

Aus dem
Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen
und der
Klinik für Pferde der Veterinärmedizinischen Fakultät der
Universität Leipzig

Zoonotische Flavivirusinfektionen bei Pferden aus Mitteldeutschland

Inaugural-Dissertation zur
Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Leonard Max Richard Gothe
aus Friedrichroda

Leipzig, 2024

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Dr. Thomas Vahlenkamp

Betreuer: Prof. Dr. Martin Pfeffer
Prof. Dr. Katharina Lohmann

Gutachter: Prof. Dr. Martin Pfeffer, Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen,
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig
Prof. Dr. Katharina Lohmann, Klinik für Pferde, Veterinärmedizinische Fakultät der
Universität Leipzig
Prof. Dr. Heidrun Gehlen, Pferdeklinik, Abteilung Innere Medizin, Freie Universität
Berlin

Tag der Verteidigung: 06.02.2024

Für Julia und Lars

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	LITERATURÜBERSICHT	3
2.1	West-Nil-Virus	3
2.1.1	Taxonomie, Morphologie und Verbreitung	3
2.1.2	Infektionszyklus und alternative Übertragungswege	4
2.1.3	Vektorspezies.....	6
2.1.4	Einflussfaktoren auf den Übertragungszyklus des West-Nil-Virus.....	7
2.1.5	Pathogenese und Erkrankungsformen nach West-Nil-Virus-Infektion	8
2.1.6	West-Nil-Virus-Erkrankung bei Menschen und Pferden	9
2.1.7	Diagnostik und tierseuchenrechtliche Einordnung	10
2.1.8	West-Nil-Virus-Seroprävalenzstudien.....	11
2.1.9	Tabelle 1 Equine West-Nil-Virus-Seroprävalenzstudien aus Europa von 1999 bis 2022.	13
2.1.10	Risikofaktoren für eine West-Nil-Virus-Infektion beim Pferd	16
2.2	Das Usutu-Virus	17
2.2.1	Taxonomie und Struktur	17
2.2.2	Übertragung und Epidemiologie.....	17
2.2.3	Klinik und Pathogenese	17
2.2.4	Diagnostik	18
2.3	Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus	18
2.3.1	Taxonomie und Struktur	18
2.3.2	Übertragung und Epidemiologie.....	18
2.3.3	Klinik und Pathogenese	20
2.3.4	Diagnostik	20
3	PUBLIKATION	21
3.1	Stellungnahme zum Eigenanteil	21
3.2	Ergänzende Daten der Publikation	39
4	DISKUSSION UND SCHLUSSFOLGERUNG	67
4.1	West-Nil-Virus	67
4.2	Usutu-Virus	70
4.3	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus	71
4.4	Schlussfolgerungen	73

5	ZUSAMMENFASSUNG	74
6	SUMMARY	76
7	LITERATURVERZEICHNIS	78
8	DANKSAGUNG	95

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ABI	Anhalt-Bitterfeld
cELISA	competitive panflavivirus ELISA
°C	Grad Celsius
CDC	Center for Disease Control and Prevention
CI	confidence interval (Konfidenzintervall)
CS	Central Saxony (Mittelsachsen)
D	Dresden
Da	Dalton
df	degree of freedom (Freiheitsgrad)
DS	Dahme-Spreewald
DR	Dessau-Rosslau
EE	Elbe-Elster
EIP	extrinsic incubation period (extrinsische Inkubationszeit)
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest)
FSMEV	Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus
FLI	Friedrich Loeffler-Institut
g	Erdbeschleunigung
IgG	Immunglobulin-G
IgM	Immunglobulin-M
JL	Jerichower Land
LD	Leipzig district (Leipzig-Land)
LK	Landkreis
MIA	Multiplex immunoassay
MS	Meißen
ND	neutralizing dilution (Neutralisierende Verdünnung)
nm	Nanometer
NS	Nordsachsen
OSL	Oberspreewald-Lausitz
OR	Odds Ratio
p	Signifikanzwert
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction (Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion)

PM	Potsdam-Mittelmark
TBEV	tick-borne encephalitis virus (Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus)
RKI	Robert Koch-Institut
RNS	Ribonukleinsäure
SLK	Saalekreis
SZK	Salzlandkreis
TSIS	Tierseucheninformationssystem
StIKoVet	Ständige Impfkommission Veterinärmedizin
USUV	Usutu-Virus
VNT	Virusneutralisationstest
WNF	West-Nil-Fieber
WNV	West-Nil-Virus
WB	Wittenberg
χ^2	Chi-Quadrat
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

Zoonotische, durch Vektoren übertragene Arboviren (engl.: arthropod-borne-viruses) aus der Familie der Flaviviren wie das West-Nil-Virus (WNV), das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) und das Usutu-Virus (USUV), stellen eine erhebliche Bedrohung für die Gesundheit von Menschen und Tieren dar. Humanen Infektionen aller drei Viren ist gemein, dass sie sich zu Beginn in Form einer fiebrigen Allgemeinerkrankung präsentieren können und in der Minderheit der Fälle zu einer schweren Verlaufsform, gekennzeichnet durch zum Teil schwerwiegende neurologische Symptome fortschreiten können (MOSTASHARI et al. 2001, HAYES 2006, PECORARI et al. 2009, BOGOVIC and STRLE 2015, SANTINI et al. 2015, KAISER 2016, SIMONIN et al. 2018). Beim Pferd sind vergleichbare Erkrankungen nach Infektionen mit dem WNV und dem FSMEV beschrieben (GARDNER et al. 2007, CAVALLERI et al. 2022, LOHMANN et al. 2022).

Während das WNV und das USUV sich in ihrem natürlichen Infektionszyklus vor allem auf Vögel als natürliches Reservoir und Stechmücken der Gattung *Culex* (*Cx.*) als Überträger stützen, wird FSMEV durch Zecken übertragen, wobei kleine Nagetiere das Hauptreservoir darstellen (SAVAGE 1999, TURELL et al. 2005, TONTERI et al. 2013, NIKOLAY 2015, BRANDENBURG et al. 2023).

Während die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) in Deutschland schon länger untersucht wird, wurde das WNV erst durch den im Jahr 2018 erstmalig erfolgten Viruseintrag und die damit einhergehenden Infektionen von Menschen, Pferden und Vögeln hierzulande zum epidemiologischen Forschungsgegenstand (ZIEGLER et al. 2019). Das USUV, schon länger endemisch in Südeuropa, trat in Deutschland zum ersten Mal 2011 in Form eines massiven Amselsterbens in Südwestdeutschland in Erscheinung (ZIEGLER et al. 2015).

Da Pferde ebenfalls infolge der Auswirkungen einer Infektion mit dem WNV und dem FSMEV erkranken können und sie spezifische Antikörper gegen alle drei untersuchten Flaviviren ausbilden, sind sie geeignet, um Aufschluss über die Virusverbreitung in Deutschland zu geben. Bisher wurde die Erhebung der Seroprävalenz dieser drei Flaviviren bei Pferden in Mitteldeutschland bereits vereinzelt durchgeführt (BERGMANN et al. 2022, GANZENBERG et al. 2022). Eine Seroprävalenzstudie von 2020 ermittelte die geographische Ausbreitung der WNV-Infektion in Sachsen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg, und bietet damit die Grundlage, um die Ausbreitung dieser neu auftretenden Virusinfektion weiter zu verfolgen.

Ziel der vorliegenden Studie war es, aufbauend auf der Vorgängerarbeit, durch eine erneute, erweiterte Erhebung der Seroprävalenz gegen diese drei Flaviviren in der mitteldeutschen Pferdepopulation, das bereits vorhandene Studienmaterial um aktuelle Daten zu ergänzen und somit die Verbreitung dieser drei Viren noch besser nachzuvollziehen. Das Studiengebiet von Ganzenberg et al. 2022 wurde daher um jeweils drei Landkreise in Sachsen-Anhalt und Brandenburg in nordwestlicher Richtung erweitert. Der Landkreis Jerichower Land wurde miteinbezogen, da aus diesem Landkreis bis heute offizielle WNV-Fallmeldungen fehlen und das Auftreten seropositiver Pferde gerade in diesen Gebieten Hinweise auf bestehende Infektionszyklen geben kann. Weiterhin waren die neu ausgewählten Landkreise noch nicht als FSMEV-Risikogebiete ausgewiesen. Die Untersuchungen sollten Aufschluss darüber geben, ob serologisch positive Pferde in diesen Landkreisen vorhanden sind und inwieweit sich die Ergebnisse dieser Landkreise von denen als offizielle FSMEV-Risikogebiete ausgewiesenen Landkreisen der Studie unterscheiden.

Weiterhin sollten die bereits von Ganzenberg et al. 2022 erhobenen Risikofaktoren für eine Infektion mit dem WNV anhand neu erhobener Daten überprüft sowie Risikofaktoren für eine Infektion mit dem FSMEV in der Studienpopulation neu ermittelt werden. Durch eine erneute Beprobung von

Pferden aus Ganzenberg et al. 2022 sollte der Anteil frischer Infektionen mit den untersuchten Flaviviren durch die damit einhergehende Serokonversion aufgedeckt werden. Im weiteren Sinne hatte die Studie auch zum Ziel, die mögliche Nutzung serologischer Daten von Pferden zur Beurteilung des Infektionsrisikos des Menschen zu beleuchten.

2 Literaturübersicht

2.1 West-Nil-Virus

2.1.1 Taxonomie, Morphologie und Verbreitung

Das WNV gehört zur Familie der Flaviviren und wird, wie auch das USUV oder das St. Louis Enzephalitis-Virus, dem Japanischen-Enzephalitis-Serokomplex zugeordnet (POIDINGER et al. 1996). Es handelt sich beim WNV um ein behülltes Einzelstrang-RNS-Virus mit positiver Polarität, einer Genomlänge von ca. elf Kilobasen und einem Durchmesser von 50 nm (CASTLE and WENGLER 1987, DEUBEL et al. 2001, HAYES and GUBLER 2006). Das Virus besitzt drei Strukturproteine: ein Capsid-, ein Hüll- und das Membranprotein. Weiterhin besitzt das Virus sieben Nichtstrukturproteine, welche alle eine Rolle im Replikationsprozess einnehmen und beispielsweise durch Eingriffe in die Komplementmodulation oder die Interferonantwort des Wirts zur Immunevasion des Virus beitragen. Sie werden alle gemeinsam aus einem offenen Leseraster als Polyprotein synthetisiert und anschließend in die zehn einzelnen Proteine prozessiert (BEST 2016, CHEN et al. 2017, HABARUGIRA et al. 2020b).

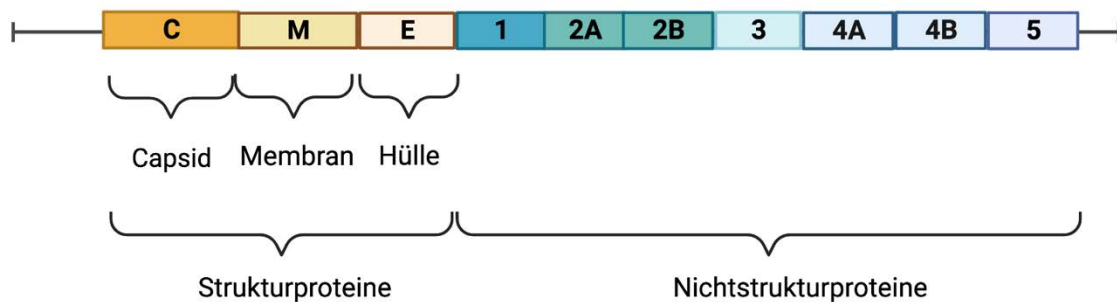


Abbildung 1: Virales Genom mit 3 Struktur- und 7 Nichtstrukturproteinen erstellt nach HABARUGIRA et al. (2020b) mit [biorender.com](https://www.biorender.com)

Aufgrund der genetischen Variabilität können die Genomsequenzen des Virus in neun verschiedene Linien eingeteilt werden (PACHLER et al. 2014). Linie eins wird in drei Unterlinien unterteilt. Linie 1a wurde bereits im Subsahararaum, dem Nahen Osten, Zentraleuropa und in Nordamerika nachgewiesen. Die Linie 1b konnte bisher vor allem in Australien isoliert werden und wird auch Kunjin-Subtyp oder Kunjin-Virus genannt. Als dritter Vertreter ist die teilweise auch als Linie fünf bezeichnete, und auf dem indischen Subkontinent isolierte Unterlinie 1c zu nennen (LANCIOTTI et al. 2002, BAKONYI et al. 2005, BONDRE et al. 2007, MANN et al. 2013). Genauso wie Isolate der Linie zwei sind die Vertreter der Linie eins bereits im Zusammenhang mit Erkrankungen bei Menschen und Tieren nachgewiesen worden (BAKONYI et al. 2006). Vertreter der Linie zwei besitzen ebenso wie die der Linie eins einen Neurotropismus, manche Isolate gelten jedoch als weniger virulent. Vertreter dieser Linie wurden bereits in der Subsahararegion Afrikas, in Madagaskar und in Europa isoliert (BAKONYI et al. 2006, BOTHA et al. 2008, CICCIOZZI et al. 2013, FALL et al. 2017).

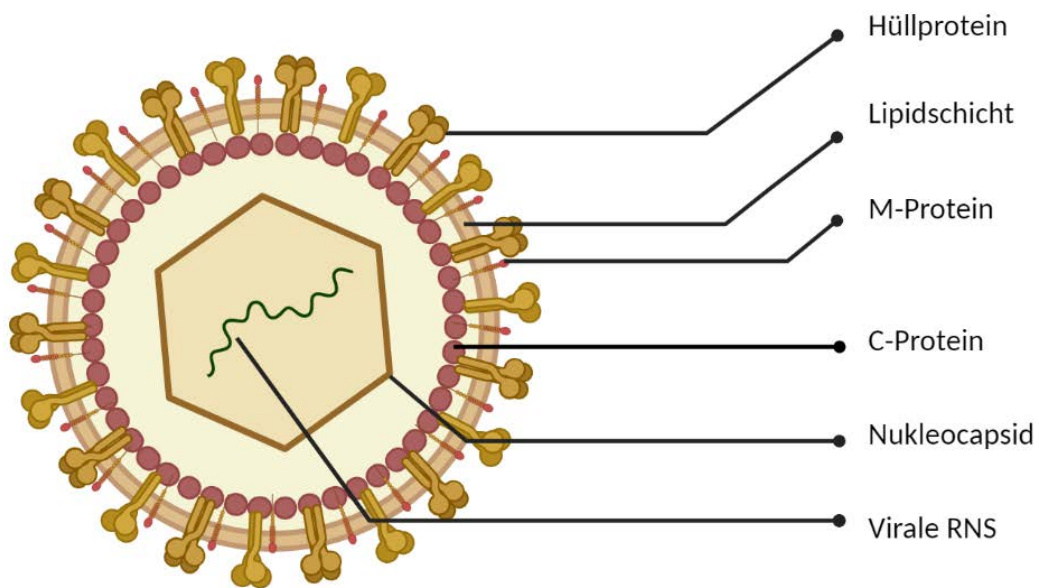


Abbildung 2: WNV, schematisch nach LANG (2007), erstellt mit biorender.com

Zu den weniger weit verbreiteten Vertretern zählt die Linie drei, auch Ravensburg-Virus genannt, welches erstmals in Tschechien isoliert wurde (HUBALEK et al. 1998, BAKONYI et al. 2005). Ebenfalls weniger weit verbreitet ist die Linie vier, die bisher vor allem in Russland nachgewiesen werden konnte (LVOV et al. 2004). Die Linie fünf, vorwiegend in Indien vorkommend, wird wie oben beschrieben alternativ auch als Linie 1c klassifiziert (LANCIOTTI et al. 2002). Als potenzielle sechste Linie wurde 2006 ein Isolat aus Spanien postuliert (VAZQUEZ et al. 2010). Weiterhin gilt als Linie sieben ein als Koutango-Virus bezeichnetes Virus, welches zuerst 1968 in Nagetieren aus dem Senegal gefunden wurde und bisher nur auf dem afrikanischen Kontinent aufgetreten ist (BUTENKO 1986, FALL et al. 2021). Als potenzielle achte und neunte Linie werden Virusisolate diskutiert, welche 1992 im Senegal bzw. 2013 in Österreich isoliert werden konnten (FALL et al. 2014, PACHLER et al. 2014). Alle Isolate, die bisher in Deutschland nachgewiesen werden konnten, wurden der Linie zwei zugeordnet.

