the SARS-CoV-2 circulation in Africa: (i) comorbidities: diabetes mellitus and high blood pressure could lead to an increase in the number of severe cases of SARS-CoV-2; (ii) climatic factors: the high temperatures could be a factor contributing to slow the spread of the virus and (iii) demography: the West Africa population is very young and this could be a factor limiting the occurrence of severe forms of SARS-CoV-2 infection. Although the spread of the SARS-CoV-2 epidemic in West Africa is relatively slow compared to European countries, vigilance must remain. Difficulties in access to diagnostic tests, lack of hospital equipment, but also the large number of people working in the informal sector (such as trading, businesses, transport and restoration) makes it difficult to apply preventive measures, namely physical distancing and containment.

Introduction

On 31 December 2019, the city of Wuhan (Hubei Province, China), reported the emergence of an atypical pneumonia caused by a new coronavirus, later known as SARS-CoV-2 [1, 2]. Coronaviruses are a large family of RNA viruses that can cause a wide variety of diseases in animals and humans, from the common cold to SARS (Severe Acute Respiratory Syndrome), [3]. Coronaviruses are divided into four genera according to phylogeny: alpha-CoV, beta-CoV, gamma-CoV and delta-CoV [4]. Human coronaviruses (HCoV) were first described in the 1960s in patients with cold [4]. Since then, six HCoVs have been discovered: 229E, OC43, NL63, HKU1, SARS-CoV-1 and MERS-CoV [4, 5]. Similar to SARS-CoV-1 and MERS-CoV, SARS-CoV-2 belongs to the genus beta-CoV (beta-coronavirus) [6]. On 7 January, Chinese researchers isolated the new SARS-CoV-2 from patients with pneumonia. From 13 January, the epidemic began to spread outside of China [7] and on 30 January 2020, the World Health Organization (WHO) Director-General declared the COVID-19 epidemic a public health emergency of international concern [8]. As of 29 July 2020, WHO has reported 16 558 289 confirmed cases and 656 093 deaths worldwide [9]. On 14 February 2020, the first case of COVID-19 on the African continent was registered in Egypt [10]. Since then, the disease has spread to several other African countries. In sub-Saharan Africa, Nigeria was the first country to report a case of COVID-19 on 27 February 2020 [11]. Nowadays, all the countries of the sub-Saharan zone have been affected by the pandemic. As of 29 July 2020, Nigeria is the most affected country by the coronavirus pandemic in West Africa followed by Ghana [12]. Previous studies have shown the circulation of MERS-CoV in camels in some West African countries (Nigeria, Burkina Faso and Mali) [13, 14]. However, no case of HCoV has been reported until the appearance of SARS-CoV-2. Although the African continent is, for the moment, less impacted than the rest of the world, it still faces the risk of a spread of COVID-19. Even though most African

© The Author(s), 2020. Published by Cambridge University Press. This is an Open Access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution licence (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

CAMBRIDGE
UNIVERSITY PRESS

countries repeatedly face epidemics and health crises which allowed them to learn from past outbreaks, many gaps remain in the patient care systems of many countries. The WHO therefore 'fears Africa may not be able to face this pandemic, and calls on states to make their arrangements timely' [15]. The transmission and spread of viruses can be influenced by a number of factors, including climatic conditions (such as temperature and humidity), population density and the quality of medical care [16, 17]. In this study we have conducted a systematic review of the information available in the literature in order to provide an overview of the epidemiological and clinical features of COVID-19 pandemic in West Africa and the impact of risk factors such as comorbidities, climatic conditions and demography on the pandemic. We focused our attention on Burkina Faso as it is one of the countries of West Africa with the most data available. Otherwise the way of life, the demography and the climate are comparable to most countries in West Africa.

Methods

We conducted reviews for a broad range of public health topics related to SARS-CoV-2 focusing on the epidemiology, clinical manifestations and mode of transmission, factors that may influence the circulation of the virus. Initially, we conducted a systematic literature search of electronic databases (PubMed, ScienceDirect, Google Scholar and EMBASE) and pre-print servers (medRxiv and bioRxiv). In addition to the articles, we also searched data from WHO, some international organisations and SitReps on COVID-19. Then we used all this information to describe the situation in West Africa based on demographics, lifestyles, climate, chronic diseases and availability of resources. The research was conducted from March to July 2020. A total of 531 articles were reviewed and all articles that were deemed irrelevant to our review were excluded. These exclusion criteria mainly concerned the geographic location of the study, the epidemiological aspects addressed and the language of publication. The selection was made in three stages: a first stage of selection based on titles, then based on summaries and finally one based on full text. Thus, 40 articles were selected for this review. We have combined the search terms 'SARS CoV-2 and climatic factors', OR 'SARS CoV-2 and chronic diseases', OR 'SARS CoV-2 and West Africa' OR 'SARS CoV-2 and Africa'. We used data from the COVID-19 Dashboard, a dataset hosted by the Center for Systems Science and Engineering at Johns Hopkins University to plot Figures 1a, b, 2a and b [18]. Figure 3 and Table 1 were plotted using SitRep 115 data on COVID in Burkina Faso. Figure 1a and b were generated by datavrapper, and Figures 2a, b and 3 were generated by Excel 2013.

Clinical manifestations and mode of disease transmission

Transmission of coronavirus disease occurs mainly through the inhalation of infectious droplets and aerosols [19] and the incubation period is approximately 3–14 days. The clinical picture of SARS-CoV-2 infection is wide. It can range from an asymptomatic infection to a mild upper respiratory infection or even severe viral pneumonia that can lead to death [20, 21]. Seniors are most likely to develop severe forms [22]. Other non-specific symptoms have been reported, such as fever, cough, myalgia, dermatological damage, dyspnoea with or without diarrhoea and neurological manifestations such as hypogeusia and hyposmia were described

[21, 23]. A hyperinflammatory phenomenon called 'cytokine storm' is thought to be involved in the occurrence of severe forms [24]. Cytokines are small proteins naturally produced by immune cells to promote anti-inflammatory reaction in order to protect the body from infection [25]. During SARS-CoV-2 infection, there is an excess production of cytokine causing a hyperinflammatory reaction that can lead to death by cytokine shock [24]. All patients should be quarantined and mechanical ventilation in the intensive care unit is mandatory for the management of severe cases. Secondary bacterial infections can also occur, which can lead to pneumonia [26]. There is little data on the clinical manifestations of COVID-19 in West Africa. However, according to a study of 32 COVID-19 patients in Nigeria, no patient presented to hospital under critical conditions. In total, 75% were in moderately severe condition while 16% were asymptomatic. The most common symptoms were fever (59%) and dry cough (44%). Anosmia (loss of smell) and ageusia (loss of taste) were present in 19% of patients [27].

Epidemiological situation of SARS-CoV-2 in West Africa

The epidemiological situation of SARS-CoV-2 disease in West Africa is marked by a continuous increase in the numbers of confirmed cases with rather disparate situations (Fig. 1a and b) [28]. After a first case notified on 27 February 2020 in Nigeria, West Africa, had on 29 July 2020, 131 049 cases confirmed by polymerase chain reaction (PCR), 88 305 recoveries and 2102 deaths [12]. Nigeria is the most affected country in terms of registered death with 41 804 confirmed cases and 868 deaths followed by Ghana (34 406 confirmed cases and 168 deaths) and Cote d'Ivoire (15 713 confirmed cases and 98 deaths). Among the least affected countries we can cite Gambia (326 confirmed cases and 8 deaths), Togo (896 confirmed cases and 18 deaths) and Chad (926 confirmed cases and 75 deaths) (Fig. 2a and b) [12]. If we analyse in more detail the situation in Burkina Faso, the first two cases were highlighted on 9 March 2020: a couple returning from France, precisely in the city of Mulhouse, where they participated in an evangelist event gathering several tens of thousands of people from 17 to 24 February 2020 and which constitutes the main cluster of COVID-19 in France. In this country young people under 15 are the least affected with only 14 confirmed cases (Fig. 3). Table 1 shows the death rate of SARS-CoV-2 by age group in Burkina Faso as of 21 June 2020. If we take the case of Nigeria, the most affected country in West Africa, a study described that 94% of patients had a recent travel history or contact with a confirmed case and 53% of patients were over 40 years old [27]. Another study reported a case fatality rate from COVID-19 of 2.8%. Lagos State was the most affected with more than 50% of positive cases. In a survey conducted among the population, only 29.0% would agree to be vaccinated if a vaccine against COVID-19 was available [29, 30].

In West Africa the number of confirmed cases is probably largely underestimated, given the limited means of diagnosis in some countries [31]. The diagnosis is based on reverse-transcription (RT)-PCR using a nasopharyngeal swab. Two genes are targeted for the detection of SARS-CoV-2 RNA: the ORF1 gene and the N gene [32]. However, there's approximately a false negative rate of 20% [33].

The low population density in West African countries could probably limit the spread of COVID-19. Indeed, with the exception of Nigeria (220 people/km²), the population density of West African countries is relatively low (Burkina Faso: 72 people/km²,

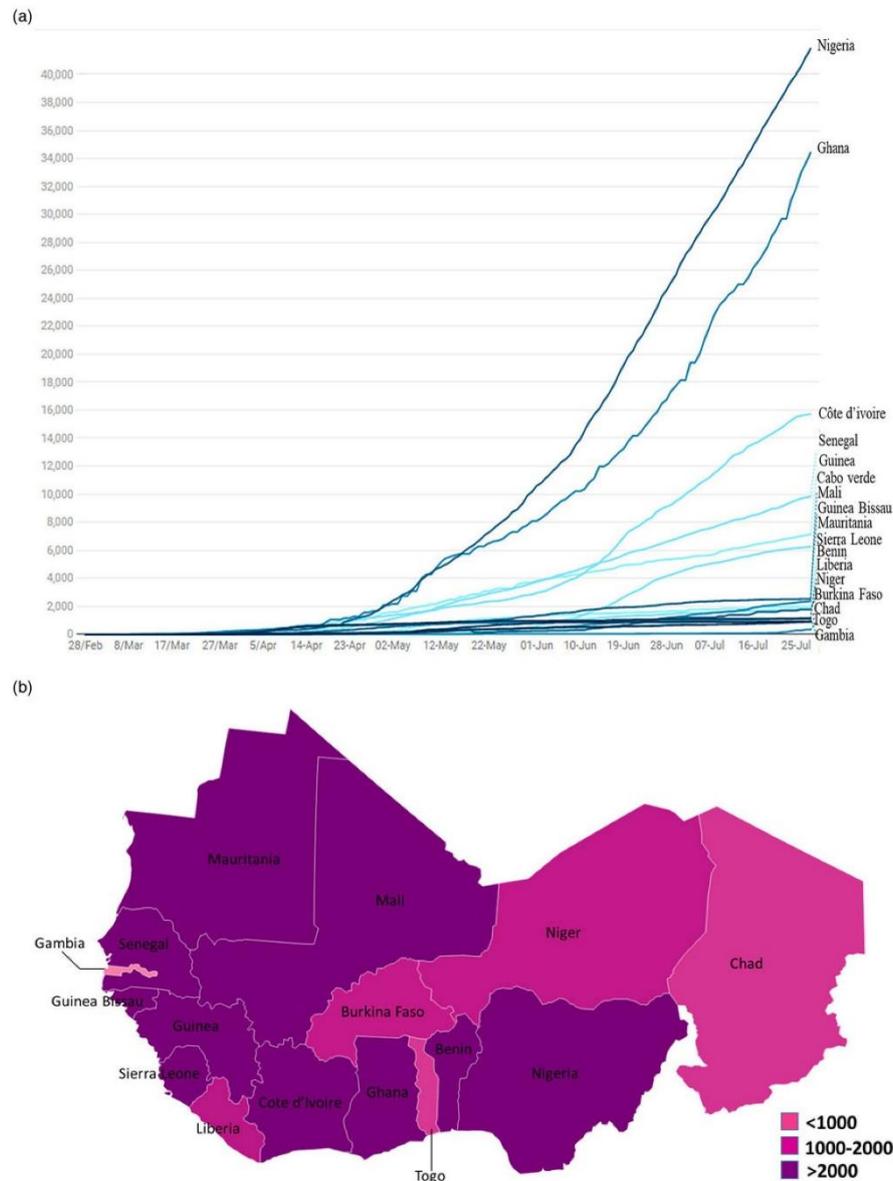


Fig. 1. (a) Evolution of confirmed cases per day of the SARS-CoV-2 disease in West Africa from 28 February to 29 July 2020. (b) Mapping of the West Africa countries affected by SARS-CoV-2 as of 29 July 2020.

Niger: 16 people/km², Mali: 15 people/km²) compared to European countries (France: 105 people/km², Italy: 207 people/km², United Kingdom: 267 people/km²) and Asian countries (China: 144 people/km², Republic of Korea: 516 people/km²,

Hong Kong: 6510 people/km²) [34–36]. Nevertheless, the presence of large urban areas and highly populated capital is a factor favouring the spread of the disease. This is, for example, the case of Lagos in Nigeria with around 6871 people/km² [37].

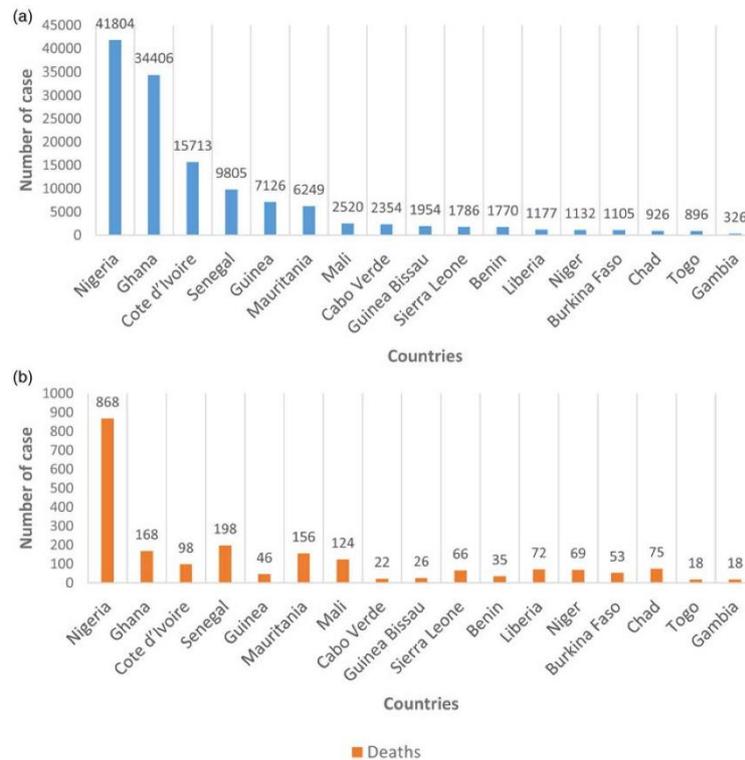


Fig. 2. (a) Geographical distribution of confirmed cases of the SARS-CoV-2 disease in West Africa as 29 July 2020. (b) Geographical distribution of cumulative number of deaths of the SARS-CoV-2 disease in West Africa as 29 July 2020.

Preventive measures against SARS-CoV-2

The WHO encourages countries to carry out widespread testing, to apply social distancing and to respect barrier measures [38]. Also, the experiences of China and South Korea teach us that rapid and systematic detection of suspected cases, the wearing of masks, as well as studied containment and compliance with barrier rules (hand washing and social distancing) could help to significantly reduce the spread of the disease [39, 40].

In West Africa majority of governments have quickly taken a number of measures to limit the spread of the disease. Among these measures we can cite: (i) border closure; (ii) quarantine and self-containment of contacts of cases; (iii) dissemination of prevention messages calling on the population to wear a mask, to comply with barrier measures and social distancing; (iv) introduction of a curfew in certain countries (Burkina Faso, Cote d'Ivoire, Mali, Senegal, Niger and Guinea) and (v) closure of markets and places of worship.

However, the population struggles to comply with certain measures such as the closing of shops and the travel limitations. In fact, 92.4% of people active in West Africa work in the informal sector as trading and businesses, transport and restoration. These jobs are not subject to any national legislation and are not subject to any social protection [41]. All these people are forced to go to work every day in order to support their families

and in the absence of robust economic packages to help them to stay at home physical distancing measures are doomed to failure. Otherwise million people in West Africa lack access to clean water and communal water and sanitation facilities are not always accessible which makes certain hygiene measures recommended to fight against the SARS-CoV-2 epidemic difficult. For example, 63% of people in urban areas, or 258 million people, lack access to handwashing [42]. According to UNICEF data from 2017, the majority of people did not have basic handwashing facilities available at home. Only Ghana, Mali, Mauritania and Nigeria were above the global average of 60% of people with access to basic facilities. The situation was particularly bad in small countries such as Benin, Gambia, Guinea-Bissau, Liberia and Togo where at least three-quarters of the population had no handwashing facility at home [43]. Quality masks are not always accessible to the population. Some countries (Senegal, Nigeria and Mali) have invested in the production and local distribution of masks [44]. However, the quality of these masks is often lacking. For example, in Benin buying a quality mask in pharmacies subsidised at 30 cents is still too expensive for some people. People then flock to masks sold on the street at half price, with a single layer of fabric and without any filter [45]. The average size of households in certain West Africa countries is estimated at 7.2 members per household which mean that several family

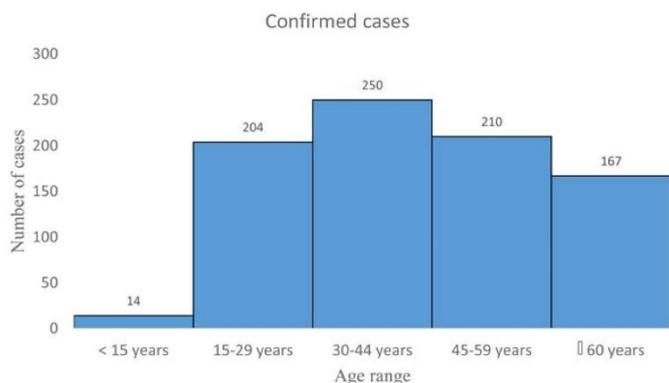


Fig. 3. Distribution by age group of COVID-19 cases in Burkina Faso from 9 March to 21 June 2020 ($N=845$). Source: Ministère de la santé Burkina Faso, Sitrep 115. https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/documents/files/sitrep_covid-19_ndeg_115.pdf.

Table 1. Mortality rate of SARS CoV-2 by age group in Burkina Faso as of 21 June 2020 ($n=907$)

Age range	Number of deaths (% relative to the total number)	Case-fatality rate (%)
<15	0	0
15-29	3 (5.7)	0.3
30-44	4 (7.5)	0.4
44-59	13 (24.5)	1.4
≥60	33 (62.3)	3.6
Total	53 (100)	5.7

Source: Ministère de la santé Burkina Faso, Sitrep 115. https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/documents/files/sitrep_covid-19_ndeg_115.pdf.

generations live and interact under the same roof (concession) [46]. This makes it difficult to comply with self-containment and distancing measures. The difficulty in applying all these preventive measures could be a factor favouring the spread of the virus in these countries.

Case management

The health situation in West African countries is difficult, in particular due to the extremely poor access of populations to health services. This weakness was exposed by the 2014/2015 Ebola virus epidemic in West Africa. This epidemic has revealed significant gaps in the capacity and preparedness to respond effectively to critical health events in affected countries [47]. In a country like Burkina Faso we have six university hospitals for around 20 244 079 inhabitants and one doctor for 12 000 inhabitants [48]. The management of patients with severe forms of COVID-19 requires resuscitation beds and respirators. Most African countries do not have enough of these essential care materials. It is difficult to obtain exact numbers for all countries but some are nevertheless available. For instance, there are only 15 resuscitation beds in Burkina Faso, 40 in Mali and 80 in Senegal. There are only 4 respirators in Togo, 5 in Niger, 11 in Burkina Faso, 20 in Côte d'Ivoire, 56 in Mali, 80 in Senegal and around 400 in Nigeria [49]. The hospital's capacity could quickly be exceeded. So, it is

therefore necessary to anticipate the equipment of hospitals for the management of cases. Certain non-specific symptoms of SARS-CoV-2 such as fever and headache resemble that of malaria, hence the need for a differential diagnosis with malaria so as not to miss certain cases of SARS-CoV-2.

Problematic of the management of asymptomatic cases

In the strategy implemented to limit the spread of SARS-CoV-2, there is the quarantine of contacts of cases. All people who have been in contact with a confirmed case are quarantined and followed up for 2 weeks. During these 2 weeks, everyone who develops symptoms is tested and managed; and anyone who does not show symptoms after 2 weeks is released from quarantine without being tested as is the case of Burkina Faso. Among these asymptomatic people out of quarantine, there could be asymptomatic carriers of the disease. The literature reports that people with asymptomatic forms of the disease can infect others and this transmission is estimated to be approximately 10% of transmission events [50]. This capacity for transmission of SARS-CoV-2 by asymptomatic carriers could thus increase the risks of spread of the disease in the population. It should therefore be wise to test all contacts of cases without exception after quarantine but this need is faced with the limitation of diagnostic tests available. For example at the beginning of the epidemic, there was only one laboratory (National Influenza Reference Laboratory) for confirmation of the cases for all the Burkina Faso, located in Bobo-Dioulasso, the second city in the country, located 365 km from the capital. Today, four other laboratories have been equipped in Ouagadougou and Bobo-Dioulasso to carry out diagnostic tests, thereby improving diagnostic capacities.

SARS-CoV-2 and co-morbidities

Several studies in China and Italy tend to confirm that co-morbidities increase the risk of developing serious or even fatal forms of SARS-CoV-2 infection [51–53]. A study on 1099 patients with COVID-19 in China, reported that 173 patients suffering from severe forms had the following comorbidities: high blood pressure (23.7%), diabetes mellitus (16.2%), coronary heart disease (5.8%) and cerebrovascular disease (2.3%) [52].

In West Africa, the most common chronic diseases encountered in the population are diabetes mellitus and high blood pressure [54].

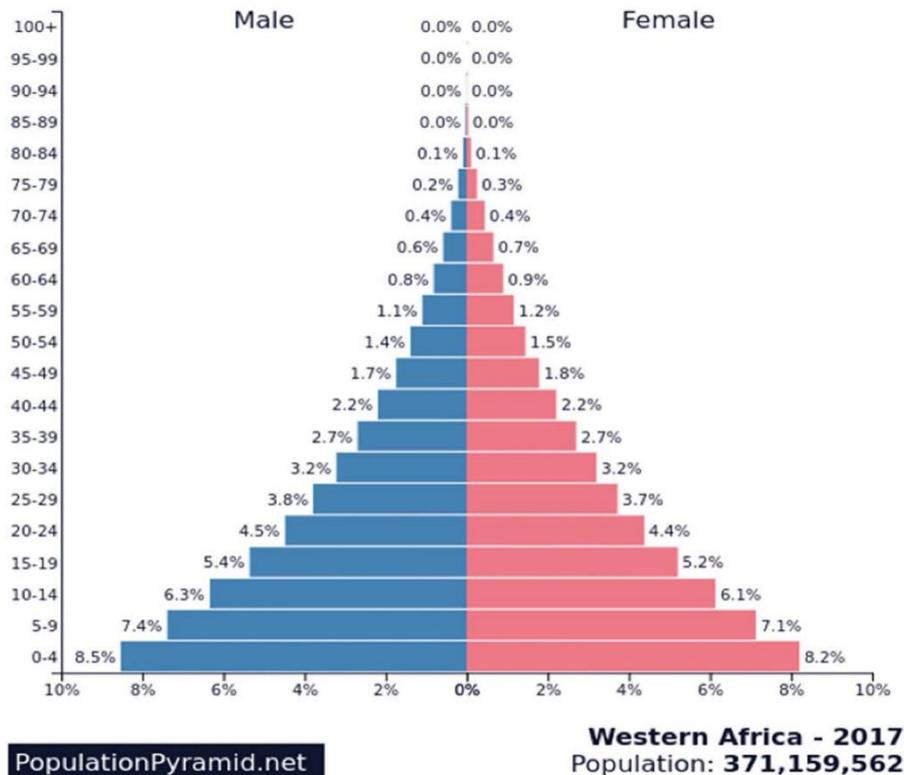


Fig. 4. Pyramid of age, West Africa's population. Source: PopulationPyramid.net. <https://www.populationpyramid.net/western-africa/2017/>.