2.1.2 Infektionszyklus und alternative Übertragungswege

Typischerweise spielt sich der Infektionszyklus des WNV zwischen Vögeln und ornithophilen Moskitos ab. Hierbei fungieren ornithophile Moskitos als Vektoren, da sie das Virus zwischen Vögeln verbreiten und so zu einer Vermehrung des Virus in der Vogelpopulation führen. Dieser Übertragungszyklus wird auch ruraler oder sylvatischer Zyklus genannt (HUBALEK and HALOUZKA 1999). Moskitos mit einem eher unspezifischen Wirtsspektrum werden als Brückenvektoren bezeichnet, da sie das Virus vom Vogel auf andere Wirbeltiere und vor allem auf Säugetiere weitertragen und so eine Brücke zwischen dem natürlichen Infektionskreislauf des Virus und verschiedenen Fehlwirten darstellen (KILPATRICK et al. 2005).

Die Zeit zwischen der Aufnahme des Virus durch die Stechmücke und dem Zeitpunkt, an dem das Virus an einen neuen Wirt weitergegeben werden kann, wird als extrinsische Inkubationszeit bezeichnet. In dieser Zeit vermehrt sich das Virus im Mitteldarm der Stechmücke, um sich von dort in

die Speicheldrüsen und andere Gewebe auszubreiten. Ist das Virus in den Speicheldrüsen der Stechmücke angelangt, kann es bei einem erneuten Stich auf den nächsten Wirt übertragen werden (GIRARD et al. 2004, ZIEGLER et al. 2019). Die Länge dieses Prozesses ist temperaturabhängig und erklärt, warum große WNV-Epidemien vor allem während längerer Hitzeperioden auftreten (REISEN et al. 2006).

Es wird angenommen, dass nahezu alle Vogel- und Säugetierspezies nach dem Stich eines solchen Moskitos mit dem Virus infiziert werden können und sich eine Virämie von im Schnitt ein bis sieben Tagen anschließt (KILPATRICK et al. 2007). Ist dieser Wirt erneut ein empfänglicher Vogel, vermehrt sich das Virus im Blut und anderen Organen (KOMAR et al. 2003). Überleben Vögel diese initiale virämische Phase, beginnen sie ab Tag vier Antikörper auszubilden, die gegen eine erneute Infektion mit dem WNV schützen (FANG and REISEN 2006, STYER et al. 2006). Wirte, in denen sich das Virus stark vermehren kann und in denen so hohe Virustiter im Blut erreicht werden, dass sich eine neue Stechmücke durch eine Blutmahlzeit infizieren kann, werden Amplifikationswirte genannt. Prinzipiell kommen viele Vogelarten als Amplifikationswirte in Betracht. In den USA wurden der Blauhäher (*Cyanocitta cristata*), der westliche Buschhäher (*Aphelocoma californica*), die amerikanische Krähe (*Corvus brachyrhynchos*) sowie die Purpur-Grackel (*Quiscalus quiscula*) als kompetente Wirte identifiziert (KILPATRICK et al. 2007). Generell gelten Vertreter der Ordnung Passeriformes als äußerst empfänglich, da sie hohe Virämie- und Ausscheidungsraten vorweisen und fulminante klinische Verläufe zeigen (KOMAR et al. 2003).

Tierarten die ebenfalls als Amplifikationswirte gelten, sind Alligatoren und Salzwasserkrokodile, da im Blut dieser Tiere hohe Virustiter nachgewiesen wurden (MILLER et al. 2003, KLENK et al. 2004, HABARUGIRA et al. 2020a). Als weitere Wirte mit ausreichend hohen Virämien, welche sie zu theoretischen Amplifikationswirten machen, werden Fuchshörnchen (*Sciurus niger*), braune Makis (*Lemur fulvus*), Streifen-Backenhörnchen (*Tamias striatus*), Grauhörnchen (*Sciurus carolinensis*), Florida Wildkaninchen (*Sylvilagus floridanus*) und Mantelpaviane (*Papio hamardryas anubis*) diskutiert (RODHAIN et al. 1985, TIAWSIRISUP et al. 2005, WOLF et al. 2006, PLATT et al. 2007, GOMEZ et al. 2008, PLATT et al. 2008). Das Potenzial von Waschbären als Amplifikationswirte im typischen vektorassoziierten Übertragungszyklus ist umstritten, jedoch scheiden sie das Virus in hohen Mengen mit dem Kot aus und weisen eine hohe Seroprävalenz auf. Somit steht eine potenzielle fäko-orale Übertragung im Raum (BENTLER et al. 2007, ROOT et al. 2010).

Neben Amplifikationswirten, gibt es auch Wirte, in denen eine solche Vermehrung ausbleibt oder so gering ausfällt, dass eine Weitergabe der Infektion an weitere Moskitos im Regelfall nicht erfolgt. Solche Wirte werden Fehlwirte genannt. Zu diesen zählen neben Pferd und Mensch auch die meisten anderen Säugetierspezies. Diese Fehlwirte spielen in der Epidemiologie des WNV eine untergeordnete Rolle (VAN DER MEULEN et al. 2005).

Neben Mückenstichen sind auch viele weitere Möglichkeiten, sich mit dem WNV zu infizieren, beschrieben. So wurden Übertragungen beim Menschen durch Bluttransfusionen und Organtransplantationen nachgewiesen (IWAMOTO et al. 2003, PEALER et al. 2003). Auch die intrauterine Infektion beziehungsweise die Infektion über die Muttermilch scheinen in seltenen Fällen beim Menschen möglich zu sein (CDC 2002, HINCKLEY et al. 2007). Zusätzlich kam es 2018 bei einem Tierarzt nach der Sektion eines WNV-infizierten Bartkauzes zu Symptomen einer fiebrigen Allgemeinerkrankung und einem positiven Immunglobulin-M (IgM) Antikörpernachweis, so dass

auch von einem direkten Infektionsweg über den Kontakt zu Organen infizierter Vögel ausgegangen werden muss (PROMED POSTS 2018, ZIEGLER et al. 2019).

Orale Infektionen über Faeces von infizierten Individuen sind für Alligatoren und Salzwasserkrokodile nachgewiesen (KLENK et al. 2004). Salzwasserkrokodile scheinen sich darüber hinaus auch über gemeinsam genutztes Poolwasser infizieren zu können (HABARUGIRA et al. 2020a). Ein ähnlicher direkter Infektionsweg ist weiterhin für Gänse im Zusammenhang mit Federpicken beschrieben (BANET-NOACH et al. 2003).

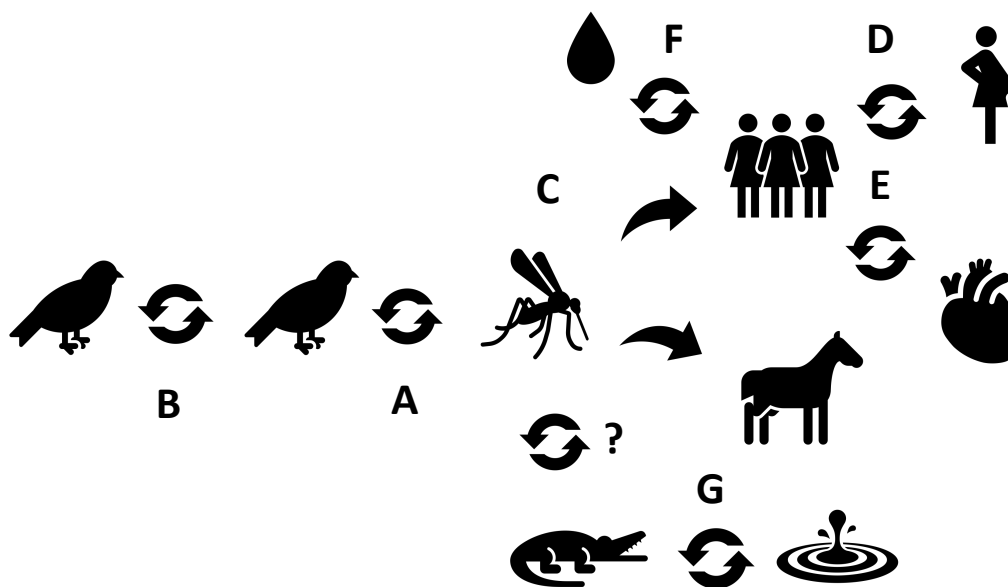


Abbildung 3: Infektionszyklus des WNV; Adaptiert nach (HABARUGIRA et al. 2020b)

A: Übertragung zwischen Amplifikationswirt Vogel und Hauptvektor Mosquito; B: Direkte Übertragung zwischen Vögeln durch z.B. Federpicken; C: Vektorgebundene Übertragung auf (Fehl)wirte wie Mensch, Pferd und Krokodil; D: Intrauterine Übertragung; E: Übertragung durch Organtransplantation; F: Übertragung über Bluttransfusionen; G: Übertragung über Poolwasser zwischen Krokodilen; erstellt mit Microsoft PowerPoint

2.1.3 Vektorspezies

Als Hauptüberträger des WNV weltweit sind vor allem Stechmücken des Genus *Culex* relevant. In Europa sind *Cx. pipiens*, *Cx. torrentium*, *Cx. modestus*, *Coquillettidia richardii* und *Anopheles maculipennis* als Überträger beschrieben (HUBALEK and HALOUZKA 1999, LELLI 2010, VOGELS et al. 2017). Speziell für Deutschland gelten die beiden Biotypen von *Cx. pipiens*, *Cx. pipiens* Biotyp *pipiens* und *Cx. pipiens* Biotyp *molestus* als Überträger. Gemeinsam mit der ebenfalls häufig in Deutschland vorkommenden Stechmückenart *Cx. torrentium* wurde für diese beiden Biotypen experimentell eine Vektorkompetenz beschrieben (JANSEN et al. 2019, ZIEGLER et al. 2020). Lange ging man davon aus, dass die ornithophilen *Culex*-Stechmücken nur für die Übertragung von Vogel zu Vogel verantwortlich sind. Heute ist bekannt, dass diese Moskitos auch Säugetiere stechen und somit ebenfalls als Brückenvektoren von Vögeln auf Säugetiere fungieren (HESSON et al. 2016, BRUGMAN et al. 2018).

Im Nahen Osten gelten *Cx. perexiguus*, *Cx. pipiens* und *Aedes (Ae.) caspius* als kompetente Vektoren (ORSCHAN et al. 2008). Auf dem afrikanischen Kontinent wurde erstmals *Ae. albopictus* als potenzieller Überträger diskutiert. Wenig später konnten auch *Cx. antennatus*, *Cx. univittatus* und

Cx. pipiens als potenzielle Vektoren in Afrika identifiziert werden (TAYLOR et al. 1956). Neben etlichen weiteren afrikanischen Moskitospezies konnten WNV-Isolate auch aus *Cx. theileri*, *Cx. neavei*, *Ae. vexans*, *Ae. circumluteolus* und *Coquillettidia metallica* gewonnen werden (HUBALEK and HALOUZKA 1999, SULE et al. 2018).

Auf dem nordamerikanischen Kontinent tragen vor allem *Cx. pipiens*, *Cx. restuans*, *Cx. quinquefasciatus* und *Cx. tarsalis* zur Übertragung des Virus bei (GODDARD 2002, KILPATRICK et al. 2005, DEGROOTE et al. 2008).

In Mittelamerika übertragen das Virus vor allem Vertreter der Spezies *Cx. interrogator* und *Cx. nigripalpus* (ULLOA et al. 2009).

Auf dem indischen Subkontinent konnte das Virus aus *Cx. quinquefasciatus* und *Cx. vishnui* isoliert werden (DANDAWATE et al. 1969, PARAMASIVAN et al. 2003). In China wurde das Virus in *Cx. pipiens*-Stechmücken nach einem Ausbruch beim Menschen gefunden (LU et al. 2014).

Abschließend gilt als Hauptvektor des WNV in Australien *Cx. annulirostris* (MACKENZIE et al. 1994).

Neben Stechmücken konnten auch verschiedene andere typische Vektorarten mit dem WNV in Verbindung gebracht werden. So konnten die Schildzeckenspezies *Dermacentor marginatus* und auch die Lederzecken *Argas hermanni* und *Ornithodoros capensis* experimentell mit dem Virus infiziert werden (HUBALEK and HALOUZKA 1999). Zusätzlich gelang es, aus den Zeckenarten *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus turanicus* und *Amblyomma variegatum* Virusisolate zu gewinnen (HUBALEK and HALOUZKA 1999).

2.1.4 Einflussfaktoren auf den Übertragungszyklus des West-Nil-Virus

Die Frage, warum es in manchen Regionen und zu manchen Zeitpunkten zu WNV-Epidemien bei Menschen und Tieren kommt, wurde wiederholt untersucht. Als Faktoren, welche eine WNV-Infektion positiv bedingen, ist zum Ersten das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl an Amplifikationswirten und Vektoren zu nennen. Bezüglich des Vorhandenseins von Amplifikationswirten wird ein Zusammenhang zwischen dem Aufkommen von WNV-Infektionen und Vogelschutzgebieten diskutiert (DURAND et al. 2005).

Weiterhin sind extreme Wetterereignisse wie Überflutungen, Dürren oder Hitzewellen als begünstigende Umstände beschrieben (LANDESMAN et al. 2007). Bei Überflutungen begünstigen die besseren Vermehrungsbedingungen für die Vektoren eine Übertragung. Bei Hitzewellen und generell bei anhaltenden hohen Temperaturen kommt es zu einer Verkürzung der extrinsischen Inkubationszeit. Das Virus wird in infizierten Stechmücken schneller infektiös und kann somit effizienter auf die folgenden Wirte übertragen werden (KILPATRICK et al. 2008, SOVEROW et al. 2009).