Diabetes mellitus

Diabetes mellitus is a public health problem in sub-Saharan Africa. According to the WHO estimates, there will be a significant increase in the prevalence of diabetes in developing countries by 2025, which is expected to house 75% of the world's diabetic patients. In sub-Saharan Africa, the number of adults over the age of 20 with a body mass index greater than 25 kg/m² increased from 28 million in 1980 to 127 million in 2015 [55, 56]. During this same period, the prevalence of diabetes mellitus increased considerably in Africa (3.1% in 1980 to 7.1% in 2014) which is higher than that in many European countries [55]. Although there are few data on the prevalence of diabetes in West Africa, these data indicate that it is an important problem to take into account regarding the SARS-CoV-2 pandemic, the rate being 3% in Benin; in 6% Mauritania, 5% in Ivory Coast and 4.2% in Burkina Faso [57–59].

High blood pressure

High blood pressure is defined as a systolic pressure of 140 mmHg or more or a diastolic pressure of 90 mmHg or more [60]. The prevalence of high blood pressure is increasing in sub-Saharan Africa, and has become similar to that seen in high-income African countries [61, 62]. This prevalence varies between 16%

and 40% among adults aged 18 and over; and exceeds 60% in people aged 65 and over in some studies [63, 64]. There are high proportions of people with high blood pressure who are unaware of their status (>70%), poor medication compliance (>80%) or of hypertensive patients who are not controlled under treatment (30–80%) [63].

The two co-morbidities mentioned above could lead to an increase in the number of severe cases of SARS-CoV-2 in West African during this pandemic. Also, many people in sub-Saharan Africa live with chronic pathologies without knowing it either through ignorance of the symptomatology or through lack of regular health check-ups. It would therefore be appropriate to strengthen the monitoring of people living with chronic pathologies during this period of SARS-CoV-2 pandemic.

SARS-CoV-2 and people living with HIV

There has not yet been any scientific evidence that people living with HIV are at higher risk of contracting COVID-19 or developing severe forms of the disease. However, HIV-infected people are at higher risk of cardiovascular and/or metabolic disorders, as a consequence of chronic immune activation and ARV drugs exposure. They are more likely to contract COVID-19 and develop severe forms. With the exception of Niger (0.3%),

Burkina Faso has one of the lowest rates of people living with HIV in the West African sub region (0.7%). Ivory Coast has the highest rate with 2.6% followed by Togo with 2.3%, Ghana with 1.7%, Mali with 1.4% and Benin with 1% [65].

SARS-CoV-2 and climatic factors

SARS-CoV appeared in China in Foshan, Guangdong province, in November 2002, while SARS-CoV-2 appeared in Wuhan, Hubei province in December 2019 [66, 67]. In China, November and December are the coldest months of the year [68]. Low rainfall was also noted in these two regions during both of these periods of SARS outbreaks. Low temperatures generally constitute conditions favouring the circulation of viruses [68]. Cold accompanied by dry winds would be even more favourable to the survival of viruses compared to cold alone. Indeed, under these conditions, viral particles dried in the air, survive for a long time in the circulating air [69–71]. In addition, cold causes a decrease in immunity in humans, notably by reducing blood supply and therefore a decrease in the supply of immune cells to the nasal mucosa [72]. Low humidity would reduce the ability of cell lashes in the airways to remove viral particles [72]. It can also cause drying of the nasal mucus, thus weakening the nasal cavity; which will make the entire upper respiratory tract vulnerable to viral infection [68]. In a study of 100 Chinese cities, Wang *et al.* found that high temperature and high humidity significantly reduced transmission of SARS CoV-2 [73].

With the exception of the Mediterranean and South Africa, most countries on the African continent have a tropical climate. Temperatures, generally high, vary little throughout the year [74]. In the Sahelian zone the hottest season is between April and June and for the Guinean zone, it is between January and March [75]. During hot periods temperatures can reach 45°C in some areas; this is the case in Burkina Faso, Niger and Mali [76–78]. These high heats could be a factor contributing to slow the spread of the SARS-CoV-2 in these countries.

The West African rainfall regime is linked to the seasonal movement of the intertropical convergence zone. The semi-arid zone, which essentially comprises the Sahelian and Sahelo-Saharan strip, is marked by a single rainy season between July and September. Further south, the alternation of two rainy seasons and two dry seasons marks the climate of the countries of the Gulf of Guinea [74]. These periods are also marked by an increase in humidity. The arrival of the rainy season in certain West Africa countries, moreover, will increase the humidity, which combined with heat could further reduce the spread of SARS CoV-2.

SARS-CoV-2 and demography

West Africa's population is predominantly young. Out of a population estimated at 371 159 562 in 2017, over 64% are under the age of 24 (Fig. 4) [79, 80]. The youthfulness of the West Africa's population could be a factor limiting the occurrence of severe forms of SARS-CoV-2 infection. Indeed, the epidemiological situation of COVID-19 infection in China and Italy supports the hypothesis that the age factor plays an important role in the occurrence of severe forms of the disease [22]. The fatality rate higher in Italy than in China could be explained in particular by the fact that the Italian population is one of the oldest in the world with approximately 22% of the population aged 65 and over [81]. This could contribute, in part, to the high case fatality

rate compared to other countries. In the African context, intra-family transmission of SARS-CoV-2 may be linked to the fact that several families and several generations live and interact under the same compound. In addition, the youngest live with the oldest within the extended family unit, making the risk of contamination of the elderly by the young higher.

Conclusion

Although the spread of the SARS-CoV-2 epidemic in West Africa is relatively slow compared to European, North American or Asian countries, vigilance must remain. West Africa has already registered more than 131 049 cases confirmed by PCR with 2102 deaths. This figure, however, falls far short of those recorded by European countries such as France, Spain, UK and Italy. The West African's population way of life and the large number of people working in the informal sector make it difficult to apply preventive measures, namely physical distancing and confinement. In order to be able to effectively combat the spread of the virus, it is essential to develop a strategy based on the protection of people at risk, namely the elderly and people living with chronic diseases. Mass screening targeting mainly people at risk and their entourage would allow early detection of cases and quarantine to breaking the chain of transmission and protecting the more vulnerable ones. A local production of protective masks could also be an alternative to the shortage of masks that the world is currently facing. Experiences from past epidemics (such as Ebola, dengue, yellow fever and Lassa fever) have increased laboratory and surveillance capabilities across the African continent which allows West Africa to be better prepared to face the COVID-19 pandemic. For example, in Burkina Faso, the epidemic of Ebola virus disease has led to the creation of a national reference laboratory for viral haemorrhagic fevers and the training of several health workers in the management of epidemics. It is to be hoped that this epidemic will boost care and detection capacities in the near future.

Data availability. The data that support the findings of this study are openly available in *The Lancet* at [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(20\)30120-1/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(20)30120-1/fulltext) [18]. We also used data from the ministry of health of Burkina Faso available in free access at https://www.humanitarianresponse.info/sites/www.humanitarianresponse.info/files/documents/files/sitrep_covid-19_ndeg_115.pdf.

References

1. Wu F, *et al.* (2020) A new coronavirus associated with human respiratory disease in China. *Nature* **579**, 265–269. doi: 10.1038/s41586-020-2008-3.
2. Zhou P *et al.* (2020) A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature* **579**, 270–273.
3. WHO (2020) OMS, *Infections à coronavirus*. https://www.who.int/csr/disease/coronavirus_infections/fr/ (Accessed 5 April 2020).
4. Su S *et al.* (2016) Epidemiology, genetic recombination, and pathogenesis of coronaviruses. *Trends in Microbiology* **24**(6), 490–502. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.003.
5. Adhikari SP *et al.* (2020) Epidemiology, causes, clinical manifestation and diagnosis, prevention and control of coronavirus disease (COVID-19) during the early outbreak period: a scoping review. *Infectious Diseases of Poverty* **9**, 29. doi: 10.1186/s40249-020-00646-x.
6. Ahmed SF, Quadeer AA and McKay MR (2020) Preliminary identification of potential vaccine targets for the COVID-19 coronavirus (SARS-CoV-2) based on SARS-CoV immunological studies. *Viruses* **12**, 254. doi: 10.3390/v12030254.