Letztlich beeinflusst auch die Artenvielfalt einer Vogelpopulation den Übertragungszyklus. Nach der Verdünnungshypothese gibt es kompetente und weniger kompetente Wirte für ein Pathogen. Weniger kompetente Wirte sind in diesem Fall Wirte, in denen sich das Virus nicht ideal vermehren kann. In einem Ökosystem mit hoher Biodiversität ist das Vorhandensein von weniger kompetenten Wirten wahrscheinlicher und ein Teil der Neuinfektionen wird von diesen wenig empfänglichen Wirten abgefangen. Da das Pathogen von diesen Wirten nicht oder nur unzureichend weitergegeben werden kann, spricht man davon, dass die Prävalenz des Virus in der Population „verdünnt“ wird.

Dieser Effekt ist auch am Beispiel des WNV und der amerikanischen Vogelpopulation beschrieben worden (SWADDLE and CALOS 2008, ALLAN et al. 2009).

2.1.5 Pathogenese und Erkrankungsformen nach West-Nil-Virus-Infektion

Nach dem Stich durch einen mit dem WNV infizierten Mosquito wird das Virus durch den infektiösen Speichel der Stechmücke auf den Wirt übertragen. Direkt nach der Übertragung kommt es zu einer Vermehrung in lokalen Zellen der Haut. Dabei kann es sich um Keratinozyten oder dendritische Zellen in der näheren Umgebung der Einstichstelle handeln (BYRNE et al. 2001, LIM et al. 2011). Anschließend kommt es zum Transport der Viruspartikel in die örtlichen Lymphknoten durch dendritische Zellen und von dort aus zu einer Weiterverbreitung des Virus über das Blut (SAMUEL and DIAMOND 2006). Mit dieser Virämie wird das Virus anschließend in viele verschiedene Organe transportiert, in denen es weitere Zellen infiziert, sich vermehrt und über einen längeren Zeitraum persistieren kann. Hierbei kommt es stark auf die infizierte Wirtsspezies an. Es gibt Vogelarten, in denen sich das Virus in nahezu allen inneren Organen repliziert (GAMINO and HOFLE 2013). Beim Pferd hingegen scheint die Infektion vor allem auf das zentrale Nervensystem beschränkt zu sein (CANTILE et al. 2001).

Das Nervensystem ist außerdem als klinisch wichtigstes Organ zu nennen. Da das Virus das Nervensystem infiltriert, also Viruspartikel im Nervengewebe von erkrankten Individuen nachweisbar sind, wird diese Form der WNV-Erkrankung auch die neuroinvasive Form bzw. WNV-Enzephalomyelitis genannt.

Verschiedene Möglichkeiten, mit welchen das Virus das Zentralnervensystem (ZNS) erreicht, sind beschrieben und werden kontrovers diskutiert. Zum einen gibt es die Hypothese des Transports des Virus zum ZNS auf dem hämatogenen Weg, da hohe Viruskonzentrationen im Blut mit einem schnelleren Übertritt in das ZNS assoziiert sind (JOHNSON and MIMS 1968). Das Überwinden der Bluthirnschranke erfolgt durch eine im Rahmen der Entzündung durchlässig gewordenen Barriere infolge der Einwirkung proinflammatorischer Akute-Phase-Proteine (WANG et al. 2004).

Alternativ überwindet das Virus die Bluthirnschranke durch einen „trojanisches Pferd“-Mechanismus, bei welchem periphere, bereits infizierte Leukozyten in das Nervengewebe rekrutiert werden und anschließend über unterschiedliche Wege ins Neuroparenchym einwandern (RANSOHOFF et al. 2003, GARCIA-TAPIA et al. 2006). Als weitere Möglichkeit wird der retrograde axonale Transport von Viruspartikeln über periphere Nerven ins ZNS diskutiert (SAMUEL et al. 2007).

Pathologisch zeigen sich je nach Krankheitsverlauf der Infektion unterschiedliche, wenig spezifische Befunde. So können sich durch die direkte Einwirkung des Virus bedingte oder sekundäre Schäden darstellen, die in Folge der Immunreaktion auf das Virus entstanden sind (GAMINO and HOFLE 2013). Die neuroinvasive Form äußert sich in der Ausbildung einer Polioenzephalomyelitis (DEBIASI and TYLER 2006). Beim Menschen kommt es im Hirnstamm, den Basalkernen, dem Kleinhirn und dem Ventralhorn des Rückenmarks zu Läsionen. Es zeigen sich perivaskuläre Infiltrate, Mikroglia-Knötchen, Neuronophagie und in manchen Fällen Nekrosen (KELLEY et al. 2003, BYAS and EBEL 2020). Beim Pferd werden ähnliche pathologische Befunde nach neuroinvasivem Verlauf vorgefunden. Betroffene Areale sind bei dieser Spezies der untere Hirnstamm und der thorakolumbale Teil des Rückenmarks. In diesen Abschnitten kommt es zu einer lymphozytären

Polioenzephalomyelitis, Blutungen, Mikroglia-Knötchen und perivaskulären Manschetten (CANTILE et al. 2001, PORTER et al. 2003).

2.1.6 West-Nil-Virus-Erkrankung bei Menschen und Pferden

Bei einigen Säugetierspezies sind Erkrankungen nach der Infektion mit dem WNV beschrieben. Unter Public Health-Gesichtspunkten stellen Erkrankungen bei Menschen und Pferden allerdings die bedeutsamsten dar. Mensch und Pferd ist gemein, dass nur ein Teil der infizierten Individuen klinische Symptome nach einer Infektion mit dem WNV entwickelt. Es erkranken ca. 20 % der infizierten Pferde und bis zu 20 % der infizierten Menschen (KRAMER et al. 2007, ZOU et al. 2010, BYAS and EBEL 2020, CAVALLERI et al. 2022).

Entwickelt sich so eine klinische Erkrankung, so zeigen infizierte Menschen zwei bis 14 Tage nach der Infektion die unspezifischen Symptome einer fiebrigen Allgemeinerkrankung ähnlich der Grippe. Diese äußern sich in Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen und sowie Erschöpfung. Bei einem Teil der Patienten kommt es außerdem zu Hautausschlägen, Durchfall und Erbrechen (HAYES and GUBLER 2006).

Es wird angenommen, dass sich bei einem von 140 Infizierten ein neuroinvasiver Verlauf der Erkrankung entwickelt, (MOSTASHARI et al. 2001). Infolge einer Meningoenzephalitis kommt es zu massiven neurologischen Symptomen wie schlaffen Lähmungen, Bewusstseinsstörungen, Photophobie und Krampfanfällen bis hin zum Koma (NASH et al. 2001, PIETSCH et al. 2020).

Beim Pferd zeigen ca. acht bis zehn Prozent der infizierten Individuen schwere neurologische Symptome (GARDNER et al. 2007). Prinzipiell zeigen klinisch erkrankte Pferde initial die wenig spezifischen Symptome einer fiebrigen Allgemeinerkrankung, welche im weiteren Verlauf in neurologische Symptome übergehen können.

Neben einer Ataxie, welche das am häufigsten beobachtete Symptom ist, kommt es auch noch zu Muskelfaszikulationen und Schwäche der Gliedmaßen bis hin zum Festliegen. Initial können betroffene Pferde auch Fieber, Fressunlust, Koliksymptome oder eine Lahmheit zeigen (OSTLUND et al. 2001, ANGENVOORT et al. 2013). In manchen Fällen kann es auch zu Kopfnervendefiziten kommen, die sich je nach Neurolokalisation beispielsweise als Dysphagie, Gesichtslähmungen oder in einem Verlust der Drohanwort zeigen können (PORTER et al. 2003). Alternativ kann sich auch eine Photophobie, Somnolenz, aggressives Verhalten und sogar Blindheit einstellen (MURGUE et al. 2001, OSTLUND et al. 2001, PORTER et al. 2003, GARCIA-BOCANEGRA et al. 2011).

Die Art der ausgebildeten Symptome ist nicht abhängig davon, ob es sich um eine WNV-Infektion der Linien eins oder zwei handelt (KUTASI et al. 2011). Trotz einer hohen Überlebensrate, im Vergleich zu anderen Enzephalitiden des Pferdes, überleben 28 % bis 43 % der neurologisch erkrankten Tiere die Infektion nicht. Dabei wird ein Großteil der Fatalitäten einer Euthanasie aufgrund der massiven Belastungen durch die Erkrankung zugeschrieben (WEESE et al. 2003, SALAZAR et al. 2004, WARD et al. 2006, KUTASI et al. 2011).

Studien zu Faktoren, welche einen tödlichen Infektionsverlauf bedingen, sind zum Teil widersprüchlich. Als Faktor mit negativem Einfluss auf die Überlebensrate von erkrankten Pferden wurde wiederholt Festliegen festgestellt (PORTER et al. 2003, SALAZAR et al. 2004, SCHULER et al. 2004).

Weiterhin haben Arbeiten wiederholt das Fehlen einer Impfung gegen WNV-Enzephalomyelitis als Risikofaktor für einen klinischen und insbesondere einen letalen Verlauf nach einer WNV-Infektion aufgezeigt (SALAZAR et al. 2004, SCHULER et al. 2004).

Zusätzlich haben nach Salazar et al. (2004) weibliche Pferde ein erhöhtes Risiko, eine WNV-Erkrankung nicht zu überleben (SALAZAR et al. 2004). Eine andere Studie weist wiederum ein erhöhtes Risiko für Hengste nach, an einer Erkrankung zu versterben (EPP et al. 2007b).

Überlebende Tiere behalten teilweise Langzeitfolgen, sogenannte Sequelae, wie Gewichts- und Ausdauerverlust, Lethargie, Ataxie und Gesichtslähmungen zurück (SALAZAR et al. 2004).

2.1.7 Diagnostik und tierseuchenrechtliche Einordnung

Die Diagnose einer WNV-Infektion ist in der Human- wie in der Veterinärmedizin über verschiedene Wege möglich. Generell bietet sich der direkte Erregernachweis aus Blut, Liquor oder anderen Geweben mittels Virusanzucht oder Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) an. Beim Menschen gelingt der direkte RNS-Nachweis außerdem oft aus dem Urin der Patienten, da das WNV dort über einen längeren Zeitraum und in größeren Mengen als in Blut oder Liquor nachweisbar ist (BARZON et al. 2013). Beim Pferd fehlen vergleichbare Berichte bislang.

Aufgrund der sehr kurzen Virämie bei Pferd und Mensch hat in vielen Fällen der indirekte serologische Nachweis von Antikörpern der Klasse IgM aus Blut oder Liquor eine große praktische Bedeutung bei der definitiven Diagnosefindung (PIETSCH et al. 2020, CAVALLERI et al. 2022, LOHMANN et al. 2022). Der Nachweis dieser Antikörper erfolgt oft mit kommerziell erhältlichen Enzym-gekoppelten Immunsorptionsassays (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA). Als Alternativen zum ELISA können beispielsweise auch Hämagglutinationshemmungs- oder Immunfluoreszenztests für ein Screening genutzt werden.

Die definitive Diagnose erfolgt beim Menschen über die typische klinische Präsentation (Fieber, Meningitis, Enzephalitis) in Kombination mit entweder der Virusisolation oder dem RNS-Nachweis aus Blut oder Liquor, dem IgM Antikörper-Nachweis aus dem Liquor oder einem hohen Serum-IgM-Titer in Verbindung mit dem Nachweis von Immunglobulin-G (IgG) Antikörpern mit anschließender Bestätigung im Neutralisationstest (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL 2021).

Nach der Weltorganisation für Tiergesundheit (WOAH) bestätigen die folgenden Kriterien die Diagnose des West-Nil-Fiebers (WNF) beim Pferd:

- Isolation des WNV von einem Tier, das Anzeichen zeigt, die auf WNF hindeuten.
- Nachweis eines WNV-spezifischen Antigens oder einer WNV-spezifischen Ribonukleinsäure in Proben von einem oder mehreren Tieren, die klinische Symptome aufweisen, die mit WNF übereinstimmen, oder die epidemiologisch mit einem bestätigten oder vermuteten Ausbruch von WNF in Verbindung stehen.
- Der Nachweis von IgM-Antikörpern gegen das WNV von einem ungeimpften Tier, das klinische Symptome aufweist, die mit WNF vereinbar sind, oder das epidemiologisch mit einem bestätigten oder vermuteten Ausbruch von WNF in Verbindung gebracht wird (WOAH 2021).

Diese Kriterien stellen in Deutschland ebenfalls die Definition für einen an das Tierseucheninformationssystem zu übermittelnden Fall dar (FRIEDRICH LOEFFLER-INSTITUT 2022). Der Nachweis des WNV bei Pferd und Vogel stellt in Deutschland eine anzeigepflichtige Tierseuche dar. Diese Anzeigepflicht gilt prinzipiell zur Eindämmung bzw. Tilgung einer Tierseuche vor ihrer Weiterverbreitung. Anzeigepflichtig ist nicht nur der Nachweis der Tierseuche, sondern auch der Verdacht auf einen Ausbruch. Tierärzte und Halter sind verpflichtet den Nachweis einer WNV-Infektion bzw. den Verdacht unverzüglich bei der zuständigen Behörde anzuzeigen. Dies ist in der Regel das zuständige Veterinäramt. Seit 2021 wird der Rechtsrahmen für die Vorbeugung und Bekämpfung gelisteter Tierseuchen durch Verordnung (EU) 2016/429, auch Animal Health Law (AHL) genannt, vorgegeben (EUROPÄISCHES PARLAMENT 2016). Das WNV ist ebenfalls im Anhang II der Delegierten Verordnung EU 2018/1629 der Europäischen Kommission zu finden und wurde dort in Kategorie E eingeteilt. Infektionskrankheiten dieser Kategorie unterliegen auch innerhalb der Europäischen Union einer Überwachung. Erkrankungen der Kategorie E werden charakterisiert als Infektionen mit unterschiedlichem aber gelegentlich hohem Risiko, bei denen bis heute wirkungsvolle Bekämpfungsmaßnahmen aufgrund eines Wildtierreservoirs und/oder einer vektorabhängigen Übertragung fehlen. Der Nachweis einer Infektion beim Pferd hat somit meist keine konkreten Konsequenzen für den Halter und eine Tötungsanordnung für das betroffene Tier oder den Bestand steht nicht im Raum (NIEDERSÄCHSISCHES LANDESAMT FÜR VERBRAUCHERSCHUTZ UND LEBENSMITTELSICHERHEIT 2021).

2.1.8 West-Nil-Virus-Seroprävalenzstudien

Weltweit wurden bereits viele Studien zur Ermittlung der WNV-Seroprävalenz bei Pferden durchgeführt. Ungeimpfte Populationen gelten als gute Sentinel-Spezies für die WNV-Überwachung, da sie nach einer WNV-Infektion teilweise neurologische Symptome zeigen und zuverlässig Antikörper ausbilden (ANGELINI et al. 2010, PATERNOSTER et al. 2017, METZ et al. 2021). Somit wurden ortsansässige Pferdepopulationen in der Vergangenheit als Frühwarnsystem für WNV-Infektionen beim Menschen erprobt (LEBLOND et al. 2007, CHEVALIER et al. 2011). Gerade in Ländern Südosteuropas, in denen das Virus bereits seit Jahrzenten vorkommt, ist die Seroprävalenz von Pferdepopulationen wiederholt untersucht worden. Einen Überblick über die europäische Studienlage gibt Tabelle eins. Generell gilt, dass sich die Ergebnisse der einzelnen Studien nur bedingt vergleichen lassen.

Zum einen spielt durch die hohe Kreuzreaktivität der Flaviviren der diagnostische Test eine große Rolle. So kann nur sicher von Antikörpern gegen das WNV ausgegangen werden, wenn diese im Serumneutralisationstest bestätigt wurden (BECK et al. 2013). Weiterhin tragen Faktoren wie Jahr, Jahreszeit, Ort der Probensammlung und verwendete Probenmatrix zur Diversität der Seroprävalenzstudien bei (OLUFEMI et al. 2021). Wie man anhand der Tabelle eins gut sehen kann, variieren die Ergebnisse der Studien stark. Beispielsweise untersuchte die Gruppe um Durand im Jahr 2000 über 5000 Pferde direkt nach einem WNV-Ausbruch bei Pferden in Südfrankreich im Umkreis von zehn km um den ersten bestätigten Fall. Dabei wurde eine Seroprävalenz von 8,5 % mittels eines IgG ELISAs ohne Bestätigung im sensitiven VNT ermittelt (DURAND et al. 2002). Im Gegensatz dazu untersuchte die Gruppe von Madic zwischen 2001 und 2002 980 zufällig ausgewählte Pferde aus ganz Kroatien, ohne dass dieser Untersuchung eine akute WNV-Epidemie vorangegangen war. Die

Seroprävalenz betrug 0,4 % und alle positiven IgG-Ergebnisse wurden im VNT bestätigt (MADIC et al. 2007).

In Deutschland wurde bereits wiederholt die WNV-Seroprävalenz von Pferden untersucht. Erstmals fand eine Untersuchung in den Jahren 2007 bis 2009 statt. Hier wurden bis auf vier Ausnahmen keine Antikörper gegen das WNV festgestellt. 3 Pferde stellten sich später als geimpft und eines als aus Ungarn importiert heraus (ZIEGLER et al. 2012). Eine weitere Studie aus den Jahren 2009 bis 2011 stellte erneut keine positiven serologischen Befunde für WNV-Infektionen bei Pferden in Deutschland fest (ZIEGLER et al. 2013). Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass bis zu diesem Zeitpunkt keine autochthonen Infektionen in Deutschland stattgefunden hatten. Im Jahr 2018 traten schließlich die ersten zwei Fälle bei Pferden in Deutschland auf (ZIEGLER et al. 2020). Genomische Analysen deuteten darauf hin, dass der Eintrag des Virus der Linie zwei im Jahr 2016 aus Tschechien erfolgt ist (ZIEGLER et al. 2019). Nach dem Eintrag des WNV nach Deutschland wurden weitere Seroprävalenzstudien angefertigt. So konnten in den Jahren 2019 und 2020 in der Klinikpopulation der Klinik für Pferde, allgemeine Chirurgie und Radiologie der Freien Universität Berlin Seroprävalenzen von 8,2 % bzw. 13,8 % gezeigt werden (BERGMANN et al. 2022).

Eine weitere Studie, die Pferde in Sachsen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg untersuchte, zeigte eine Seroprävalenz von 5,8 % (GANZENBERG et al. 2022).

2.1.9 Tabelle 1 Equine West-Nil-Virus-Seroprävalenzstudien aus Europa von 1999 bis 2022.

Zeitraum	Region/Land	Anzahl Equiden	IgG ^a positiv	VNT ^b -positiv	MIA ^c -positiv	IgM ^d -positiv	Prävalenz (Test)	Quelle
1998-1999	Italien (Toskana)	282	106	-	-	-	38% (IgG-ELISA)	Autorino et al. 2002
2000	Frankreich (Camarque)	5107	432	-	-	182	8,5% (IgG-ELISA)	Durand et al. 2002
2001	Austria	350	-	0	-	-	0% (VNT)	Weissenböck et al. 2003
2001-2008	Griechenland	7549	-	302	-	-	4% (VNT)	Mangana-Vougiouka et al. 2013
2002	Kroatien	980	4	4	-	-	0,4% (VNT)	Madic et al. 2007
2003	Frankreich	906	305	-	-	23	34% (IgG-ELISA)	Durand et al. 2005
2004-2010	Portugal	1313	46	40	-	2	3.1% (ELISA ^e)	Barros et al. 2011
2005	Spanien (Donana)	157	-	13	-	-	8,3% (VNT)	Jimenez-Clavero et al. 2007
Unklar	Türkei	299	-	36	-	-	12.0% (VNT)	Ozkul et al. 2006
2006-2007	Rumänien	167	56	-	-	-	33,5% (ELISA)	Savuta et al. 2007
2006	Rumänien	382	58	-	-	-	15,2% (ELISA)	Ludu et al. 2014
2007		283	185	-	-	-	65,4% (ELISA)	
2008		1031	179	-	-	-	17,4 % (ELISA)	
2007-2009	Deutschland	1282	1	0	-	-	0,1% (VNT)	Ziegler et al. 2012
2008	Italien	2030	-	794	-	-	39,1% (VNT)	Calistri et al. 2010
2008-2009	Italien	2528	348	348	-	2	13,8% (VNT)	Busani et al. 2011
2008-2011	Slowakei	229	-	19	-	-	8,3% (VNT)	Hubalek et al. 2013
2008-2012	Serbien	1133	-	45	-	-	4,0% (VNT)	Duricic et al. 2013
2009-2010	Serbien	349	42	42	-	-	12% (VNT)	Lupulovic et al. 2011

^a Immunglobulin G, ^b Virusneutralisationstest, ^c Multiplex immunoassay, ^d Immunglobulin M, ^e Enzyme-linked immunosorbent assay

Zeitraum	Region/Land	Anzahl Equiden	IgG ^a positiv	VNT ^b -positiv	MIA ^c -positiv	IgM ^d -positiv	Prävalenz (Test)	Quelle
2010	Griechenland	70	24	-	-	0	33% (ELISA ^e)	Bouzalas et al. 2016
2010	Spanien	510	54	36	-	-	7,1% (VNT)	Garcia-Bocanegra et al. 2012
2010	Spanien	165	22	12	-	-	7,3% (VNT)	Garcia-Bocanegra et al. 2012
2010-2011	Ukraine	310	49	42	-	0	13,5% (VNT)	Ziegler et al. 2013
2010-2011	Spanien	109	17	12	-	-	11,0% (VNT)	Garcia-Bocanegra et al. 2012
2010-2011	Kroatien	2098	100	73	-	-	3,4% (VNT)	Barbic et al. 2012
2010-2012	Deutschland	5178	61	2	-	0	0,04% (VNT)	Ziegler et al. 2013
2010-2014	Polen	378	1	-	-	0	0,26% (ELISA)	Niczyporuk et al. 2015
2010-2019	Spanien (Katalonien)	1856	182	92	-	-	5% (VNT)	Napp et al. 2021
2011	Spanien	178	0	0	-	0	0%	Alba et al. 2014
2011	Türkei	180	-	57	-	-	31,7% (VNT)	Ozkul et al. 2013
2011	Rumänien	808	473	-	-	-	58,5% (ELISA)	Ludu et al. 2012
2011	Sardinien	253	87	-	-	-	34,3%	Spissu et al. 2013
2011-2012	Spanien	172	-	-	11	-	6,4% (MIA)	Vanhomwegen et al. 2017
2011-2013	Türkei	389	-	48	-	-	12,3%(VNT)	Ergunay et al. 2014
2011-2013	Spanien	369	5	5	-	1	1.4% (VNT)	Abad-Cobo et al. 2017
2011-2016	Portugal	989	44	26	-	-	1.8% (VNT)	Barros et al. 2017
2012	Albanien	167	44	37	-	-	22,2% (VNT)	Berxholi et al. 2013

^a Immunglobulin G, ^b Virusneutralisationstest, ^c Multiplex immunoassay, ^d Immunglobulin M, ^e Enzyme-linked immunosorbent assay

Zeitraum	Region/Land	Anzahl Equiden	IgG ^a positiv	VNT ^b -positiv	MIA ^c -positiv	IgM ^d -positiv	Prävalenz (Test)	Quelle
2012-2013	Polen	411	-	62	-	-	15,1% (VNT)	Bazanow et al. 2018
2013	Slowakei	145	17	10	-	0	6,9% (VNT)	Csank et al. 2018
2014	Korsica	96	9	9	-	-	9,4% (VNT)	Maquart et al. 2017
2014	Serbien	752	52	-	-	-	6,9% (ELISA ^e)	Petrovic et al. 2018
2015		3238	-	-	-	17	0,5% (IgM-ELISA)	
2017-2018	Spanien	138	31	9	-	0	6,5% (VNT)	Busquets et al. 2019
2017	Österreich	342	90	18	-	0	5,3% (VNT)	de Heus et al. 2021
2018	Kosovo	260	27	27	-	-	10,4% (VNT)	Rexhepi et al. 2021
2018	Kroatien	2574	307	-	-	20	11,9% (ELISA)	Vilibic-Cavlek et al. 2019
2018-2019	Spanien (Extramadura)	725	199	143	-	16	19,7% (VNT)	Guerrero-Carvajal et al. 2021
2018-2020	Deutschland	437	52	36	-	8	8,5% (VNT)	Bergmann et al. 2022
2019	England	988	274	-	-	2	27,7 (ELISA)	Folly et al. 2020
2020	Deutschland	940	106	54	-	6	5,8% (VNT)	Ganzenberg et al. 2022

^a Immunglobulin G, ^b Virusneutralisationstest, ^c Multiplex immunoassay, ^d Immunglobulin M, ^e Enzyme-linked immunosorbent assay

2.1.10 Risikofaktoren für eine West-Nil-Virus-Infektion beim Pferd

Neben der Seroprävalenz wurden in viele Studien auch Daten über die Pferdepopulationen erhoben. Anhand dieser Daten konnten in manchen Fällen Verbindungen zwischen einem positiven bzw. negativen Serologieergebnis und anderen Faktoren festgestellt werden. Da diese Faktoren eine Infektion mit dem WNV für diese Subpopulationen wahrscheinlicher bzw. unwahrscheinlicher machen, spricht man von Risikofaktoren.

Der am häufigsten festgestellte Risikofaktor ist das Alter (CHEVALIER et al. 2006, CHEVALIER et al. 2010, AHMADNEJAD et al. 2011, BEN HASSINE et al. 2014, CARDINALE et al. 2017). Man geht davon aus, dass in Gebieten, in denen das WNV endemisch ist und es zu regelmäßigen Infektionen kommt, ältere Tiere eine höhere Wahrscheinlichkeit aufweisen seropositiv zu sein, da der Zeitraum in dem sie einem potenziellen Infektionsereignis ausgesetzt waren größer ist als bei jüngeren Tieren. Dieser Effekt konnte in vielen Ländern Afrikas, in denen das Virus seit Jahrzehnten zirkuliert, nachgewiesen werden.

Studien, die erst wenige Jahre nach dem erstmaligen Eintrag des Virus durchgeführt wurden, konnten diesen Alterseffekt jedoch nicht nachweisen. So konnte in Kanada und Deutschland kein Zusammenhang zwischen dem Alter und der Seropositivität der Tiere festgestellt werden (EPP et al. 2007a, GANZENBERG et al. 2022). Da das Virus zum Zeitpunkt der Datenerhebung erst wenige Jahre in den entsprechenden Regionen zirkulierte, waren Pferde dem Infektionsgeschehen eine zu geringe Zeit lang ausgesetzt, um diesen Effekt zu zeigen. Eine weitere Studie aus Deutschland zeigte im Gegenteil das höchste Risiko WNV-seropositiv zu sein bei Pferden mittleren Alters (BERGMANN et al. 2022).

Weiterhin konnten Studien in Regionen, in denen das WNV seit langem endemisch ist, diesen Alterseffekt ebenfalls nicht zeigen (DURAND et al. 2002, ABUTARBUSH and AL-MAJALI 2014).

Ein weiterer häufig in der Literatur beschriebener Risikofaktor ist der Aufenthaltsort der Tiere. Man geht davon aus, dass es Regionen gibt, in denen die Bedingungen für eine Übertragung günstiger sind als in anderen. Dabei handelt es sich beispielsweise um Umweltbedingungen, die die Vermehrung der Stechmückenpopulation begünstigen und so zu einer vermehrten Übertragung des WNV auf Menschen und Pferde beitragen. So wurden in der kanadischen Provinz Saskatchewan Ökoregionen mit besonders günstigen Bedingungen für die Vermehrung des Hauptvektors *Cx. tarsalis* mit einem erhöhten Infektionsrisiko beim Pferd in Verbindung gebracht (CURRY 2004, EPP et al. 2007a).

Studien aus Jordanien und Deutschland lassen einen ähnlichen Zusammenhang vermuten (ABUTARBUSH and AL-MAJALI 2014, GANZENBERG et al. 2022).

Weiterhin brachten Arbeiten aus Israel und Palästina eine erhöhte Seroprävalenz mit dem großen afrikanischen Grabenbruch in Verbindung, durch den viele Zugvogelrouten führen. Es wird in diesem Fall von einer vermehrten Einschleppung des Virus in dieses Gebiet durch Zugvögel ausgegangen (MALKINSON et al. 2002, AHARONSON-RAZ et al. 2014, AZMI et al. 2017). Dieser Zusammenhang mit Gebieten, in denen es zu einem vermehrten Zugvogelvorkommen und einer erhöhten Seroprävalenz beim Pferd kommt, wurde ebenfalls in Brasilien und Frankreich nachgewiesen (DURAND et al. 2005, DE OLIVEIRA-FILHO et al. 2021).

Weniger oft werden individuelle Faktoren wie Geschlecht oder Fellfarbe als Risikofaktoren beschrieben. Eine Studie aus Ägypten attestierte Hengsten, sowie Pferden gemischter Rassen ein

erhöhtes Infektionsrisiko. Als mögliche Begründung werden die Unterschiede in der Stechmückenexposition durch Haltung und Arbeit der Tiere genannt. Die Region, in welcher die Pferde lebten, spielte in dieser Studie keine Rolle (SELIM et al. 2021).