7. WHO (2020) *Novel Coronavirus (2019-nCoV) Situation Report-1*, 21 January 2020. WHO Bulletin.
8. PAHO/WHO (2020) Boletín. *Coronavirus Disease (COVID-19) – PAHO/WHO, Pan American Health Organization. Pan American Health Organization*. <https://www.paho.org/en/tag/coronavirus-disease-covid-19?topic=All&d%5Bmin%5D=&d%5Bmax%5D=&page=1> (Accessed 10 April 2020).
9. WHO (2020) *Coronavirus disease (COVID-19) Situation Report-191*.
10. WHO (2020) *Coronavirus disease 2019 (COVID-19) Situation Report-26*.
11. WHO (2020) *#Covid19 Coronavirus Disease 2019 Situation Report-31. DroneEmprnt*.
12. OECD (2020) *Coronavirus-West-Africa – Sahel and West Africa Club Secretariat*. <http://www.oecd.org/swac/coronavirus-west-africa/> (Accessed 30 July 2020).
13. Chu DKW et al. (2018) MERS Coronaviruses from camels in Africa exhibit region-dependent genetic diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **115**, 3144–3149.
14. Falzarano D et al. (2017) Dromedary camels in northern Mali have high seropositivity to MERS-CoV. *One Health (Amsterdam, Netherlands)* **3**, 41–43.
15. *On COVID-19, Africa must 'prepare for the worst now' – WHO says, Africanews*. <https://www.africanews.com/2020/03/19/on-covid-19-africa-must-prepare-for-the-worst-now-who-says/> (Accessed 25 June 2020).
16. Hemmes JH, Winkler KC and Kool SM (1962) Virus survival as a seasonal factor in influenza and poliomyelitis. *Antonie van Leeuwenhoek* **28**, 221–233.
17. Dalziel BD et al. (2018) Urbanization and humidity shape the intensity of influenza epidemics in U. S. cities. *Science* **362**, 75–79.
18. Dong E, Du H and Gardner L (2020) An interactive web-based dashboard to track COVID-19 in real time. *The Lancet Infectious Diseases* **20**(5), 533–534.
19. Read JM et al. (2020) Novel coronavirus 2019-nCoV: early estimation of epidemiological parameters and epidemic predictions. *medRxiv* **53**, 11.
20. Mizumoto K et al. (2020) Estimating the asymptomatic proportion of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance* **25**, 1–5.
21. Mao L et al. (2020) Neurological manifestations of hospitalized patients with COVID-19 in Wuhan, China. *JAMA Neurology* **77**(6), 683–690. doi: 10.2139/ssrn.3544840.
22. Onder G, and Rezza G, Brusaferro S. (2020) Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy. *JAMA* **323**(18), 1775–1776. doi: 10.1001/jama.2020.4683.
23. Fernandez-Nieto D et al. (2020) Characterization of acute acro-ischemic lesions in non-hospitalized patients: a case series of 132 patients during the COVID-19 outbreak. *Journal of the American Academy of Dermatology* **83**(1), e61–e63. doi: 10.1016/j.jaad.2020.04.093.
24. Mehta P et al. (2020) COVID-19: consider cytokine storm syndromes and immunosuppression. *The Lancet* **395**, 1033–1034.
25. Charles A and Janeway KM (2018) *Immunobiologie de Janeway – Charles A Janeway, Kenneth Murphy – Google Livres*. <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=o6xSDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Les+cytokines+sont+des+substances+naturellement+produites+par+les+cellules+du+système+immunitaire+pour+favoriser+la+réaction+inflammatoire+et+ainsi+défendre+le+corps+agressé&ots=cybP> (Accessed 9 April 2020).
26. Kannan S et al. (2020) COVID-19 (novel coronavirus 2019) – recent trends. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences* **24**, 2006–2011.
27. Bowale A et al. (2020) Clinical presentation, case management and outcomes for the first 32 COVID-19 patients in Nigeria. *Pan African Medical Journal* **35**, 24. doi: 10.11604/pamj.supp.2020.35.2.23262.
28. *Coronavirus-West-Africa – Sahel and West Africa Club Secretariat*. <http://www.oecd.org/swac/coronavirus-west-africa/> (Accessed 29 April 2020).
29. Reuben RC et al. (2020) Knowledge, attitudes and practices towards COVID-19: an epidemiological survey in North-Central Nigeria. *Journal of Community Health*, 1–14. doi: 10.1007/s10900-020-00881-1.
30. Amzat J et al. (2020) Coronavirus outbreak in Nigeria: burden and socio-medical response during the first 100 days. *International Journal of Infectious Diseases* **98**, 218–224.
31. *Lack of Covid-19 testing undermines Africa's 'success' – BBC News*. <https://www.bbc.com/news/world-africa-52801190> (Accessed 26 June 2020).
32. Jung YJ et al. (2020) Comparative analysis of primer-probe sets for the laboratory confirmation of SARS-CoV-2. Published online: bioRxiv 2020.02.25.964775; doi: 10.1101/2020.02.25.964775.
33. Xiao AT, Tong YX and Zhang S (2020) False-negative of RT-PCR and prolonged nucleic acid conversion in COVID-19: rather than recurrence. *Journal of Medical Virology* **92**(10), 1755–1756. doi: 10.1002/jmv.25855.
34. *Asian countries by Population 2018 – StatisticsTimes.com*. <http://statisticstimes.com/demographics/asian-countries-by-population.php> (Accessed 2 May 2020).
35. *Population density by country – Thematic Map – Asia*. <https://www.indexmundi.com/map/?v=21000&cr=as&l=en> (Accessed 2 May 2020).
36. *Population density by country – Thematic Map – Europe*. <https://www.indexmundi.com/map/?v=21000&cr=eu&l=en> (Accessed 2 May 2020).
37. *Lagos Population 2020 (Demographics, Maps, Graphs)*. <https://worldpopulationreview.com/world-cities/lagos-population/> (Accessed 29 June 2020).
38. WHO (2020) *Nouveau coronavirus (2019-nCoV): conseils au grand public*. WHO. <https://www.who.int/fr/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/advice-for-public> (Accessed 6 April 2020).
39. Bedford J et al. (2020) COVID-19: towards controlling of a pandemic. *The Lancet* **6736**, 1015–1018.
40. Kwon KT et al. (2020) Drive-through screening center for COVID-19: a safe and efficient screening system against massive community outbreak. *Journal of Korean medical science* **35**, e123.
41. *Afrique: les chiffres de l'emploi informel en 2018 – Jeune Afrique*. <https://www.jeuneafrique.com/emploi-formation/559335/afrique-les-chiffres-de-lemploi-informel-en-2018/> (Accessed 1 May 2020).
42. *Fact Sheet: Handwashing with soap, critical in the fight against coronavirus, is 'out of reach' for billions*. <https://www.unicef.org/press-releases/fact-sheet-handwashing-soap-critical-fight-against-coronavirus-out-reach-billions> (Accessed 3 May 2020).
43. OECD (2020) More than one-third of West Africans have no handwashing facility at home. 2–3. <http://www.west-africa-brief.org/content/en/more-one-third-west-africans-have-no-handwashing-facility-home>
44. *De Dakar à Lagos, les créateurs africains s'engagent dans la fabrication de masques – Jeune Afrique*. <https://www.jeuneafrique.com/931380/societe/de-dakar-a-lagos-les-createurs-africains-sengagent-dans-la-fabrication-de-masques/> (Accessed 3 May 2020).
45. *COVID-19: au Bénin, des masques de protection non conformes en circulation – Journal de l'Afrique*. <https://www.france24.com/fr/afrique/20200430-covid-19-au-benin-des-masques-de-protection-non-conformes-en-circulation> (Accessed 3 May 2020).
46. INSD (2015) *Ministère de l'économie et des finances Caractéristiques sociodémographiques de la population*. http://www.insd.bf/n/content/enquetes_recensements/Enq_EMC/Caract%20E9ristiques_sociodemographiques_de_la_population.pdf (Accessed 5 April 2020).
47. *The Africa Health Transformation Programme 2015–2020: A vision for universal health coverage*, WHO, Regional Office for Africa. <https://www.afro.who.int/publications/africa-health-transformation-programme-2015-2020-vision-universal-health-coverage> (Accessed 3 May 2020).
48. *Annuaire statistique ministère de la santé Burkina Faso 2018 – Recherche Google*. <https://www.google.com/search?q=annuaire+statistique+ministère+de+la+santé+burkina+faso+2018&oeq=annuaire+statistique+&q=chrome.1.69157j0l7.15132j0j7&sourceid=chrome&ie=UTF-8> (Accessed 3 May 2020).
49. *Jeune Afrique (2020) Nombre de lits de réanimation et de respirateurs: où en est l'Afrique? – Jeune Afrique*. <https://www.jeuneafrique.com/924087/societe/nombre-de-lits-de-reanimation-et-de-respirateurs-ou-en-est-lafrique/> (Accessed 13 April 2020).
50. Wei WE et al. (2020) Presymptomatic transmission of SARS-CoV-2 – Singapore, January 23–March 16, 2020. *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* **69**, 411–415.
51. Fang L, Karakiulakis G and Roth M (2020) Are patients with hypertension and diabetes mellitus at increased risk for COVID-19 infection? *The Lancet Respiratory Medicine* **2600**, 30116.

52. Guan W *et al.* (2020) Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. *New England Journal of Medicine* **382**, 1708–1720. doi: 10.1056/nejmoa2002032.
53. Li L *et al.* (2020) 2019 Novel coronavirus patients' clinical characteristics, discharge rate and fatality rate of meta-analysis. *Journal of Medical Virology* **92**(6), jmv.25757.
54. Mudie K *et al.* (2019) Non-communicable diseases in sub-Saharan Africa: a scoping review of large cohort studies. *Journal of Global Health* **9**, 020409. doi: 10.7189/jogh.09.020409.
55. *Global Report on Diabetes WHO Library Cataloguing-in-Publication Data Global report on diabetes. 2016.*
56. Atun R *et al.* (2018) Diabetes in sub-Saharan Africa: from clinical care to health policy. *Yearbook of Paediatric Endocrinology* **5**, 622–667.
57. Mbanya JCN *et al.* (2010) Diabetes in sub-Saharan Africa. *Diabetes, Metabolic Syndrome and Obesity: Targets and Therapy* **375**, 247–263.
58. WHO (2016) Diabetes country profiles. Published online: 2016. https://www.who.int/diabetes/country-profiles/diabetes_profiles_explanatory_notes.pdf?ua=1
59. WHO (2018) Noncommunicable Diseases (NCD) country profiles. Published online: 2018. ISBN: 978 92 4 151462 0. <https://www.who.int/nmh/publications/ncd-profiles-2018/en/> (Accessed 01 May 2020).
60. WHO (2018) WHO EMRO, *High blood pressure: a public health problem, World Health Day 2013, World Health Days.* <http://www.emro.who.int/fr/media/world-health-day/public-health-problem-factsheet-2013.html> (Accessed 30 March 2020).
61. Ataklte F *et al.* (2015) Burden of undiagnosed hypertension in sub-Saharan Africa: a systematic review and meta-analysis. *Hypertension* **65**, 291–298.
62. Adeloje D and Basquill C (2014) Estimating the prevalence and awareness rates of hypertension in Africa: a systematic analysis. *PLoS ONE* **9**, e104300. doi: 10.1371/journal.pone.0104300.
63. Houehanou C *et al.* (2018) Hypertension artérielle (HTA) en Afrique subsaharienne. *JMV-Journal de Médecine Vasculaire* **43**, 87.
64. Jean-Baptiste Tougouma S *et al.* (2018) Prévalence et connaissances de l'hypertension artérielle chez les personnes âgées: étude transversale menée à Bobo-Dioulasso, Burkina Faso Prevalence and knowledge of arterial hypertension in the elderly: cross-sectional study conducted in Bobo-Dioulasso, Burkina Faso Case series Open Access. *Pan African Medical Journal-ISSN* **30**, 1937–8688.
65. World Bank (2018) Prévalence du VIH, total (% de la population âgée de 15 à 49 ans), Data. 1–10.
66. Xu RH *et al.* (2004) Epidemiologic clues to SARS origin in China. *Emerging Infectious Diseases* **10**, 1030–1037.
67. Lu H, Stratton CW and Tang Y (2020) Outbreak of pneumonia of unknown etiology in Wuhan, China: the mystery and the miracle. *Journal of Medical Virology* **92**, 401–402.
68. Sun Z *et al.* (2020) Potential factors influencing repeated SARS outbreaks in China. *International Journal of Environmental Research and Public Health* **17**, 1–11.
69. Casanova LM *et al.* (2010) Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and Environmental Microbiology* **76**, 2712–2717.
70. Chan KH *et al.* (2011) The effects of temperature and relative humidity on the viability of the SARS coronavirus. *Advances in Virology* **2011**, 1–7. doi: 10.1155/2011/734690.
71. Jaakkola K *et al.* (2014) Decline in temperature and humidity increases the occurrence of influenza in cold climate. *Environmental Health: A Global Access Science Source* **13**, 22.
72. Kudo E *et al.* (2019) Low ambient humidity impairs barrier function and innate resistance against influenza infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **166**, 10905–10910.
73. Wang J *et al.* (2020) High temperature and high humidity reduce the transmission of COVID-19. *SSRN Electronic Journal*, 1–19.
74. Série environnement Le Climat et Les Changements Climatiques Club du Sahel et de L'Afrique de L'ouest Sahel and West Africa Club.
75. Fontaine B, Janicot S and Monerie P-A (2013) Recent changes in air temperature, heat waves occurrences, and atmospheric circulation in Northern Africa. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* **118**, 8536–8552.
76. Ringard J *et al.* (10) DL et DA. Évolution des pics de températures en Afrique de l'Ouest: étude comparative entre Abidjan et Niamey. 2014; 7 pages.
77. Bambara DCH (2018) Évolution des températures au Burkina Faso entre 1956 et 2015: cas de Ouagadougou et de Ouahigouya. *Physio-Géo* **12**, 23–41.
78. *Climat Mali: température, précipitations, quand partir, que mettre dans la valise.* <https://www.climatsetvoyages.com/climat/mali> (Accessed 30 April 2020).
79. *Population of Western Africa 2017 – PopulationPyramid.net.* <https://www.populationpyramid.net/western-africa/2017/> (Accessed 1 May 2020).
80. UNFPA WCARO, *Adolescents and Youth Report: West and Central Africa. 2018.* <https://wcaro.unfpa.org/en/publications/adolescents-and-youth-report-west-and-central-africa> (Accessed 1 May 2020).
81. Wikipedia (2020) *Démographie de l'Italie – Wikipédia.* [https://fr.wikipedia.org/wiki/Démographie_de_l'Italie](https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9mographie_de_l%27Italie) (Accessed 2 April 2020).

Annexe 2 : Autres contributions

SURVEILLANCE

One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020

Oriane Constant^{1*}, Patricia Gil^{2*}, Jonathan Barthelemy³, Karine Bolloré¹, Vincent Foulongne¹, Caroline Desmetz³, Agnès Leblond⁴, Isabelle Desjardins⁵, Sophie Pradier⁶, Aurélien Joulié⁷, Alain Sandoz⁸, Rayane Amaral⁹, Michel Boisseau², Ignace Rakotoarivony², Thierry Baldet², Albane Marie¹⁰, Benoît Frances¹⁰, Florence Reboul Salze¹¹, Bachirou Tinto⁴, Philippe Van de Perre¹, Sara Salinas¹, Cécile Beck⁹, Sylvie Lecolinet^{9,12}, Serafin Gutierrez^{2,12}, Yannick Simonin^{1,2,12}

1. Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections, Montpellier University, INSERM, EFS (établissement français du sang), Montpellier, France
2. ASTRE research unit, CIRAD, INRAE, Montpellier University, Montpellier, France
3. BioCommunication en CardioMétabolique (BC2M), Montpellier University, Montpellier, France
4. EPIA, UMR 0346, Epidemiologie des maladies animales et zoonotiques, INRAE, VetAgro Sup, Marcy l'Etoile, France
5. University of Lyon, VetAgro Sup, GREMERES-ICE Lyon Equine Research Center, Marcy l'Etoile, France
6. Jolimont veterinary clinics, Toulouse, France
7. National veterinary school of Toulouse, Université de Toulouse, Toulouse, France
8. Aix Marseille Université – CNRS, UMR 7376, Laboratoire Chimie de l'Environnement, Marseille, France
9. UMR 1161 Virology, ANSES, INRAE, ENVA, ANSES Animal Health Laboratory, EURL for equine diseases, Maisons-Alfort, France
10. EID Méditerranée, Montpellier, France
11. Veterinary Clinic des étangs, Perols, France
12. CIRAD, UMR ASTRE, CRVC, Petit Bourg, France

* These authors contributed equally to this manuscript and share first authorship.

** These authors contributed equally to this manuscript and share last authorship.

Correspondence: Yannick Simonin (yannick.simonin@umontpellier.fr) and Serafin Gutierrez (serafin.gutierrez@cirad.fr)

Citation style for this article:

Constant Oriane, Gil Patricia, Barthelemy Jonathan, Bolloré Karine, Foulongne Vincent, Desmetz Caroline, Leblond Agnès, Desjardins Isabelle, Pradier Sophie, Joulié Aurélien, Sandoz Alain, Amaral Rayane, Boisseau Michel, Rakotoarivony Ignace, Baldet Thierry, Marie Albane, Frances Benoît, Reboul Salze Florence, Tinto Bachirou, Van de Perre Philippe, Salinas Sara, Beck Cécile, Lecolinet Sylvie, Gutierrez Serafin, Simonin Yannick. One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *Euro Surveill.* 2022;27(25):pii=2200068. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068>

Article submitted on 19 Jan 2022 / accepted on 22 Apr 2022 / published on 23 Jun 2022

Background: West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV), two closely related flaviviruses, mainly follow an enzootic cycle involving mosquitoes and birds, but also infect humans and other mammals. Since 2010, their epidemiological situation may have shifted from irregular epidemics to endemicity in several European regions; this requires confirmation, as it could have implications for risk assessment and surveillance strategies. **Aim:** To explore the seroprevalence in animals and humans and potential endemicity of WNV and USUV in Southern France, given a long history of WNV outbreaks and the only severe human USUV case in France in this region. **Methods:** We evaluated the prevalence of WNV and USUV in a repeated cross-sectional study by serological and molecular analyses of human, dog, horse, bird and mosquito samples in the Camargue area, including the city of Montpellier, between 2016 and 2020. **Results:** We observed the active transmission of both viruses and higher USUV prevalence in humans, dogs, birds and mosquitoes, while WNV prevalence was higher in horses. In 500 human samples, 15 were positive for USUV and 6 for

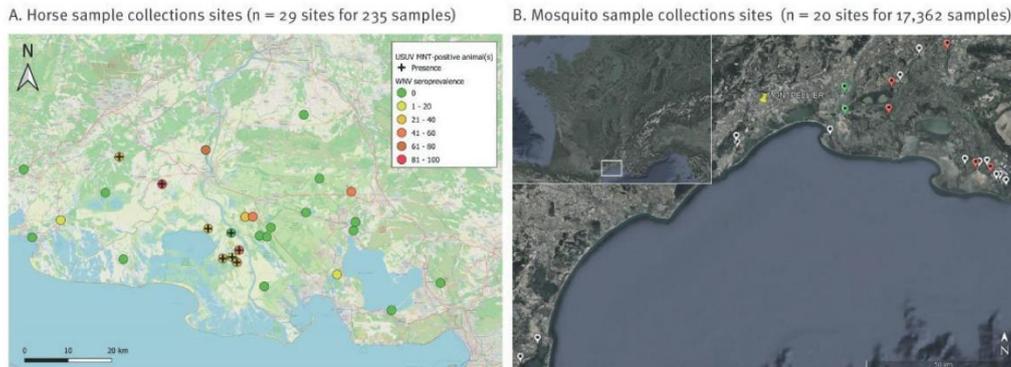
WNV. Genetic data showed that the same lineages, WNV lineage 1a and USUV lineage Africa 3, were found in mosquitoes in 2015, 2018 and 2020. **Conclusion:** These findings support existing literature suggesting endemisation in the study region and contribute to a better understanding of USUV and WNV circulation in Southern France. Our study underlines the importance of a One Health approach for the surveillance of these viruses.

Introduction

West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) are neurotropic mosquito-borne flaviviruses belonging to the Japanese encephalitis serocomplex [1]. Circulation of these viruses is maintained in similar transmission cycles involving ornithophilic mosquitoes, such as *Culex pipiens*, and different bird species. Both viruses can also spread to several mammalian species, including humans, although most mammals are considered to be dead-end hosts [2]. WNV can represent a serious burden to human and animal health [3]. The clinical spectrum of WNV infection in humans

FIGURE 1

Collection sites of horse (May–June 2016; n = 29) and mosquito samples (2018–2020; n = 20 sites), Southern France



MNT: microneutralisation test; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

A. Horse sample collections sites in the Camargue area in 2016. Stables with at least one USUV MNT-positive horse are represented by a cross and WNV seroprevalence in sampled stables is represented by a colour gradient from green (no WNV MNT-positive animal in the corresponding stable) to dark red (81–100% seroprevalence rate) (Map source: <https://www.openstreetmap.org>).

B. Mosquito collection (*Culex pipiens*) sites in the Camargue area from 2018 to 2020. Red pins indicate USUV-positive pools and green pins both WNV-positive and USUV-positive pools. White pins negative trapping sites. USUV-positive sites in our previous study in 2015 are shown for the sake of completeness. The location of the city of Montpellier is provided to facilitate site positioning.

The locations of sample collection for dogs and humans are not available because of the anonymisation of the data. We do not have information on the exact site where the dying wild birds were collected.

can range from influenza-like febrile illness to acute flaccid paralysis, meningitis or encephalitis [4]. USUV has been shown to affect primarily specific species of wild birds (mainly blackbirds and owls in Europe) [5,6]. Although less numerous than human cases of WNV infections, USUV infections in humans can manifest as encephalitis, meningitis and meningoencephalitis in both immunocompetent and immunocompromised patients [5].

Despite their potential impact on human and animal health, the available measures to control these viruses are limited. Although inactivated and recombinant WNV vaccines exist for horses [7], there are currently no specific treatments or vaccines for WNV or USUV available for humans. The management of virus circulation is thus largely based on integrated surveillance activities. These activities provide guidance to implement mainly preventive measures in case of detection. For example, blood for donation is tested for WNV and donors are deferred in regions in which outbreaks are detected because WNV can be transmitted through blood transfusion [8].

Since the 1960's, different lineages of WNV and USUV have been periodically detected in Europe. These viruses were mainly associated with sporadic cases in humans,

horses and birds and limited to certain European regions, until recently [9]. Occasional outbreaks of WNV have mainly taken place in Southern Europe during the last two decades [10-12]. Nevertheless, the outbreaks of both viruses have recently increased in numbers and geographical distribution. In 2018, a concurrent WNV and USUV epidemic occurred for the first time in several parts of Europe, including countries in different latitudes and a record number of outbreaks [2,5,13-18]. Currently, epidemiological patterns in several European regions suggest endemicity of these viruses instead of periodic introductions from endemic regions. For example, repeated detection of the same strains in the same region over a consistent number of years has been proven in Northern Italy, Hungary and Austria [19-21]. These patterns, together with the potential health risks associated with WNV and USUV, support the need for continuous rigorous analysis of the epidemiological situation in Europe [3], which will serve as a key piece of information in the design of surveillance strategies for WNV and USUV.

This study explores the seroprevalence and potential endemicity of WNV and USUV in a European region with a high risk of endemisation. This region in the south of France includes the Rhône River delta, the French region with the longest record of WNV outbreaks and

TABLE 1

Screening for Usutu and West Nile viruses in flavivirus-positive human samples using a microneutralisation test, Southern France, 2019–2020 (n = 53)

Samples (n)	USUV MNT titre	WNV MNT titre	Infection
33	ND	ND	UD
2	10	ND	USUV
9	20	ND	USUV
3	40	ND	USUV
3	ND	20	WNV
1	ND	40	WNV
1	10	160	WNV
1	20	20	WNV and USUV
Positive samples (n)	15	6	14 USUV, 5 WNV, 1 USUV/WNV

MNT: microneutralisation test; ND: not detected; UD: undetermined; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution. If the results indicate a titre for both viruses, the neutralising immune response was considered specific for WNV or USUV if the MNT titre was at least fourfold higher than the titre obtained against the other virus.

included in the French surveillance programme for WNV [9,22].

Methods

Study setting

The study area encompasses part of the Camargue area including the city of Montpellier, located within the Mediterranean basin in the eastern part of the Occitania region in Southern France. It has a climate catalogued as a warm-summer Mediterranean climate according to the Köppen-Geiger climate classification [23]. The Camargue area is a natural wetland located south of Arles city and within a triangle defined by the two arms of the Rhône River and the Mediterranean Sea. This area harbours diversified environments in which dry areas are continuously irrigated by canals, ditches and wetlands favourable to a large and diverse bird population as well as a large mosquito population [24].

Sample collection

Sample collection was a joint effort by INSERM (French Institute of Health and Medical Research), ANSES (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety), and CIRAD (French Agricultural Research Centre for International Development). The analyses on humans, dogs and birds were carried out by the Pathogenesis and Control of Chronic and Emerging Infections unit, INSERM, the studies on horses by the Animal Health Laboratory, ANSES and on mosquitoes by the Astre unit, CIRAD.

Human samples

Five hundred human serum samples randomly collected in 2019 and 2020 from outpatients attending Montpellier

University hospitals (mainly for occupational medicine (n = 133) or consultations in haematology (n = 84), nephrology (n = 78), hepato-gastroenterology (n = 56), cardiology (n = 41), dermatology (n = 28)) as part of a seroepidemiological investigation. Serum samples were stored at –80°C until further serological analysis. Patients less than 1 year of age and patients under care for any other viral infection were excluded from this study. An additional 34 serum samples from inpatients diagnosed in the same hospitals with non-bacterial meningitis or meningoencephalitis without an identified aetiology were also screened for WNV and USUV infection.

Dog samples

Serum samples were collected from 184 dogs (mainly indoor pets) in 2019–20 from animals undergoing health evaluations or surgical interventions at two veterinary clinics which serve animals from across the Montpellier area. These animals did not have any recent recorded infectious episodes. Serum samples were stored at –20°C until processed. No animals were sampled solely for the purpose of this study.

Horse samples

Serum samples from 235 horses included for the study were collected from 29 stables located in the Camargue area in May and June 2016 (Figure 1). The horse stables were chosen according to the criteria presented in Desjardins et al [25]. Samples were stored at –20°C before serological analysis. All horses were asymptomatic at the time of sampling and unvaccinated against WNV. The surveyed stables were in part randomly selected from stables located in a large area affected by WNV outbreaks in 2015. Stables that had previously reported horses with chronic fever during the sampling period or the previous year were included when possible.

In addition to sample collection, the owner completed a questionnaire on the individual characteristics of each horse (age, sex, activity), its health status (clinical signs, infection history and treatments) and stable management (contact with other animals, tick and flea control).

Bird samples

From February 2019 to December 2020, sick or dying resident wild birds were passively collected around Montpellier by the Regional Centre for the Safeguarding of Wild Fauna, the League for the Protection of Birds (LPO) and Montpellier Zoological Garden for first aid care. In agreement with the competent Official Veterinary Service, samples (liver and brain) were collected from dead birds (n = 191) and were stored at –20°C for laboratory molecular investigations.