In einer in Deutschland durchgeführten Studie wurde ein geringeres Infektionsrisiko für Ponys diskutiert. Weitere Risikofaktoren dieser Studie umfassten ständige Außenunterbringung während der Moskito-Saison, das Vorhandenseins eines Weideunterstandes sowie den Standort der Pferde in einem Landkreis mit bereits aufgetretenen WNV-Fällen beim Pferd (GANZENBERG et al. 2022).

2.2 Das Usutu-Virus

2.2.1 Taxonomie und Struktur

Das USUV wurde 1959 in der Nähe des namensgebenden Usutu Flusses in Swasiland erstmals beschrieben und wird genau wie das WNV dem Japanischen-Enzephalitis-Serokomplex zugeordnet (WILLIAMS et al. 1964, POIDINGER et al. 1996).

Das 40-60 nm im Durchmesser umfassende Virion enthält das etwa elf Kilobasen lange RNS-Genom mit positiver Polarität (BAKONYI et al. 2004). Weiterhin kann das USUV in acht verschiedene genetische Linien eingeteilt werden. Diese setzen sich aus fünf europäischen (Europe 1-5) und drei afrikanischen (Africa 1-3) Linien zusammen (CADAR and SIMONIN 2022). Da das WNV und das USUV als nahe Verwandte ein ähnliches Hüllprotein haben, kommt es zu einer immunologischen Kreuzreaktivität (NIKOLAY et al. 2014).

2.2.2 Übertragung und Epidemiologie

Nach der ersten Isolierung in Afrika, ging man lange davon aus, dass das Verbreitungsgebiet des Virus auf die Tropen und Subtropen Afrikas beschränkt ist (WILLIAMS et al. 1964). Seit seinem ersten Auftreten in Mitteleuropa im Jahr 2001 ist das Virus jedoch auch in mehreren europäischen Ländern isoliert worden (WEISSENBOCK et al. 2002, VILIBIC-CAVLEK et al. 2020). Aufgrund eines dem WNV sehr ähnlichen Übertragungszyklus, überschneiden sich diese beiden Viren in Bezug auf ihre Wirts- und Vektorpopulationen in Europa erheblich (NIKOLAY 2015). Ebenso wie das WNV wird das USUV von Stechmücken übertragen und Vögel bilden das natürliche Reservoir. Insbesondere Amseln (*Turdus merula*), Bartkäuze (*Strix nebulosa*) und Haussperlinge (*Passer domesticus*) gelten als hochempfindlich (WEISSENBOCK et al. 2003, CHVALA et al. 2007).

Als Vektor mit der größten Bedeutung wird analog zum WNV auch für das USUV *Cx. pipiens* in der Literatur genannt (COOK et al. 2018). Genauso wie beim WNV stellen die meisten Säugetiere wie auch Pferd und Mensch Fehlwirte dar, da sie nach einer Infektion nicht zum Übertragungszyklus beitragen (ZANNOLI and SAMBRI 2019, CONSTANT et al. 2022).

2.2.3 Klinik und Pathogenese

Ähnlich wie WNV und FSMEV (s. u.) kann das USUV in seltenen Fällen einen durch die Symptome einer Meningitis bzw. Meningoenzephalitis gekennzeichneten neuroinvasiven Krankheitsverlauf beim Menschen verursachen. Im deutlichen Unterscheid zum WNV sind beim USUV bisher keine klinischen Symptome beim Pferd nach einer Infektion mit dem Virus beschrieben (PECORARI et al. 2009, SANTINI et al. 2015, CAVALLERI et al. 2022). Das Virus war allerdings für mehrere

Massensterben von wilden Amseln in verschiedenen Regionen Europas verantwortlich (WEISSENBOCK et al. 2002, BECKER et al. 2012, LECOLLINET et al. 2016, BAKONYI et al. 2017, HONIG et al. 2019).

2.2.4 Diagnostik

Die Diagnosefindung beim Menschen wie beim Tier kann prinzipiell über den direkten Virusnachweis mittels RT-PCR oder real time RT-PCR aus Blut und Organmaterial erfolgen (WEISSENBOCK et al. 2002, JOHNSON et al. 2010).

In der Regel erfolgt der Nachweis beim Menschen aber über die Serologie. Hier sind ähnlich wie beim WNV und dem FSMEV IgM und IgG-ELISAs zum initialen Nachweis in Verwendung. Hierbei werden ein Antikörperklassenwechsel von IgM zu IgG oder ein vierfacher Titeranstieg in zwei im Abstand von zehn Tagen entnommenen Proben als beweisend angesehen. Diese Ergebnisse müssen dann anschließend zum Ausschluss von kreuzreagierenden Antikörpern anderer nahe verwandter Flaviviren wie z. B. dem FSMEV oder dem WNV im Virusneutralisationstest bestätigt werden (PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014)(PAULI et al. 2014).

Beim Pferd erfolgt der Nachweis prinzipiell ähnlich und analog zu WNV und FSMEV (CAVALLERI et al. 2022).

Zum Nachweis des USUV aus Vögeln sind weiterhin auch ein Hämagglutinationshemmtest sowie ein indirektes Immunfluoreszenzverfahren beschrieben (BUCKLEY et al. 2003, MEISTER et al. 2008, GANZENBERG 2022).

2.3 Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

2.3.1 Taxonomie und Struktur

Das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV), oder auf Englisch tick-borne encephalitis virus (TBEV), gehört genau wie das WNV zur Familie der Flaviviren und zum Genus *Flavivirus*. Das einzelsträngige RNS-Genom ist in etwa elf Kilobasen groß, besitzt eine positive Polarität und weist genau wie das des WNV ein offenes Leseraster auf. Das aus der Translation entstehende Polyprotein wird in drei Struktur- und sieben Nichtstrukturproteine eingeteilt (ECKER et al. 1999, DEVIATKIN et al. 2020).

Weiterhin wird TBEV genetisch in fünf verschiedene Subtypen eingeteilt und kommt in weiten Teilen Eurasiens vor. Es werden der europäische (TBEV-EU), der sibirische (TBEV-Sib), der fernöstliche (TBEV-FE), der Baikal- (TBEV-Bik) und der Himalaya-Subtyp (TBEV-Him) unterschieden (DAI et al. 2018, HOLDING et al. 2019, WONDIM et al. 2022). Der in Deutschland vorkommende europäische Subtyp ist von Südkandinavien bis vereinzelt nach Nordafrika auf dem gesamten Kontinent verbreitet.

2.3.2 Übertragung und Epidemiologie

In Europa wird das FSMEV vor allem von Zecken der Art *Ixodes ricinus* auf Menschen und Tiere übertragen (ESTRADA-PENA and DE LA FUENTE 2014). Aber auch die Auwaldzecke (*Dermacentor reticulatus*) gilt in endemischen Arealen Deutschlands als kompetenter Vektor des Virus (CHITIMIA-DOBLER et al. 2019).

Dabei infizieren sich die subadulten Zeckenstadien in Naturherden über Blutmahlzeiten an kleinen Säugetieren mit dem Virus (IMHOFF et al. 2015). Kleinsäuger wie Rötelmäuse (*Clethrionomys glareolus*), Gelbhalsmäuse (*Apodemus flavicollis*) oder Waldmäuse (*Apodemus sylvaticus*) sind bedeutende Reservoirwirte in Europa (TONTERI et al. 2013, BRANDENBURG et al. 2023).

Da die Infektion über alle Entwicklungsstadien der Zecken erhalten bleibt, erfolgt eine Infektion von Vögeln und größeren Säugetieren, wie zum Beispiel dem Menschen, vor allem durch Nymphen und adulte Stadien von *Ixodes ricinus* (DEVIATKIN et al. 2020).

Die Gefahr sich als Mensch mit dem FSMEV zu infizieren wird in Deutschland auf Basis der Meldezahlen durch das Robert Koch Institut in Form von Risikogebieten angegeben. Ein Kreis wird als Risikogebiet definiert, wenn die Anzahl der übermittelten FSME-Erkrankungen in mindestens einem der 17 Fünfjahreszeiträume im Zeitraum 2002 – 2022 im Kreis oder in der Kreisregion (bestehend aus dem betreffenden Kreis plus allen angrenzenden Kreisen) signifikant ($p < 0,05$) höher liegt als die Inzidenz von einer Erkrankung pro 100.000 Einwohner erwartete Fallzahl. Die Risikogebiete erstrecken sich vorwiegend vom Süden Deutschlands (Baden-Württemberg, Bayern) über die östlichen Mittelgebirgsregionen (Südthüringen, Südhessen und Südsachsen) bis in die norddeutsche Tiefebene (Südbrandenburg) (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a).

Neben dem Stich durch eine infizierte Zecke erfolgen etwa ein Prozent aller FSMEV-Infektionen alimentär über nicht pasteurisierte Milchprodukte von Wiederkäuern (HOLZMANN et al. 2009, BROCKMANN et al. 2018). Auch Organtransplantationen und Bluttransfusionen stellen eine selten auftretende Infektionsmöglichkeit dar (LIPOWSKI et al. 2017).

Pferde infizieren sich in aller Regel - ebenso wie Menschen - über Zeckenstiche mit dem FSMEV. Sie gelten als gute Sentinel-Spezies (PAUTIENIUS et al. 2021). Die FSMEV-Seroprävalenz von Pferden wurde in der Vergangenheit in Deutschland wiederholt untersucht. So wurde im Jahr 2003 eine Seroprävalenz von 23,4 % für Bayern und Baden-Württemberg festgestellt (JANITZA-FUTTERER 2003). Im hessischen Marburg-Biedenkopf wurde im selben Jahr eine Seroprävalenz von 2,9 % ermittelt (MUELLER 2006).

In der Vergangenheit gaben Studien, die ursprünglich die Ermittlung der WNV-Seroprävalenz zum Ziel hatten, aufgrund der Kreuzreaktivität der beiden Viren auch wiederholt Aufschluss über die Epidemiologie von FSMEV in der deutschen Pferdepopulation, da im Zuge der Ausdifferenzierung der untersuchten Seren im VNT auch neutralisierende Antikörper gegen FSMEV nachgewiesen wurden. So konnte eine Untersuchung zur WNV-Seroprävalenz von 2010 bis 2012 FSMEV-spezifische Antikörper in 18 Pferden aus drei Bundesländern nachweisen (ZIEGLER et al. 2013).

Eine weitere Studie, die zwischen 2018 und 2020 Serumproben aus einer Berliner und einer Nordrhein-Westfälischen Pferdeklinik untersuchte, stellte neutralisierende Antikörper in einem von 437 Pferden fest (BERGMANN et al. 2022).

Weiterhin wurden im Rahmen einer WNV-Seroprävalenzstudie in Mitteldeutschland bei 35 Pferden Antikörper gegen das FSMEV im Virusneutralisationstest ermittelt (GANZENBERG et al. 2022). Bezüglich der Vergleichbarkeit stellt sich wie bei Arbeiten zur WNV- Seroprävalenz erneut das Problem der Verwendung unterschiedlicher diagnostischer Tests in den verschiedenen Studien. Diese methodischen Unterschiede machen insbesondere den Vergleich mit älteren Arbeiten schwierig.

2.3.3 Klinik und Pathogenese

Die FSME ist die wichtigste zeckenübertragene Krankheit in Europa und Asien, mit bis zu 10.000 humanen Fällen jährlich (AMICIZIA et al. 2013). Bei den meisten infizierten Menschen (70 % bis 98 %) verläuft eine Infektion mit dem FSMEV asymptomatisch (BOGOVIC and STRLE 2015, EURINGER et al. 2023).

Bei Menschen mit symptomatischem Krankheitsverlauf hat dieser meist einen biphasischen Charakter. Nach einer Inkubationszeit von sieben bis 14 Tagen erleben Patienten Symptome einer Allgemeinerkrankung, gekennzeichnet durch Fieber, Glieder- und Kopfschmerzen sowie Abgeschlagenheit (LINDQUIST and VAPALAHTI 2008). Diese Symptome gehen auf die erste Virämiephase zurück, die aus der initialen Vermehrung des Virus in den Langerhanszellen der Haut und der anschließenden Verbreitung des Virus auf die lymphatischen Organe des Körpers besteht (NUTTALL 1999).

Auf diesen, etwa eine Woche andauernden Abschnitt, folgt teilweise ein Abklingen der Symptome. Anschließend stellt sich mit einer zweiten Fieberphase der zweite Krankheitsabschnitt ein, indem bei etwa 10 % der Patienten mit initialer Symptomatik, zentralnervöse Symptome infolge einer Meningitis, Meningoenzephalitis bzw. einer Meningoenzephalomyelitis entsprechend der betroffenen Hirnregionen entstehen (KAISER 2016).

Auch beim Pferd sind klinische Anzeichen der FSME wiederholt beschrieben worden (WALDVOGEL 1981, KLAUS et al. 2013, FOUCHE et al. 2021). Beispielsweise wurden bei einem 16-jährigen Warmblut-Wallach neben Abgeschlagenheit auch neurologische Symptome wie Ataxie und Muskelfaszikulationen an Nase und Lippen festgestellt (FOUCHE et al. 2021). Auch epileptiforme Krämpfe sind im Zuge einer FSMEV-Infektion beim Pferd beschrieben (WALDVOGEL 1981).

2.3.4 Diagnostik

Beim Menschen setzt sich die Diagnosefindung im Fall des Verdachts einer FSME-Erkrankung aus mehreren Komponenten zusammen: der Aufenthalt in einem Risikogebiet, ein vorausgegangener Zeckenstich, die klinische Symptomatik, sowie der IgM bzw. IgG-Antikörper-Nachweis. Ein Titeranstieg von IgG-Antikörpern ein bis drei Wochen nach initialer Bestimmung und vorausgegangener Klinik legt das Vorliegen einer FSME nahe (KAISER 2016).

Neben dem Vorbericht, der klinischen Symptomatik und den serologischen Ergebnissen ist auch ein direkter Erregernachweis aus Gewebe, Blut oder Liquor (mittels RT-PCR, Virusanzucht, Immunfluoreszenz, oder -histologie) sowie der Nachweis intrathekal gebildeter Antikörper (erhöhter Liquor/Serum Index) beweisend (ROBERT KOCH-INSTITUT 2019). Beim Pferd stellt sich das Vorgehen im Vergleich zur WNV-Infektion prinzipiell ähnlich dar (CAVALLERI et al. 2022). Auch hier werden die klinischen Befunde im Zusammenhang mit den serologischen Untersuchungsergebnissen interpretiert. Es kommen auch hier IgM- bzw. IgG-Antikörpernachweise mit anschließender Bestätigung im Virusneutralisationstest und direkte Nachweisemethoden wie RT-PCR aus dem Liquor zum Einsatz (CONZE et al. 2021, FOUCHE et al. 2021).