Mosquito samples

Adult mosquitoes were collected from 20 sites in the Camargue area from 2018 to 2020 (Figure 1; detailed

TABLE 2

Screening for Usutu and West Nile viruses in flavivirus-positive dog samples using a microneutralisation test, Southern France, 2019–2020 (n = 3)

Breed	USUV MNT titre	WNV MNT titre	Infection
German wirehaired pointer	10	ND	USUV
Jack Russell terrier	40	ND	USUV
German shepherd	ND	160	WNV
Positive samples (n)	2	1	2 USUV, 1 WNV

MNT: microneutralisation test; ND: not detected; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution.

information on mosquito numbers and sites can be found in Supplementary Table S1). Overnight trapping using CO₂-baited type traps was performed once per week between April to October (28 trappings per year), as previously described [26]. Mosquitoes were identified based on morphological features on a chill table at 4°C [26]. Once identified, non-blood-engorged *C. pipiens* females were grouped in pools of between one and 44 individuals per site and collection date and stored at –80°C until further analyses.

Serological testing in human, dog and horse samples

A competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA, ID Screen West Nile Competition Multi species ELISA kit, IDvet, France) was used for the detection of flavivirus antibodies (IgG and IgM) in sera [27] from humans, dogs and horses, according to the manufacturer's instructions.

To confirm WNV or USUV infection, viral microneutralisation tests (MNT) were performed on cELISA-positive sera. For human and canine samples, methods to identify USUV (France2018, MT863562) and WNV (lineage 2, MT863560) were performed according to Constant et al. [9]. For horse samples, tests using USUV (France2018, MT863562) and WNV (lineage 1S-98-ST1, AF481864.1) were performed according to Beck et al. [28]. Different WNV strains have been used based upon their availability in the screening laboratories. WNV MNT performed on horse samples at ANSES in the frame of interlaboratory proficiency testing generated comparable results (data not shown). Briefly, serial dilutions of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) supplemented with 2% foetal bovine serum were mixed with USUV and WNV suspension at 100 tissue culture infectious dose 50 (TCID₅₀). After incubation for 90 min at 37°C allowing for viral neutralisation, 100 µL containing 2,000 Vero cells (human samples) or 2x10⁴ Vero cells (horse samples) were mixed in each well and plates were incubated for 3 to 5 days at 37°C. The presence or absence of a cytopathic effect was determined and compared with controls. A titre was determined for each sample

from the reciprocal of each dilution. The tests were performed twice in two independent experiments. For a neutralisation dilution $\geq 1:10$, sera were confirmed positive for WNV or USUV antibodies after duplication of results. If the results indicate a titre for both viruses, the neutralising immune response was considered specific for WNV or USUV if the MNT titre was at least four-fold higher than the titre obtained against the other virus.

Viral RNA detection in bird, human and mosquito samples and sequencing in mosquitoes

Viral RNA was extracted from 20–30 mg of homogenised bird brain or liver samples using the QIAmp Viral RNA mini kit (Qiagen). Viral RNA was extracted from 50 µL of human serum using the EZ1 BioRobot workstation in combination with the EZ1 DSP Virus Kit (Qiagen). The LightCycler 480 real-time PCR machine was then used for one-step reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) analysis. Mosquito pools were homogenised in PBS buffer and total RNA was extracted with the NucleoMagVet kit (Macherey Nagel) using a Kingfisher Flex (Thermo Scientific).

USUV and WNV detection was performed with a TaqMan-based RT-qPCR and a SYBR-Green-based RT-qPCR respectively, as previously described [29,30]. PCR amplification for Sanger sequencing (Eurofins Genomics, Germany) was performed using cDNA from all virus-positive pools. For USUV sequencing, we performed a PCR with the primers 4723fwd (5'-GTCATGTATGAAGGRGT-3') and 5672rev (5'-GTGTAYTCTGTTATCCACTC-3'). The primers target a region of the NS₃ gene (their 5' position is indicated in the name). Sequences of WNV were obtained using a PCR which targets a part of the NS₅ gene as previously described to discriminate WNV lineages [31]. The GenBank accession numbers of the USUV sequences are ON125263, ON099437, ON099438, ON099439, and ON099436 for WNV sequence.

Virus isolation

Confluent monolayers of Vero E6 (African green monkey) cells were inoculated with organ homogenates from RT-qPCR-positive birds in order to attempt virus isolation. Cells were incubated at 37°C with 5% CO₂ for 7 days and observed daily to assess cytopathic effects.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were performed in Geneious (Dotmatrix). Multiple alignments were generated with the default Geneious algorithm. All positions containing gaps and missing data were not included. The alignment for USUV included 33 partial sequences from mosquitoes of the NS₃ gene (682 bp, positions 4,736–5,614). The alignment for WNV included 51 partial sequences (all from mosquitoes, except one from a horse) of the NS₅ gene (1,000 bp, positions 9,039–10,039). Trees were generated with the Tree Builder

TABLE 3

Screening for Usutu and West Nile viruses in flavivirus-positive horse samples using microneutralisation tests, Southern France, May–June 2016 (n = 40)

Samples (n)	USUV MNT titre	WNV MNT titre	Infection
5	ND	ND	UD
2	10	ND	USUV
2	20	ND	USUV
6	ND	20	WNV
3	ND	40	WNV
1	10	80	WNV
5	ND	80	WNV
2	10	160	WNV
3	ND	160	WNV
1	10	320	WNV
2	20	320	WNV
3	ND	320	WNV
1	10	20	WNV and USUV
1	80	80	WNV and USUV
3	80	40	WNV and USUV
Positive samples (n)	9	31	4 USUV, 26 WNV, 5 USUV/WNV

MNT: microneutralisation test; ND: not detected; UD: undetermined; WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus. A titre was determined for each sample from the reciprocal of each dilution. If the results indicate a titre for both viruses, the neutralising immune response was considered specific for WNV or USUV if the MNT titre was at least fourfold higher than the titre obtained against the other virus.

function using the maximum likelihood approach and the Jukes-Cantor model.

Statistical analyses

Seroprevalence for USUV and WNV was estimated by dividing the number of positive subjects by the total number of subjects tested with two-sided exact binomial 95% confidence intervals (CI). Maximum likelihood estimates of infection rates in *C. pipiens* populations and their 95% CI were obtained with the R package binGroup.

Results

WNV and USUV seroprevalence and infections in humans

The human cohort included 272 (54.4%) females (median age: 43 years; interquartile range (IQR): 29–58 years) and 228 (45.6%) males (median age: 49 years; IQR: 33–68 years). We identified antibodies (IgG and IgM) against flaviviruses in 53 of the 500 samples (10.3%; 95% CI: 7.9–13.3).

All cELISA-positive human samples were then tested using MNT against WNV and USUV (Table 1). Among these 53 samples, 15 tested positive for USUV-specific antibodies (3%; 95% CI: 1.5–4.5) and six for WNV-specific antibodies (1.2%; 95% CI: 0.25–2.15). Although antibody cross-reactions could not be ruled out, samples with equal neutralising activity for WNV and USUV (<fourfold difference in MNT titre) were considered as potential co-infections. One sample demonstrated

neutralising activity for both WNV and USUV. We did not detect WNV or USUV RNA in the set of 500 human samples.

We also analysed 34 serum samples from patients diagnosed with meningitis or meningoencephalitis (of unidentified aetiology). WNV or USUV were not detected in any of these samples by serological screening or RT-qPCR.

WNV and USUV infections in dogs

We confirmed the presence of flavivirus antibodies (IgG and IgM) by cELISA in three of the 184 dog samples analysed (1.63%; 95% CI: 0.00–3.46): two USUV antibody-positive samples were detected by MNT (1.08%; 95% CI: 0.00–2.58). One dog was positive for WNV antibodies (0.54%; 95% CI: 0.00–1.60) (Table 2). We found that USUV seroprevalence in dogs appears higher than that of WNV, although the number of positive samples was too low to infer a statistically significant pattern.

WNV and USUV infections in horses

All horses that were sampled were asymptomatic on the date of sampling as well as during the previous WNV transmission season. Two horses that belonged to two different stables had developed a WNV infection in 2015. The sampling was performed in spring 2016, outside of the WNV transmission period in France. Most of the surveyed horses had no history of clinical signs indicative of higher risks of infection by WNV and/or USUV. We identified antibodies against flaviviruses

TABLE 4

Wild bird species positive for Usutu virus by RT-qPCR, Southern France, 2019–2020 (n = 5)

Species	Collection date	Neurological symptoms	USUV Cq values
Domestic pigeon	23 Aug 2019	No	35.95
Eurasian collared dove	29 Oct 2019	Yes	34.59
Eurasian sparrowhawk	16 Nov 2019	No	33.65
Song thrush	7 Oct 2019	Yes	32.89
Tawny owl	10 Jul 2019	Yes	37.94

Cq: cycle quantification; USUV: Usutu virus.

Samples (brains or livers) of dying wild birds with and without neurological symptoms were analysed by RT-qPCR. No samples positive for WNV were detected.

(IgM and IgG) in 40 out of 235 sera analysed (17.02%; 95% CI: 12.21–21.82) (Figure 1) (Table 3). Among these 40 samples, nine were positive for USUV-specific antibodies (3.83%; 95% CI: 1.37–6.28) and 31 for WNV-specific antibodies (13.19%; 95% CI: 8.86–17.51) which suggests that, based on the confidence intervals, WNV seroprevalence appears to be higher than USUV seroprevalence in horses. Among these positive samples, we identified five potentially co-infected samples demonstrating neutralising activity for both WNV and USUV. Moreover, a specific flavivirus species could not be determined in five horse sera.

WNV and USUV infections in birds

Brain or liver samples from diseased, euthanised or dead-found wild birds, with or without neurological signs, were analysed for the detection of WNV and USUV RNA by RT-qPCR. We did not detect WNV RNA in any of the samples, whereas five wild birds were positive for USUV RNA (Table 4). In 2019, USUV-infected birds found included one *Columba livia domestica* (Domestic pigeon), one *Streptopelia decaocto* (Eurasian collared dove), one *Accipiter nisus* (Eurasian sparrowhawk) and one *Turdus philomelos* (Song thrush). In 2020, we identified one *Strix aluco* (Tawny owl), a species considered as highly sedentary. USUV isolation from avian samples was not successful.

WNV and USUV infections in mosquitoes

A total of 17,362 non-engorged *C. pipiens* females were collected in the south of France between 2018 and 2020 and separated in 1,771 pools (Figure 1; detailed information on mosquito pool number and screening results can be found in Supplementary Table S1). All pools were analysed for the presence of WNV and USUV RNA. Two WNV-positive pools were identified in 2018, each in a different site. USUV-positive pools were detected in 2018 (one pool) and 2020 (six pools from four sites). No WNV- or USUV-positive pools were detected in 2019. The number of positive pools implied low infection rates in *C. pipiens* populations across all years, i.e. <0.5% (infection rates available in Supplementary Figure S1).