3 Publikation

Leonard M. R. Gothe, Stefanie Ganzenberg, Ute Ziegler, Anna Obiegala, Katharina L. Lohmann, Michael Sieg, Thomas W. Vahlenkamp, Martin H. Groschup, Martin Pfeffer

Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern-Central Germany




Viruses 2023, 15, 1108; <https://doi.org/10.3390/v15051108>

3.1 Stellungnahme zum Eigenanteil

Das vorliegende Projekt wurde von Martin Pfeffer und Katharina Lohmann im Jahr 2020 konzipiert. Es wurde als Teilprojekt „Epidemiologie und Risikofaktoren für die West-Nil-Virusinfektion“ (ERWIN) des Verbundvorhabens „Prävalenz von WNV-Infektionen bei Stechmücken und Säugetieren in endemisch-betroffenen ländlichen und urbanen Gebieten in Deutschland - mögliche Immunprophylaxen bei Pferden,, (WISSDIP) des Forschungsnetzes Zoonosen zwischen dem Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen und der Klinik für Pferde 2021 begonnen. Die Kontaktierung der Pferdebesitzer, die Beprobung der Pferde und die Durchführung der cELISAs erfolgte durch mich. Die Serumneutralisationstests wurden im Referenzlabor für WNV am FLI durch Ute Ziegler durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgte durch mich mit der Unterstützung von Anna Obiegala. Die der Publikation vorangegangene Literaturrecherche erfolgte ebenfalls eigenständig durch mich. Beim Erstellen des Manuskripts wurde ich von Anna Obiegala, Martin Pfeffer, Katharina Lohmann und den anderen Koautoren unterstützt. Es wurden lediglich die angegebenen Quellen verwendet.

Article

Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern–Central Germany

Leonard M. R. Gothe ¹, Stefanie Ganzenberg ², Ute Ziegler ³ , Anna Obiegala ¹, Katharina L. Lohmann ², Michael Sieg ⁴, Thomas W. Vahlenkamp ⁴, Martin H. Groschup ³ , Uwe Hörügel ⁵ and Martin Pfeffer ^{1,*} 

¹ Institute of Animal Hygiene and Veterinary Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany; leonard_gothe@live.de (L.M.R.G.); anna.obiegala@vetmed.uni-leipzig.de (A.O.)

² Department for Horses, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany; stefanie@ganzenberg.de (S.G.); katharina.lohmann@vetmed.uni-leipzig.de (K.L.L.)

³ Friedrich-Loeffler Institut (FLI), Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, 17493 Greifswald-Insel Riems, Germany; ute.ziegler@fli.de (U.Z.); martin.groschup@fli.de (M.H.G.)

⁴ Institute of Virology, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University, 04103 Leipzig, Germany; michael.sieg@mzla.de (M.S.); vahlenkamp@vetmed.uni-leipzig.de (T.W.V.)

⁵ Animal Diseases Fund Saxony, Horse Health Service, 01099 Dresden, Germany; uwe.hoeruegel@tsk-sachsen.de

* Correspondence: pfeffer@vetmed.uni-leipzig.de; Tel.: +49-341-97-38150

Abstract: Since 2018, autochthonous West Nile virus (WNV) infections have been regularly reported in eastern–central Germany. While clinically apparent infections in humans and horses are not frequent, seroprevalence studies in horses may allow the tracing of WNV and related flaviviruses transmission, such as tick-borne encephalitis virus (TBEV) and Usutu virus (USUV), and consequently help to estimate the risk of human infections. Hence, the aim of our study was to follow the seropositive ratio against these three viruses in horses in Saxony, Saxony Anhalt, and Brandenburg and to describe their geographic distribution for the year 2021. In early 2022, i.e., before the virus transmission season, sera from 1232 unvaccinated horses were tested using a competitive pan-flavivirus ELISA (cELISA). In order to estimate the true seropositive ratio of infection with WNV, TBEV, and USUV for 2021, positive and equivocal results were confirmed by a virus neutralization test (VNT). In addition, possible risk factors for seropositivity using questionnaires were analyzed using logistic regression based on questionnaires similar to our previous study from 2020. In total, 125 horse sera reacted positive in the cELISA. Based on the VNT, 40 sera showed neutralizing antibodies against WNV, 69 against TBEV, and 5 against USUV. Three sera showed antibodies against more than one virus, and eight were negative based on the VNT. The overall seropositive ratio was 3.3% (95% CI: 2.38–4.40) for WNV, 5.6% (95% CI: 4.44–7.04) for TBEV, and 0.4% (95% CI: 0.14–0.98) for USUV infections. While age and number of horses on the holding were factors predicting TBEV seropositivity, no risk factors were discovered for WNV seropositivity. We conclude that horses are useful sentinels to determine the flavivirus circulation in eastern–central Germany, as long as they are not vaccinated against WNV.

Keywords: flaviviruses; West Nile virus; horses; seroprevalence; Germany; risk factors; tick-borne encephalitis virus; Usutu virus; virus neutralization test; vector-borne zoonoses



Citation: Gothe, L.M.R.; Ganzenberg, S.; Ziegler, U.; Obiegala, A.; Lohmann, K.L.; Sieg, M.; Vahlenkamp, T.W.; Groschup, M.H.; Hörügel, U.; Pfeffer, M. Horses as Sentinels for the Circulation of Flaviviruses in Eastern–Central Germany. *Viruses* **2023**, *15*, 1108. <https://doi.org/10.3390/v15051108>

Academic Editor: Boris Pastorino

Received: 20 March 2023

Revised: 27 April 2023

Accepted: 28 April 2023

Published: 30 April 2023



Copyright: © 2023 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/>).

1. Introduction

Zoonotic, vector-borne arboviruses from the *Flaviviridae* family, such as West Nile virus (WNV), tick-borne encephalitis virus (TBEV), and Usutu virus (USUV), represent a significant threat to animal and human health. All three are single-stranded RNA viruses with positive polarity [1–4]. Together with eight other pathogenic flaviviruses, WNV and USUV belong to the Japanese encephalitis serocomplex.

Since the first isolation from the blood of a febrile woman in the West Nile District of Uganda in 1937 [5], WNV has been spread in many countries worldwide, causing

minor and more extensive epidemics regularly [6]. Due to genetic variability, genome sequences of the virus can be classified into nine different lineages [7,8]. Lineages 1 and 2 are the most important from a zoonotic point of view and are regularly isolated from birds, humans, and horses during major WNV outbreaks. All lineages replicate in reservoir-competent birds, which are the principal hosts. Birds from the order Passeriformes in particular are considered highly competent amplification hosts with high levels of viremia and massive shedding of virus particles through oral and cloacal fluids [9,10]. Mosquitoes of the genus *Culex* play a significant role as vectors and maintain the infection cycle within bird populations. By also acting as bridge vectors, they transmit WNV to dead-end hosts, such as humans, horses, and other mammals [11–14]. Compared to birds, the duration and amplitude of viremia in most vertebrate species is insufficient to infect mosquitoes [15].

While WNV lineage 1 is known for causing outbreaks worldwide, lineage 2 was thought to cause WNV infections solely in Africa until 2004 [16,17]. Since 2004, beginning with a Hungarian goshawk fledgling, lineage 2 has also been responsible for WNV outbreaks in southern and eastern Europe [18], and lineage 2 strains have been isolated in Austria (2008), Greece (2010), Romania (2010), and Spain (2017) [19–25]. The first confirmed WNV isolation in Germany was reported in 2018 after the investigation of homogenized organ material of several dead birds, and these virus isolates also belonged to lineage 2 [24]. Since 2018, WNV infections are endemic in mostly eastern–central Germany, with most cases occurring in Saxony, Saxony Anhalt, and large parts of Brandenburg [26–28]. In this area, WNV infections present a considerable threat to endemic horse populations [27].

Although most horses seroconvert without clinical signs, about 8% of infected naive horses [29] develop encephalomyelitis, which is displayed by clinical signs including ataxia, weakness, muscle fasciculations, cranial nerve deficits, and, in severe cases, paralysis and recumbency [30,31]. Three licensed vaccines for horses are available on the European market and provide reliable protection against severe clinical signs [32–35]. The seroprevalence of WNV infections in the German horse populations has already been investigated in eastern–central Germany, revealing seroprevalence rates of 0% from 2010 to 2012, 8.6% in 2019, and 13.77% in 2020 [36,37] and 5.8% in 2020 [38].

After its first isolation in 1959 in Swaziland, it was long assumed that USUV was restricted to the tropics and subtropics of Africa. However, since its first retrospective appearance in central Europe in 1996 or earlier, the virus has been isolated in several European countries [39–42]. Due to a very similar transmission cycle, USUV and WNV overlap considerably in terms of their host and vector populations in Europe [43]. Like WNV, USUV is transmitted by mosquitoes, and birds represent the natural reservoir. In particular, blackbirds (*Turdus merula*), great-grey owls (*Strix nebulosa*), and house sparrows (*Passer domesticus*) are considered highly susceptible [44,45]. Similar to WNV, *Culex pipiens* is the most important vector for USUV transmission [46,47]. As with WNV, horses and humans represent accidental hosts because they do not contribute to the transmission cycle after infection [48,49]. While rare cases of human neuroinvasive disease after USUV infection have been described, there are no reports of clinical illness in horses [50–52].

TBEV belongs to the tick-borne encephalitis serocomplex [53]. It can be divided into five different genetic subtypes, and it is widely distributed throughout Europe and Asia. In Germany, the European subtype (TBEV-EU) is predominant, and infections are reported mostly from southern Germany [54]. In contrast to WNV and USUV, TBEV is mainly transmitted by hard ticks, and small rodents are the main reservoir [55–57]. In Germany, the life cycle of TBEV is maintained by the early developmental stages of castor bean tick (*Ixodes ricinus*) which pick up the virus from reservoir hosts on so-called natural foci [58]. During the next blood meal as nymphs or adults, these ticks infect birds, larger mammals, and humans [59].

Of these three zoonotic flaviviruses, TBEV is of the greatest public health importance since over 10,000 human cases are reported each year in Eurasia [60]. Similar to WNV, a minority of infected human patients suffer from a generalized febrile disease, which can

progress to severe illness with mainly neurologic symptoms [61]. Infected horses are often asymptomatic, but cases of febrile and neurologic illness have been described [62–64].

Unvaccinated horses are considered a good sentinel species in one-health WNV surveillance systems in southern Europe [65,66], and such studies with horses as the sole early warning system for human infection risk have been reported [67]. In addition to TBEV detection in ticks and the number of reported human cases, serological testing of horses is considered a good tool to assess the abundance of natural TBEV foci in a given area [62,68]. Another advantage of horses as a sentinel species for TBEV is the possibility to reveal microfoci and to perform epidemiological mapping on a smaller geographical scale than the district level [63].

In 2020, a first study investigated the WNV seroprevalence in nine counties in eastern-central Germany and reported risk factors for infection [38]. Due to the continuous geographical spread of WNV, this first follow-up study widens the scope by examining additional counties where cases in birds and/or horses had been newly reported between the autumn of 2020 and the spring of 2022, and by investigating possible seroconversion by retesting WNV-seronegative horses described by Ganzenberg et al. (2022) [38]. We further aimed to evaluate the abundance of TBEV and USUV infection in horses in these counties. Finally, this study repeated and expanded the assessment of potential risk factors for infection with WNV and TBEV on an individual and holding level in order to investigate whether previous results were reproducible.

2. Materials and Methods

2.1. Study Area and Animals

The area of investigation was chosen based on the study area reported by Ganzenberg et al. (2022) and was in concordance with officially confirmed cases of WNV infections in horses from eastern-central Germany reported from 2018 to 2021 (Figure 1) [38]. Horses enrolled in the study originated from six counties in Saxony-Anhalt, five counties in Saxony, and four counties in Brandenburg (Figure 1). Compared to Ganzenberg et al. (2022) [38], the study area was extended by adding the counties Salzlandkreis (SZK), Saalelandkreis (SLK), and Jerichower Land (JL) in Saxony-Anhalt, and the counties Dahme-Spreewald (DS), Potsdam-Mittelmark (PM), and Oberspreewald Lausitz (OSL) in Brandenburg (Figure 1). Unfortunately, no holdings in Leipzig city could be included. The study was conducted between January and March of 2022. Of the horses previously tested by Ganzenberg et al. (2022) [38], 219 WNV-seronegative horses were again available for testing. The data of 17 WNV-seropositive horses reported previously [38] were included in an expanded risk factor analyses for WNV-seropositivity. For an expanded risk factor analysis for TBEV-seropositivity, data from 711 horses tested in 2020 [38] were also included.

2.2. Epidemiological Data

Horses were recruited by contacting holding managers from all registered holdings with at least five registered equids in the study area. Owners who participated in the earlier study, were approached directly. Due to the low response rate, only a small fraction of the eligible holdings was enrolled in the study. To participate in the study, animals had to be at least one year of age, unvaccinated against the WNV, and kept permanently in the area throughout the year 2021. Since only owners who responded to the call were included, a convenience sample was used in this study.

Information about the horses and the holding was obtained through a standardized questionnaire (File S1, Supplementary Materials) by interviewing the holding manager or the horse owner. In case of contradictory information about the holding, information given by the holding manager was prioritized and applied to all horses living on that holding.

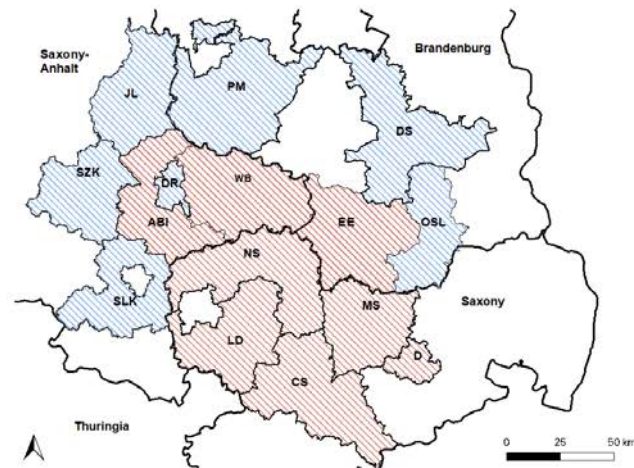


Figure 1. Study area. Counties that were also included in 2020 [38] are shaded in red. Newly included counties are shaded in blue. Saxony-Anhalt: Saalekreis (SLK), Salzlandkreis (SZK), Anhalt-Bitterfeld (ABI), Wittenberg (WB), Dessau-Rosslau (DR), and Jerichower Land (JL). Saxony: Leipzig district (LD), Northern Saxony (NS), Central Saxony (CS), Meissen (MS), and Dresden city (D). Brandenburg: Elbe-Elster (EE), Oberspreewald-Lausitz (OSL), Dahme-Spreewald (DS), and Potsdam-Mittelmark (PM).

2.3. ELISA and VNT

After cleaning and disinfection of the skin, blood samples were collected from the jugular vein of each horse using a sterile vacuum collection system (Vacurette[®], Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Germany). Samples were stored at 4 °C overnight, and serum was separated by centrifugation for 10 min, at 6000 × *g* and 10 °C (Heraeus Megarfuge 8R, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Germany). Separated sera were stored at −20 °C until further processing.

All serum samples were tested in duplicate using a commercial panflavivirus competitive enzyme-linked immunosorbent assay (cELISA) (ID-Screen[®] West Nile Competition Multi-species; IDvet Innovative Diagnostics; Grabels, France), according to the manufacturer's instructions. This assay is designed to detect specific antibodies to the envelope protein Pr-E of West Nile virus in the sera of horses and various avian species. To confirm or differentiate results of the cELISA, samples with positive or equivocal results were further examined by micro-virus neutralization tests (VNTs), as previously described [69]. In short, sera were incubated at 37 °C for 1 hour with 100 TCID₅₀ of a WNV-lineage 2 strain (WNV strain Germany, Gen-Bank accession no. MH924836) after heat inactivation. After the incubation, the sera were added in duplicates to wells with monolayers of target cells. Observable cytopathic effects were recorded one week after infection, and the neutralizing titer (ND₅₀) was defined as the reciprocal of the maximum dilution that inhibited cytopathic effects in 50% of the wells. Neutralizing titers of 10 or higher were considered positive. A similar procedure was applied for TBEV (Neudoerfl; GenBank accession no. U27495, Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich) and USUV (Europa 3, GenBank accession no. HE599647) [38].

Sera neutralizing more than one virus were considered positive for the virus neutralized at a fourfold higher dilution than all other viruses. If the difference in the dilution was less than fourfold, the sample was considered undifferentiated. Samples that tested positive by cELISA, but negative against all viruses by VNT were considered seronegative. For horses that were included by Ganzenberg et al. (2022) [38] and retested in this study, seroconversion was defined as a positive VNT result in a horse that previously tested negative by VNT in 2020.

2.4. Statistical Analysis

The seropositive ratio of each infection on the horse level was calculated as the number of horses testing positive by VNT divided by the total number of tested horses. On the holding level, a seropositive holding was defined as one housing with at least one seropositive horse, and the seropositive ratio was calculated as the number of seropositive holdings divided by the total number of holdings. Within one holding, the seropositive ratio was calculated as the number of seropositive horses divided by the number of participating horses from that holding. The vaccination density of a holding was calculated by the overall horse number and the number of vaccinated horses on the holding.

Analysis of potential risk factors associated with WNV seropositivity was first performed using the chi-squared test. For binomial variables, GraphPad Software (Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) was used, while for all other variables, IBM SPSS Statistics version 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) was used. Continuous variables (age, vaccination density, and number of horses on the holding) were analyzed in Excel via *t*-test (version 2108, Microsoft, Redmond, WA, USA).

To predict the log-likelihood of the outcome, seropositivity against WNV, as an additive function of potential risk factors, a logistic regression model was performed (age, coat color, sex, breed type, country of birth, primary use, primary training location, transport with a distance of more than 20 km from the holding within the last year, clinical signs of neurologic disease in the previous 2 years, clinical signs of febrile disease in the previous two years, travel outside of Germany in the previous two years, location of the holding, number of horses on the holding, type of housing, presence of outdoor shelter, presence of stagnant water within 1 kilometer of the holding, WNV vaccination density on the holding, estimated number of mosquitoes on the holding, use of fly sheets, and additional mosquito control measures). The calculation of effect strength was performed as odds ratios (OR). Results with $p < 0.05$ were considered significant. All variables concerning the logistic regression can be found in the Supplementary Materials (Tables S2 and S3).

In a second analysis, 17 known WNV-positive horses from our previous study [38] that still resided on holdings included in this study, but were not tested again, were included.

The analysis of potential risk factors associated with TBEV seropositivity used six variables (age, number of horses on the holding, type of housing, county, presence of outdoor shelter, and use of repellent) that were expected to influence the TBEV infection risk. Another expanded model was created that included all horses tested for antibodies against TBEV by Ganzenberg et al. [38] and in the current study. Horses that tested seropositive in 2020 and/or seropositive in early 2022 were regarded as seropositive. For twice-tested horses, the most recent information was used in the analyses. The measure of association between significant variables was calculated using Cramer's V or Pearson correlation coefficient. All analyses of the logistic regression model and Cramer's V were performed using IBM SPSS Statistics version 27.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

2.5. Mapping

Maps were created using the open-source software QGIS (QGIS Geographic Information System, Odense 3.20, Gary E. Sherman et al., Boston, MA, USA). The locations of the holdings were based on Google-derived GPS coordinates (Google Maps, 2021, maps.google.de, accessed on 13 March 2023).

2.6. Ethical Statement

The study was ethically approved by the 'Landesamt für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit Brandenburg' (Nr. 2347-A-33-1-2020), the 'Landesverwaltungsamt, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten Sachsen-Anhalt (Saxony-Anhalt)' (AZ: 42502-3- 892KlinikPferd) and the 'Landesdirektion Sachsen (Saxony)' (Nr. A06/20). Additionally, horse owners consented in writing before participating in the study.

3. Results

Details concerning the selected horse population are presented in Tables 1 and 2. Of the 1232 horses included in the study, 390 originated from Saxony-Anhalt, 344 from Saxony, and 498 from Brandenburg. A total of 219 horses from 34 holdings that had previously been tested by Ganzenberg et al. [38] and had been seronegative for WNV infection were tested again.

Table 1. Overview of selected horse population and obtained serology results.

Federal State	County	Registered Equids #	Eligible Equids [⊗] (in %)	Tested Equids [◇] (in %)	WNV-Seropositive Equids [▽] (in %)	TBEV-Seropositive Equids [⊕] (in %)	USUV-Seropositive Equids [*] (in %)
Saxony-Anhalt	Saalekreis (SLK)	2507	1444/2507 (58%)	132/1444 (9%)	11/132 (8%)	3/132 (2%)	0/132 (0%)
	Salzlandkreis (SZK)	2347	1044/2347 (45%)	51/1044 (5%)	2/51 (4%)	0/51 (0%)	0/51 (0%)
	Jerichower Land (JL)	2245	1262/2245 (56%)	93/1262 (7%)	1/93 (1%)	4/93 (4%)	1/93 (1%)
	Dessau-Rosslau (DR)	466	285/466 (61%)	18/285 (6%)	0/18 (0%)	3/18 (17%)	0/18 (0%)
	Wittenberg (WB)	1762	857/1762 (49%)	38/857 (4%)	1/38 (3%)	2/38 (*) (5%)	1*/38 (3%)
	Anhalt-Bitterfeld (ABI)	2380	1293/2380 (54%)	58/1293 (5%)	0/58 (0%)	1*/58 (2%)	0/58 (0%)
Saxony	Central Saxony (CS)	4495	1881/4495 (42%)	137/1881 (7%)	1/137 (1%)	8/137 (6*) (6%)	0/137 (0%)
	Northern Saxony (NS)	3233	1304/3233 (44%)	86/1304 (7%)	2/86 (2%)	5/86 (6%)	0/86 (0%)
	Dresden City (D)	948	428/948 (45%)	49/428 (12%)	2/49 (4%)	1/49 (2%)	2*/49 (4%)
	Meissen (MS)	2749	1189/2749 (43%)	46/1189 (4%)	2/46 (4%)	5/46 (1*) (11%)	0/46 (0%)
	Leipzig district (LD)	3435	1255/3435 (37%)	26/1255 (2%)	1/26 (4%)	0/26 (0%)	0/26 (0%)
Brandenburg	Elbe-Elster (EE)	2349	1216/2349 (52%)	159/1216 (13%)	8/159 (5%)	12/159 (8*) (8%)	1*/159 (1%)
	Dahme-Spreewald (DS)	3478	2418/3478 (70%)	152/2418 (6%)	4/152 (3%)	22/152 (15%)	0/152 (0%)
	Oberspreewald-Lausitz (OSL)	1147	620/1147 (54%)	34/620 (6%)	3/34 (9%)	1/34 (3%)	0/34 (0%)
	Potsdam-Mittelmark (PM)	6226	2857/6226 (46%)	153/2857 (5%)	2/153 (1%)	2/153 (1%)	0/153 (0%)
Total		39,767	19,353/39,767 (49%)	1232/19,353 (6%)	40/1232 (3.3%)	69/1232 (17*) (6%)	5/1232 (4*) (0.4%)

Total number of registered equids in respective counties; [⊗] Horses housed in holdings with five or more equids were eligible for this study; [◇] Eligible equids that were included in this study; [▽] Tested equids that were seropositive for WNV; [⊕] Tested equids that were seropositive for TBEV; ^{*} Tested equids that were seropositive for USUV; ^{*} Equids positive in previous testing by Ganzenberg et al. [38] in 2020 and again positive in this study.

Table 2. Overview of selected holdings and obtained serology results.

Federal State	County	Registered Holdings #	Eligible Holdings [⊗] (in %)	Tested Holdings [◇] (in %)	Holdings with ≥1 WNV-Seropositive Horse (in %)	Holdings with ≥1 TBEV-Seropositive Horse (in %)	Holdings with ≥1 USUV-Seropositive Horse (in %)
Saxony-Anhalt	Saalekreis (SLK)	660	106/660 (16%)	15/106 (14%)	5/15 (33%)	2/15 (13%)	0/15 (0%)
	Salzlandkreis (SZK)	760	105/760 (13.8%)	9/105 (9%)	2/9 (22%)	0/9 (0%)	0/9 (0%)
	Jerichower Land (JL)	575	112/575 (20%)	8/112 (7%)	1/8 (13%)	1/8 (13%)	1/8 (13%)
	Dessau-Rosslau (DS)	105	19/105 (18%)	1/19 (5%)	0/1 (0%)	1/1 (100%)	0/1 (0%)
	Wittenberg (WB)	525	80/525 (15%)	4/80 (5%)	1/4 (25%)	1*/4 (25%)	1*/4 (25%)
	Anhalt-Bitterfeld (ABI)	640	109/640 (17%)	6/109 (6%)	0/6 (0%)	1*/6 (17%)	0/6 (0%)
Saxony	Central Saxony (CS)	1662	208/1662 (13%)	14/208 (7%)	1/14 (7%)	5/14 (3*) (36%)	0/14 (0%)
	Northern Saxony (NS)	1256	120/1256 (10%)	7/120 (6%)	2/7 (29%)	2/7 (29%)	0/7 (0%)
	Dresden City (D)	375	42/375 (11%)	5/42 (12%)	1/5 (20%)	2/5 (40%)	1*/5 (20%)
	Meissen (MS)	1053	105/1053 (10%)	4/105 (4%)	1/4 (25%)	1*/4 (25%)	0/4 (0%)
	Leipzig district (LD)	1326	132/1326 (10%)	3/132 (2%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)	0/3 (0%)
Brandenburg	Elbe-Elster (EE)	663	103/663 (16%)	13/103 (13%)	4/13 (31%)	3/13 (2*) (23%)	1*/13 (8%)
	Dahme-Spreewald (DS)	630	160/630 (25%)	12/160 (8%)	3/12 (25%)	4/12 (33%)	0/12 (0%)
	Oberspreewald-Lausitz (OSL)	300	47/300 (16%)	3/47 (6%)	1/3 (33%)	1/3 (33%)	0/3 (0%)
	Potsdam-Mittelmark (PM)	942	165/942 (18%)	10/165 (6%)	1/10 (10%)	1/10 (10%)	0/10 (0%)
Total		11,472	1613/11,472 (14%)	114/1613 (7%)	24/114 (21%)	25/114 (8*) (22%)	5/114 (4*) (4%)

Total number of registered holdings in respective counties; [⊗] Holdings that housed five or more equids were eligible for this study; [◇] Eligible holdings that were included in this study; ^{*} Equids seropositive in previous testing by Ganzenberg et al. [38] in 2020 and again seropositive in this study.

Complete information concerning potential risk factors was obtained for 1211 horses (Table S4). Most horses ($n = 1029$, 85.1%) were born in Germany. Of those not born in Germany, 51.1% ($n = 94$) originated from countries with reported WNV cases in the last 10 years. The vaccination density in the study population was 19%. Detailed information about the population characteristics is presented in the Supplementary Materials (Tables S1–S3).

Holdings within the studied area were located between $11^{\circ}37' E$ – $13^{\circ}95' E$ and $50^{\circ}72' N$ – $52^{\circ}5' N$ and at an altitude between -7 m and 643 m above sea level.

3.1. ELISA and VNT

Of the 1232 horses enrolled in the study, 125 (10.2%) showed flavivirus-specific antibodies based on the cELISA (Table S5). Of those, 40 horses tested positive for neutralizing antibodies against WNV by VNT, with virus-neutralizing titer 50 (ND_{50}) ranging from 20 to 1280 (Table 1) and leading to an overall seropositive ratio of 3.3% (95% CI: 2.38–4.40). In total, 5 of the 40 WNV-seropositive horses were born outside of Germany and originated from Spain, Hungary, the Czech Republic, Iceland, and Austria. Additionally, 2 WNV-seropositive horses (5%, 95% CI: 0.50–17.39) had shown signs of febrile illness, but no neurological signs in the 2 years prior to sampling. In one horse that tested WNV-negative in 2020, neutralizing antibodies against WNV were detected in 2022 (Figure 2).

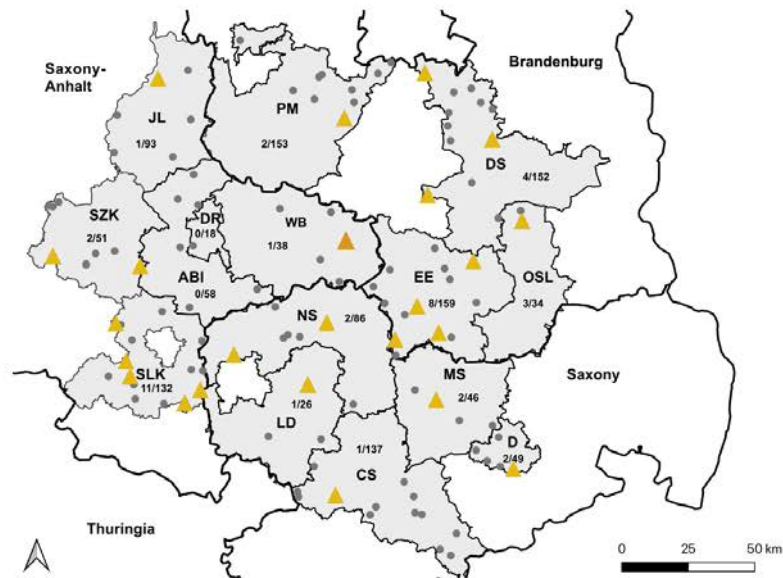


Figure 2. Distribution of WNV-seropositive holdings in 2021. Holdings housing at least one WNV-seropositive horse are marked with yellow triangles. Holdings without WNV-seropositive horses are marked with smaller grey dots. The holding with a single WNV-seroconverted horse are marked with a larger orange triangle. Saxony-Anhalt: Saalekreis (SLK), Salzlandkreis (SZK), Anhalt-Bitterfeld (ABI), Wittenberg (WB), Dessau-Rosslau (DR), and Jerichower Land (JL). Saxony: Leipzig district (LD), Northern Saxony (NS), Central Saxony (CS), Meissen (MS), and Dresden city (D). Brandenburg: Elbe-Elster (EE), Oberspreewald-Lausitz (OSL), Dahme-Spreewald (DS), and Potsdam-Mittelmark (PM).