We obtained one sequence from a WNV-positive pool in 2018 and three sequences from USUV-positive pools,

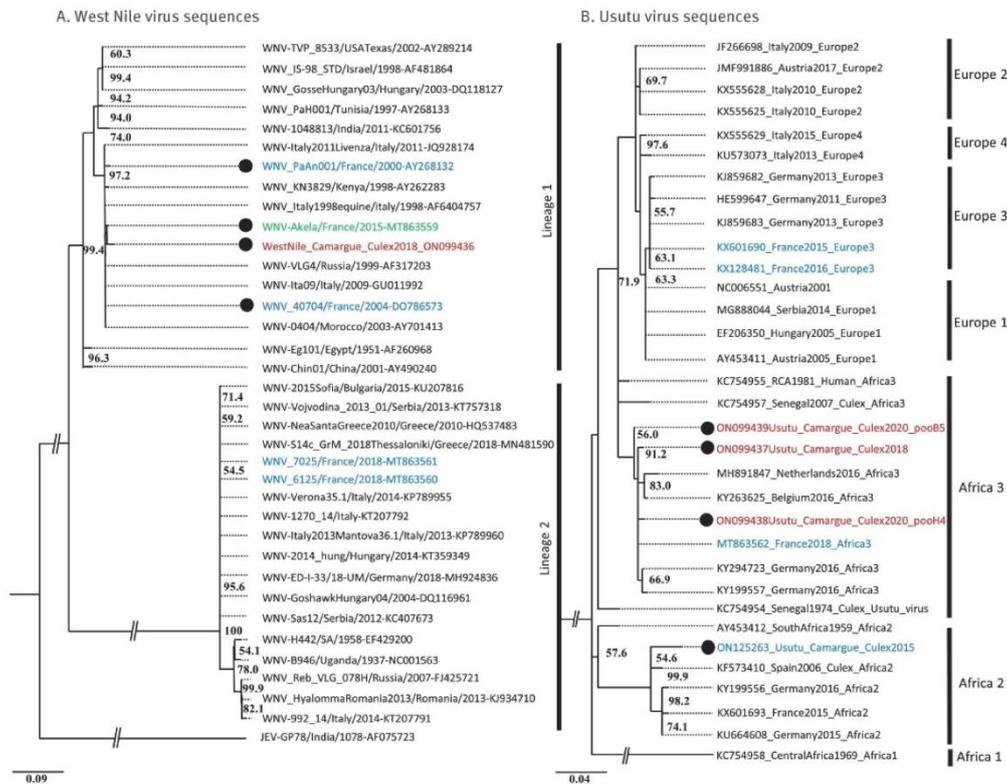
one in 2018 and two in 2020 (Figure 2). The WNV sequence belonged to Lineage 1 and clustered with WNV sequences previously identified in the Camargue area isolated from horses and one bird, which were obtained in 2000, 2004 and 2015. All USUV sequences clustered together within USUV Africa 3 Lineage.

Discussion

Here, we analysed the epidemiological situation of WNV and USUV in the Camargue area in France, a European region in which endemicity of both viruses is suspected. This seroprevalence study targeted several epidemiologically relevant hosts: humans, horses, wild birds and mosquitoes. Very low WNV seroprevalence in horses was evident in the Camargue region between 2005 and 2010 when important sampling efforts in wild birds were employed; no spillover outside the enzootic bird–mosquito transmission cycle was evident during the same period [32]. Furthermore, there is no molecular study showing the circulation of the virus over this period. WNV re-emerged in the Camargue during the summer of 2015 [32]. This arbovirus has been repeatedly reported in birds [33], horses [10,32,34,35] and humans [36–38] in this area since that time. Similarly, USUV infections have been previously reported in mosquitoes [26] and birds [33], and we previously described a human case of idiopathic facial paralysis in a person infected with USUV in the same area [39]. Although dogs do not commonly develop clinical signs, especially neurological disorders, with USUV or WNV infections, they were included in the study because they are considered relevant candidates for surveillance because of their proximity to humans and high WNV exposure rates, as previously documented [40]. Importantly, prevalence was estimated for 3 consecutive years in mosquito populations to provide a time window large enough to assess long-term virus presence. Thus, our approach aimed to obtain an estimation of virus prevalence in the study area, as well as genomic sequences over several years. Our results show that infections of USUV and WNV among humans, dogs, horses, birds and mosquitoes repeatedly occurred in the study area in recent years.

FIGURE 2

Maximum likelihood phylogenetic trees of A. the West Nile virus sequence from 2018 in Southern France ($n = 1$) and B. Usutu virus sequences from 2018 and 2020 in Southern France ($n = 3$), compared with selected sequences from GenBank ($n = 65$)



WNV: West Nile virus; USUV: Usutu virus.

The phylogenies were inferred based on a partial sequence of the NS₅ or the NS₃ genes for WNV and USUV, respectively. The tree was rooted with a sequence of Japanese encephalitis virus (AF075723) for WNV sequences. The tree was rooted with a sequence of lineage Africa 1 for USUV. One hundred bootstrap datasets with random sequence addition were computed to generate a consensus tree drawn. Numbers along branches are bootstrap values. Scale bar indicates substitutions per site.

Sequences in blue come from France. French sequences identified in this study (red) are all from mosquito samples and are available in GenBank. The WNV sequence from a horse from the Camargue region in 2015 and obtained by other authors appears in green to facilitate comparison [32]. Sequences from the Camargue area are marked with a black circumference. The year of collection is stated on the sequence name, generally after the country name.

In comparison with our mosquito surveillance data from 2015 [26], we identified two sites with WNV and USUV detection in different years, suggesting a high suitability of those sites for future surveillance studies (Supplementary Table S1: mosquito collection sites). Moreover, the combination of genetic data from other studies and ours show the presence of the same lineages for both WNV and USUV in the same region in 2015, 2018 and 2020. More precisely, the cluster of WNV Lineage 1 found in mosquitoes in 2018 has also been detected in Camargue in a horse in 2015 (Figure 2A) and in mosquito excreta in 2020 (a

different genomic region than that used in our analysis, GenBank accession OK489805.1 [41]). The same cluster had been detected in equines in the region in 2000 and 2004 (Figure 2A). Thus, after an 11-year period without detection, viruses belonging to the same cluster within WNV Lineage 1 have been repeatedly detected since 2015 in both vertebrates and mosquitoes. Similarly, the same USUV lineage was detected in mosquitoes from Camargue in 2015 (a sequence from a different genomic region than that used in our analysis was obtained) [26]. Thus, similarly to WNV, USUV Africa 3

Lineage has been detected in *C. pipiens* populations in Camargue in 2015, 2018 and 2020.

The repeated detection of the same lineages over several years is notable, given the usual low prevalence of these viruses, the detection of other lineages in the study area [26] and the lack of mosquito surveillance data in 2016 and 2017. Thus, the genetic data support a scenario of endemisation for both viruses in the study area. Our data also suggest that human exposure to WNV and USUV has been non-negligible in the study area (3% (95% CI: 1.5–4.5) for USUV and 1.2% (95% CI: 0.25–2.15) for WNV). Although the human cohort analysed was relatively limited in size, the seroprevalence data from domestic dogs also support active transmission of both viruses near humans. Overall, the potential continuous presence of WNV and USUV and the exposure levels observed suggest that the infection risk in the region deserves thorough characterisation. In particular, potential endemisation requires further validation through long-term studies because WNV epidemiological patterns have been shown to be complex. For example, lineage 1 of WNV was detected in the study region in 2000 and 2004 but later remained undetected until 2015. This pattern could be explained by two contrasting scenarios: extinction after introductions or, alternatively, circulation below detection thresholds for 11 years.

Our study reports the extent of USUV prevalence in the region in humans, dogs, horses, birds and mosquitoes. USUV remains largely unstudied worldwide, although the recent avian outbreaks, together with the detection of more than 100 human cases in Europe since 2008, have triggered studies on different aspects of USUV biology [5]. Our results show that the prevalence of USUV in humans may be at least as high as that of WNV, if not higher, in the study area. This observation concurs with a previous report showing a higher prevalence of USUV than WNV in zoo animals in the same area [9]. Similarly, USUV exposure in humans has been shown to be higher than that of WNV in some Italian regions [5,42-44]. Moreover, our passive surveillance in wild birds found USUV-positive birds in sedentary species, which favours long-term virus circulation locally. Mosquito surveillance data suggest that USUV can reach relatively notable prevalence levels in the region, i.e. the infection rate in mosquitoes was above 1% in late 2015. Although USUV has not been found responsible for a large number of detected human clinical cases in the study area, our results suggest that this situation could change, should a more pathogenic strain emerge, especially because USUV is described as having lineage-dependent virulence [45].

Our study provides data on the seroprevalence of WNV and USUV in different vertebrates that can be used to assess their possible interest for inclusion in surveillance schemes. Horses are considered as valuable sentinels of the risk of WNV epizootic transmission in Europe [46,47]. Based on the high seroprevalence

in horses obtained in our study (13.19% for WNV and 3.83% for USUV), their suitability for USUV surveillance warrants an experimental design allowing a robust comparison of USUV seroprevalence in domestic animals. However, we did not collect horse samples from the same years as the human and dog samples, hampering such a robust comparison. Nevertheless, WNV prevalence was almost 10-fold higher in horses than in humans and dogs, and USUV prevalence in horses was at least as high as in the other hosts.

This study also highlights the need for reinforcement of monitoring and surveillance programmes for USUV and WNV infection over several years, including monitoring of geographic spread and the dynamics of USUV and WNV transmission in both primary and incidental hosts. Such programs exist in various European countries, particularly in southern Europe, but they are mostly focused on seasonal surveillance of WNV [48-50]. However, some countries, such as Italy, have more recently expanded their programs for both viruses planned annually under the National Integrated Surveillance Plan (NISP), based on entomological, veterinary and human surveillance activities. These programmes should also involve different support actions, such as raising awareness as well as encouraging and training clinical veterinarians to better prevent, detect and alert on these infections. Nevertheless, such analysis is challenging because of several aspects of the epidemiology of WNV and USUV. First, their epidemics are not homogeneous over Europe, with certain regions experiencing concentrated outbreaks. Secondly, a robust assessment of their prevalence requires One Health, i.e. integrated surveillance in their different hosts and, thus, sampling approaches adapted to humans, equines, wild birds or mosquitoes. In addition, virus dispersal through bird movement hinders the ability to distinguish between a continuous virus presence in a given region, i.e. endemicity, and repeated virus introductions followed by extinctions. Disentangling between the two scenarios requires long-term studies showing virus prevalence in the same region over several years.

Our study had several limitations. A larger study with more samples per host species over several years would be needed to more accurately assess the infection rates of these two viruses in the different species studied. Furthermore, compared with active surveillance (entomological or on animal sentinels), passive surveillance systems (on dead birds or on diseased humans) are simpler and cheaper to implement, but the drawback lies in the inability to detect the virus early before human cases occur. A limitation of passive surveillance in birds is that not all species die from infection. In our study, only birds that died from infection or another cause were collected for study.

Conclusions

Our results show an active spread of USUV and WNV in a particularly exposed area of France in humans, dogs, horses, birds, and mosquitoes. Overall, improving surveillance programmes for USUV and WNV as part of a One Health approach would help to anticipate the veterinary and public health risks associated with these viruses.

Statements

Ethical statement: The study of human samples was approved by Montpellier University Hospital Review Board (2019-IRB-MPT-05-06) and was performed in line with the regulations outlined in the Declaration of Helsinki. Data was anonymised for publication purposes. Animal sampling were performed according to national and institutional guidelines (the sampling protocols were validated by the ethics committee of VetagroSup, agreement number 1534), informed written consent from animal owners was obtained and sample collection was performed by veterinarians.

Funding statement: This study was funded by the ANR (French National Research Agency; reference ANR-16-IDEX-0006), the KIM RIVE initiative, the Labex EpiGenMed "Investissements d'avenir" programme (reference ANR-10-LABX-12-01), and Montpellier University of Excellence (MUSE; ArboSud project). Moreover, SG was recipient of funding from the Direction Générale de l'Alimentation from the French Ministry of Agriculture and Food. Horse serosurveys were funded by the French Horse and Riding Institute, IFCE, and the EPERON fund (Encouragement aux Projets Equestres Régionaux Ou Nationaux) (OplUM project).

Conflict of interest

None declared.

Authors' contributions

QC, PG, JB, KB, CD, CB, AL, ID, SP, AJ, AS, MB, IR, AM, BF, BT, RA, VF collected the samples and performed the experiments. PG isolated viral strains. YS, SG designed the work and drafted the manuscript with SL, CB, TB, FRS, SS, PVD substantively revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

References

- Calisher CH, Gould EA. Taxonomy of the virus family Flaviviridae. *Adv Virus Res.* 2003;59:1-19. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)59001-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(03)59001-7) PMID: 14696325
- Zannoli S, Sambri V. West Nile virus and Usutu virus co-circulation in Europe: Epidemiology and implications. *Microorganisms.* 2019;7(7):E184. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7070184> PMID: 31248051
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). Expert consultation on risk assessment and outbreak mapping tools for West Nile virus infection in Europe. Stockholm: ECDC; 29 May 2012. Available from: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/expert-consultation-risk-assessment-and-outbreak-mapping-tools-west-nile-virus>
- Kramer LD, Li J, Shi PY. West Nile virus. *Lancet Neurol.* 2007;6(2):171-81. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70030-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70030-3) PMID: 17239804
- Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: A new threat? *Epidemiol Infect.* 2019;147:e232. <https://doi.org/10.1017/S0950268819001213> PMID: 31364580
- Weissenböck H, Kolodziejek J, Fragner K, Kuhn R, Pfeffer M, Nowotny N. Usutu virus activity in Austria, 2001-2002.

- Microbes Infect.* 2003;5(12):1132-6. [https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(03\)00204-1](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(03)00204-1) PMID: 14554255
- Seino KK, Long MT, Gibbs EPJ, Bowen RA, Beachboard SE, Humphrey PP, et al. Comparative efficacies of three commercially available vaccines against West Nile Virus (WNV) in a short-duration challenge trial involving an equine WNV encephalitis model. *Clin Vaccine Immunol.* 2007;14(11):1465-71. <https://doi.org/10.1128/CVI.00249-07> PMID: 17687109
- Zeller H, Marrama L, Sudre B, Van Bortel W, Warns-Petit E. Mosquito-borne disease surveillance by the European Centre for Disease Prevention and Control. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19(8):693-8. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12230> PMID: 23607415
- Constant O, Bollere K, Clé M, Barthelemy J, Foulongne V, Chenet B, et al. Evidence of exposure to USUV and WNV in zoo animals in France. *Pathogens.* 2020;9(12):100-5. <https://doi.org/10.3390/pathogens9121005> PMID: 33266071
- Beck C, Leparc Goffart I, Franke F, Gonzalez G, Dumarest M, Lowenski S, et al. Contrasted epidemiological patterns of West Nile virus lineages 1 and 2 infections in France from 2015 to 2019. *Pathogens.* 2020;9(11):908. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110908> PMID: 33143300
- García San Miguel Rodríguez-Alarcón L, Fernández-Martínez B, Sierra Moros M, Vázquez A, Julián Pachés P, García Villacieros E, et al. Unprecedented increase of West Nile virus neuroinvasive disease, Spain, summer 2020. *Euro Surveill.* 2021;26(19). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.19.2002010> PMID: 33988123
- Pervanidou D, Vakali A, Georgakopoulou T, Panagiotopoulos T, Patsoula E, Koliopoulos G, et al. West Nile virus in humans, Greece, 2018: the largest seasonal number of cases, 9 years after its emergence in the country. *Euro Surveill.* 2020;25(32). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.32.1900543> PMID: 32794446
- Carletti F, Colavita F, Rovida F, Percivalle E, Baldanti F, Ricci I, et al. Expanding Usutu virus circulation in Italy: detection in the Lazio region, central Italy, 2017 to 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(3). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.3.1800649> PMID: 30670139
- Nagy A, Mezei E, Nagy O, Bakonyi T, Csonka N, Kaposi M, et al. Extraordinary increase in West Nile virus cases and first confirmed human Usutu virus infection in Hungary, 2018. *Euro Surveill.* 2019;24(28). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.28.1900038> PMID: 31311619
- Čabanová V, Šikutová S, Straková P, Šebesta O, Vichová B, Zubříková D, et al. Co-Circulation of West Nile and Usutu Flaviviruses in Mosquitoes in Slovakia, 2018. *Viruses.* 2019;11(7):639. <https://doi.org/10.3390/v11070639> PMID: 31336825
- Martin MF, Simonin Y. Progression historique du virus du Nil occidental en Europe. [West Nile virus historical progression in Europe]. *Virologie (Montrouge).* 2019;23(5):265-70. French. <https://doi.org/10.1684/vir.2019.0787> PMID: 31826847
- European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC). West Nile fever in Europe in 2018 - human cases compared to previous seasons, updated 23 November. Stockholm: ECDC; 2019. Available from: <https://ecdc.europa.eu/en/publications-data/west-nile-fever-europe-2018-human-cases-compared-previous-seasons-updated-23>
- 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(7):674. <https://doi.org/10.3390/v11070674> PMID: 31340516
- Veo C, Della Ventura C, Moreno A, Rovida F, Percivalle E, Canziani S, et al. Evolutionary Dynamics of the Lineage 2 West Nile Virus That Caused the Largest European Epidemic: Italy 2011-2018. *Viruses.* 2019;11(9):814. <https://doi.org/10.3390/v11090814> PMID: 31484295
- Chaintoutis SC, Papa A, Pervanidou D, Dovas CI. Evolutionary dynamics of lineage 2 West Nile virus in Europe, 2004-2018: Phylogeny, selection pressure and phylogeography. *Mol Phylogenet Evol.* 2019;141:106617. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2019.106617> PMID: 31521822
- Srihi H, Chatti N, Ben Mhadheb M, Gharbi J, Abid N. Phylodynamic and phylogeographic analysis of the complete genome of the West Nile virus lineage 2 (WNV-2) in the Mediterranean basin. *BMC Ecol Evol.* 2021;21(1):183. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01902-w> PMID: 34579648
- Johnson N, Fernández de Marco M, Giovannini A, Ippoliti C, Danzetta ML, Svartz G, et al. Emerging mosquito-borne threats and the response from European and Eastern Mediterranean countries. *Int J Environ Res Public Health.* 2018;15(12):2775. <https://doi.org/10.3390/ijerph15122775> PMID: 30544521
- Beck HE, Zimmermann NE, McVicar TR, Vergopolan N, Berg A, Wood EF. Present and future Köppen-Geiger

- climate classification maps at 1-km resolution. *Sci Data*. 2018;5(1):180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214> PMID: 30375988
24. Pradier S, Sandoz A, Paul MC, Lefebvre G, Tran A, Maingault J, et al. Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk, Camargue, Southern France. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(8):7740-54. <https://doi.org/10.3390/ijerph110807740> PMID: 25093652
 25. Desjardins I, Joulié A, Pradier S, Lecollinet S, Beck C, Vial L, et al. Seroprevalence of horses to *Coxiella burnetii* in an Q fever endemic area. *Vet Microbiol*. 2018;215:49-56. PMID: 29426406
 26. Eiden M, Gil P, Ziegler U, Rakotoarivony I, Marie A, Frances B, et al. Emergence of two Usutu virus lineages in *Culex pipiens* mosquitoes in the Camargue, France, 2015. *Infect Genet Evol*. 2018;61:151-4. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.03.020> PMID: 29592838
 27. Chevalier V, Marsot M, Molia S, Rasamoelina H, Rakotondravao R, Pedrono N, et al. Serological evidence of west nile and usutu viruses circulation in domestic and wild birds in wetlands of mali and madagascar in 2008. *Int J Environ Res Public Health*. 2020;17(6):1998. <https://doi.org/10.3390/ijerph17061998> PMID: 32197367
 28. Beck C, Desprès P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N, et al. A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *Biomed Res Int*. 2015;2015:678084. <https://doi.org/10.1155/2015/678084> PMID: 26457301
 29. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *J Virol Methods*. 2014;197:51-4. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.039> PMID: 24036076
 30. Garcia M, Alout H, Diop F, Damour A, Bengue M, Weill M, et al. Innate Immune response of primary human keratinocytes to West Nile Virus infection and its modulation by mosquito saliva. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:387. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00387> PMID: 30450338
 31. Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B, Nowotny N. Emergence of Usutu virus, an African mosquito-borne flavivirus of the Japanese encephalitis virus group, central Europe. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(7):652-6. <https://doi.org/10.3201/eid0807.020094> PMID: 12095429
 32. Bahuon C, Marcillaud-Pitel C, Bournez L, Leblond A, Beck C, Hars J, et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Rev Sci Tech*. 2016;35(3):811-24. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2571> PMID: 28332648
 33. Vittecoq M, Lecollinet S, Jourdain E, Thomas F, Blanchon T, Arnal A, et al. Recent circulation of West Nile virus and potentially other closely related flaviviruses in Southern France. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13(8):610-3. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.1166> PMID: 23930977
 34. Durand B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, et al. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis*. 2002;8(8):777-82. <https://doi.org/10.3201/eid0808.010486> PMID: 12141961
 35. Pradier S, Sandoz A, Paul MC, Lefebvre G, Tran A, Maingault J, et al. Importance of wetlands management for West Nile Virus circulation risk, Camargue, Southern France. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(8):7740-54. <https://doi.org/10.3390/ijerph110807740> PMID: 25093652
 36. Bahuon C, Marcillaud-Pitel C, Bournez L, Leblond A, Beck C, Hars J, et al. West Nile virus epizootics in the Camargue (France) in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Rev Sci Tech*. 2016;35(3):811-24. <https://doi.org/10.20506/rst.35.3.2571> PMID: 28332648
 37. Young JJ, Coulombier D, Domanović D, Zeller H, Gossner CM, European Union West Nile Fever Working Group. One Health approach for West Nile virus surveillance in the European Union: relevance of equine data for blood safety. *Euro Surveill*. 2019;24(16):1. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.16.1800349> PMID: 31014416
 38. Calistri P, Giovannini A, Hubalek Z, Ionescu A, Monaco F, Savini G, et al. Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *Open Virol J*. 2010;4(1):29-37. <https://doi.org/10.2174/1874357901004010029> PMID: 20517490
 39. Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, et al. Human Usutu virus infection with atypical neurologic presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(5):875-8. <https://doi.org/10.3201/eid2405.171122> PMID: 29664365
 40. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachier 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(9):1857-64. <https://doi.org/10.1017/S095026881600011X> PMID: 26838515
 41. L'Ambert G, Gendrot M, Briolant S, Nguyen A, Pages S, Bosio L, et al. Mosquito excreta reveals circulation of West Nile virus and its underlying ecosystem. *bioRxiv* 2021, 2021.12.05.471258. doi: <https://doi.org/10.1101/2021.12.05.471258>
 42. Lustig Y, Sofer D, Bucris ED, Mendelson E. Surveillance and diagnosis of west nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity. *Front Microbiol*. 2018;9:2421. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02421> PMID: 30369916
 43. Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, Rovida F, Adzasehoun KMG, Colombini I, et al. West nile or usutu virus? A three-year follow-up of humoral and cellular response in a group of asymptomatic blood donors. *Viruses*. 2020;12(2):157. <https://doi.org/10.3390/v12020157> PMID: 32013152
 44. Grottola A, Maracci M, Tagliacuzzi S, Gennari W, Di Gennaro A, Orsini M, et al. Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(1):33-7. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.019> PMID: 27677699
 45. Clé M, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. *J Neuroinflammation*. 2021;18(1):11. <https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4> PMID: 33407600
 46. Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, et al. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill*. 2010;15(16):11-5. <https://doi.org/10.2807/ese.15.16.19547-en> PMID: 20430000
 47. Paternoster G, Babo Martins S, Mattivi A, Cagarelli R, Angelini P, Bellini R, et al. Economics of One Health: Costs and benefits of integrated West Nile virus surveillance in Emilia-Romagna. *PLoS One*. 2017;12(11):e0188156. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188156> PMID: 29176851
 48. Scaramozzino P, Carvelli A, Bruni G, Cappiello G, Censi F, Magliano A, et al. West Nile and Usutu viruses co-circulation in central Italy: outcomes of the 2018 integrated surveillance. *Parasit Vectors*. 2021;14(1):243. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04736-z> PMID: 33962673
 49. Calzolari M, Bonilauri P, Bellini R, Albieri A, Defilippo F, Maioli G, et al. Evidence of simultaneous circulation of West Nile and Usutu viruses in mosquitoes sampled in Emilia-Romagna region (Italy) in 2009. *PLoS One*. 2010;5(12):e14324. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0014324> PMID: 21179462
 50. Lauriano A, Rossi A, Galletti G, Casadei G, Santi A, Rubini S, et al. West nile and usutu viruses' surveillance in birds of the Province of Ferrara, Italy, from 2015 to 2019. *Viruses*. 2021;13(7):13. <https://doi.org/10.3390/v13071367> PMID: 34372573

License, supplementary material and copyright

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY 4.0) Licence. You may share and adapt the material, but must give appropriate credit to the source, provide a link to the licence and indicate if changes were made.

Any supplementary material referenced in the article can be found in the online version.

This article is copyright of the authors or their affiliated institutions, 2022.