Seventeen horses that were seropositive for WNV infection in 2020 were still present on their respective holdings in 2022, but were not tested again. Assuming that they remained seropositive, the seropositive ratio increased to 4.6% (57/1232) (95% CI: 3.53–5.88) when these horses were included.

Overall, 69 horses were seropositive for TBEV infection, with VNT₅₀ titers ranging from 30 to 1920. Of these, 17 horses had already tested seropositive in 2020 [38], and 4 horses seroconverted between 2020 and 2022 (Figure 3). The overall seropositive ratio for TBEV infection, including all horses testing positive by VNT in 2022, was 5.6% (95% CI: 4.44–7.04).

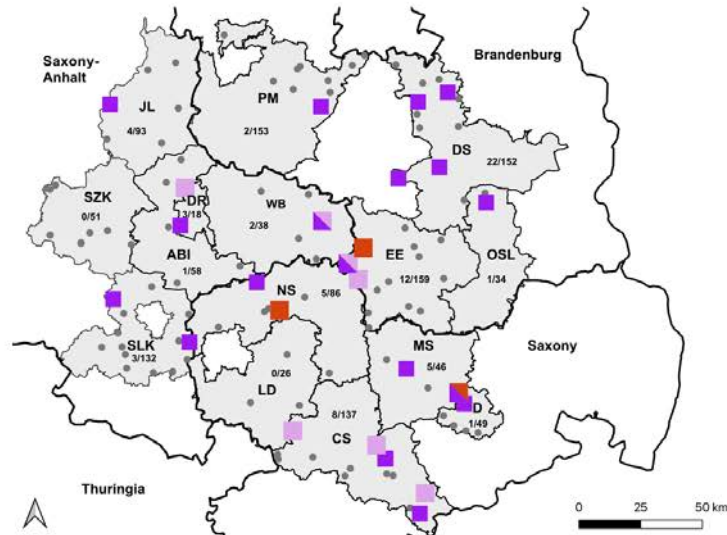


Figure 3. Distribution of TBEV-seropositive holdings in 2021. Holdings housing at least one confirmed TBEV-seropositive horse from 2020 are marked with light-purple squares. Holdings with newly TBEV-seropositive horses from 2021 are marked with dark-purple squares. Holdings without TBEV-positive horses are marked with smaller grey dots. Holdings in which seroconversion occurred in 2021 are marked with bigger red squares. All holdings with horses from more than one category are marked with mixed colors. Saxony-Anhalt: Saalekreis (SLK), Salzlandkreis (SZK), Anhalt-Bitterfeld (ABI), Wittenberg (WB), Dessau-Rosslau (DR), and Jerichower Land (JL). Saxony: Leipzig district (LD), Northern Saxony (NS), Central Saxony (CS), Meissen (MS), and Dresden city (D). Brandenburg: Elbe-Elster (EE), Oberspreewald-Lausitz (OSL), Dahme-Spreewald (DS), and Potsdam-Mittelmark (PM). Thuringia: (DR) and (NS).

A total of 5 horses (0.4%; 95% CI: 0.14–0.98) tested positive by VNT for antibodies against USUV, and the ND₅₀ titers ranged from 20 to 80. Four of the five horses had previously tested seropositive for USUV infection in 2020 [38], and no seroconversion was observed (Figure 4).

Undifferentiable VNT results were observed in three cases. One horse showed antibodies against WNV and USUV, and two horses against WNV and TBEV. Eight sera that initially tested positive by cELISA showed no neutralizing antibodies in the VNT and were considered seronegative.

The highest seropositive ratio within a single holding was 50% (95% CI: 23.66–76.34) for antibodies against WNV (5/10), 82% (95% CI: 51.14–96.01) for antibodies against TBEV (9/11), and 20% (95% CI: 45.90–52.06) for antibodies against USUV (2/10). In 24% (95% CI: 14.52–29.48) of the holdings tested, at least 1 horse with neutralizing antibodies against WNV was detected. Additionally, 22% (95% CI: 15.26–30.42) of the holdings housed at least 1 horse with neutralizing antibodies against TBEV, and 4% (95% CI: 01.63–10.12) of holdings housed at least 1 horse seropositive for USUV infection (Table 2).

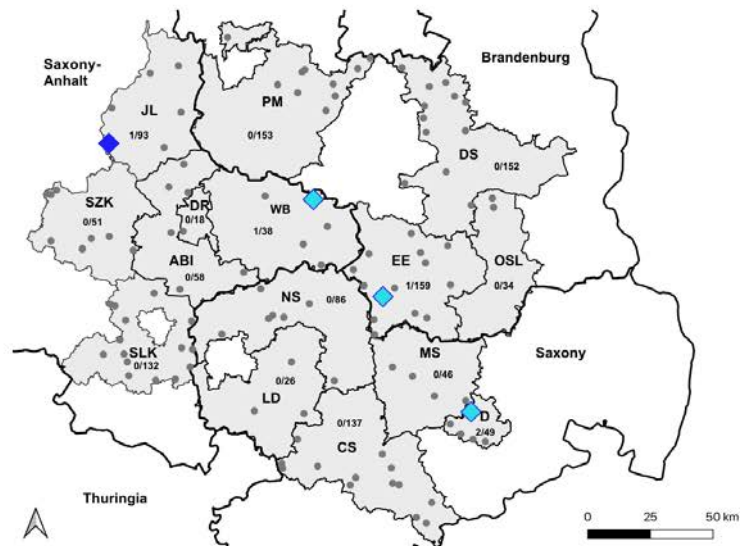


Figure 4. Distribution of USUV-seropositive holdings in 2021. Holdings housing at least one confirmed USUV-seropositive horse from 2020 are marked with light-blue squares. The holding with one newly USUV-seropositive horse from 2021 is marked with a dark-blue square. Holdings without USUV-positive horses are marked with smaller grey dots. Seroconversion to USUV in 2021 was not observed. Saxony-Anhalt: Saalekreis (SLK), Salzlandkreis (SZK), Anhalt-Bitterfeld (ABI), Wittenberg (WB), Dessau-Rosslau (DR), and Jerichower Land (JL). Saxony: Leipzig district (LD), Northern Saxony (NS), Central Saxony (CS), Meissen (MS), and Dresden city (D). Brandenburg: Elbe-Elster (EE), Oberspreewald-Lausitz (OSL), Dahme-Spreewald (DS), and Potsdam-Mittelmark (PM).

3.2. Risk Factor Analysis

No variables with a significant association with WNV seropositivity were found in the univariate analysis. An overview of all variables tested is presented as supplemental data (Tables S6 and S7). The logistic regression model for the outcome of WNV seropositivity was not significant ($X^2 = 6.107$; $df = 8$; $p = 0.635$), resulting in a level of the explainable variance of Nagelkerke's R^2 of 0.191.

Of the 22 explanatory variables analyzed in the logistic regression model, none were significant predictors of WNV seropositivity. Complete results are available in Table S7 in the Supplementary Materials.

Six potential risk factors for TBEV seropositivity were entered into the logistic regression analysis (Table S9, Supplementary Materials). The model for the outcome of TBEV seropositivity was nearly significant ($X^2 = 14.696$; $df = 8$; $p = 0.065$), resulting in a level of the explainable variance of Nagelkerke's R^2 of 0.037. Of the 6 variables, higher age ($OR = 1.034$; $p = 0.032$) increased the likelihood, and higher numbers of horses on the holding ($OR = 0.991$; $p = 0.031$) reduced the likelihood of TBEV-seropositivity. A weak negative correlation between the 2 variables was detected (Cramer-V = 0.203, $p < 0.001$). Younger horses were more likely to be housed on larger holdings. Complete results are available in Table S9 in the Supplementary Materials.

The results of the expanded logistic regression models for WNV and TBEV are presented in the Supplementary Materials (Tables S8 and S10). The results of the expanded model for WNV showed a reduced likelihood of being seropositive in horses housed permanently outdoors ($OR = -1.524$; $p = 0.022$) and those with reported repellent use ($OR = -3.339$; $p = 0.012$).

4. Discussion

Overall, the seropositive ratio of WNV infection of 3.3% (95% CI: 2.38–4.40) on the horse level and 21% (95% CI: 14.52–29.48) on the holding level is similar to the findings of Ganzenberg et al. [38], where a seroprevalence of 5.8% on the horse level and 21% on the holding level was reported. Since 17 known WNV-positive horses were excluded from sampling, the seropositive ratio determined in this study may be underestimated. On the other hand, an ecological situation more conducive to WNV transmission on twice-tested holdings may have led to an overestimation of the seropositive ratio. Assuming that these 17 horses were still positive during the sampling period, the corrected seropositive ratio would be 4.6% (95% CI: 3.53–5.88) on the horse level and 25% (95% CI: 18.30–34.18) on the holding level.

A recent study on hospitalized horses in Germany reported a seroprevalence of WNV infection of 8.2% (in 2020) and 13.8% (in 2021) [36]. The seroprevalence determined in this study is considerably lower, possibly due to the different study designs, namely, the exclusive investigation of hospitalized horses in the former study [36].

The presented findings are comparable to previous reports from Austria (5.3%) [70], Croatia (3.4%) [71], Greece (4.0%) [72], and northern Spain (5.0%) [73]. Higher seroprevalences ranging from 7.1% to 22.2% were reported in Kosovo, Ukraine, Poland, Corsica, Serbia, and Albania [74–82]. Low seroprevalences were reported in Croatia (0.4%) and Poland (0.3%), while no WNV infections were evident in England [83–85]. Since WNV has been endemic in southeastern Europe for many years, it is no surprise that a longer period of virus circulation results in higher seroprevalences in these areas. Former studies from Poland and Croatia reporting lower seroprevalences in the past have been updated through recent studies, with higher prevalences showing the ongoing spread of WNV in the equine population in these countries. A similar effect might be expected for Germany, as well. The missing of any confirmed positive results from England is a strong indicator that WNV is not yet present in Great Britain. Since, in the present study, a convenience sample was taken, and former WNV-seropositive equids were excluded from the study population, the comparison of the presented data with other studies is difficult.

The lack of reported neurologic signs is in line with the results of previous studies [29,86,87]. Since none of the horses showed acute clinical signs, and because of the season with a low vector abundance, in which the serum samples were collected, the probability of detecting WNV IgM antibodies or specific WNV viral RNA in the blood was considered very low, and testing was not pursued. To the authors' knowledge, no acute WNV infections have been reported during the winter season in horses in Germany.

Similar to Ganzenberg et al. [38], eight sera tested positive in the cELISA, but were not confirmed in the neutralization test. Possible explanations include the presence of cross-reacting antibodies against other flaviviruses, for which no neutralization test was performed, such as Japanese encephalitis virus (JEV), Louping ill virus (LIV), or another unrecognized flavivirus; however, JEV and LIV have not yet been proven for Germany [88]. The possibility of early-stage infections without the presence of neutralizing antibodies against WNV, as discussed in Ganzenberg et al. (2022), is considered unlikely in this study, as horses were sampled with more temporal distance to the previous WNV season (January–March vs. September–November). Infections during the season in which sampling took place were considered unlikely due to low temperatures, resulting in a low vector abundance [89].

Since no risk factors for WNV seropositivity were found in the logistic regression, an expanded regression model, including 17 known seropositive horses from the 2020 study, was performed [38]. It revealed a reduced risk for horses permanently kept outdoors and for horses on which a repellent was used (Table S8, Supplementary Materials). The preventive factor of permanent outdoor housing is in contradiction to the previous findings of our group, and a plausible explanation is lacking. The use of a repellent as a protective factor against WNV seropositivity is plausible due to the mosquito bite-preventing effect of

these products. Since the significance of both models is low, further investigation is needed to confirm these risk factors.

Our findings showed a seropositive ratio of TBEV infection of 5.6%. Comparable seroprevalence rates were found in Spain (3.1%) and Hesse, Germany (2.9%) [90,91], while higher prevalences were found in Austria (26.1%), Lithuania (37.5%), and Baden-Württemberg, Germany (23.4%) [63,92,93]. The seropositive ratio reported here was higher than in the previous study examining the studied area (3.7%) [38]. A possible explanation for this increase in the seroprevalence of TBEV is the inclusion of the county Dahme-Spreewald, which showed the highest seropositive ratio rate of 15% (95% CI: 9.69–21.01). Since holdings with already known high TBEV-seropositive ratios were included, the seropositive ratio of TBEV is likely overestimated.

Age and the number of horses on the holding were risk factors for infection with TBEV (Table S9, Supplementary Materials). Horses with an increased age had a higher risk of being seropositive. These results are in contrast to the findings of a previous study [92], in which a higher proportion of younger horses (mean age 5.9 years) had antibodies against TBEV in a single herd. However, other studies did not find significant associations between age and seropositivity [63]. Our findings agree with previous findings in cattle from Hungary, in which individuals younger than 36 months had a significantly lower seroprevalence rate for infection with TBEV [94]. Due to the observation that all previously TBEV-positive horses still showed TBEV-neutralizing antibodies up to 19 months after the initial testing, a cumulative increase in the rate of seropositivity for TBEV infection with age in the horse population appears likely [38,62].

Another predictor for TBEV seropositivity in this study was the “number of horses on the holding”. Horses on holdings with a higher number of animals were less likely to be seropositive. A possible explanation is the zooprophyllaxis theory, in which the presence of cattle in rural malaria areas protects humans from the infection by diverting blood-seeking mosquitoes from human hosts [95]. In accordance with these findings, larger herd sizes could reduce the risk of infection with TBEV by decreasing the likelihood of an infectious tick bite for the individual. Similar effects are discussed in the relationship between black-legged ticks (*Ixodes scapularis*) and white-tailed deer, the latter serving as a possible incompetent dilution host for Lyme disease in North America [96]. Another explanation for the significance of this variable may be the weak correlation with the variable age. This negative correlation is most likely present due to the inclusion of several breeding holdings that are characterized as holdings with high numbers of horses and a high percentage of young horses. These risk factors were not significant in the expanded regression model, which included all previously tested horses from Ganzenberg et al. [38] (Table S10, Supplementary Materials).

Due to the observation that grazing animals are considered a good sentinel for the presence of TBEV in a certain area, one would expect a link between human TBEV cases and the equine seropositive ratio [93,97]. In this study, however, an above-average seropositive ratio of TBEV was detected in counties such as Dahme-Spreewald (15%; 95% CI: 9.69–21.01), which is not registered as an official risk area [98]. On the other hand, some official risk area counties, such as Oberspreewald-Lausitz (3%; 95% CI: 0.01–16.22), showed a below-average seropositive ratio, while others, such as Dessau-Rosslau (17%; 95% CI: 5.01–40.05), showed a high seropositive ratio. These results indicate that TBEV infections in horses happen regularly in the studied area, even if the specific counties still are not recognized as official TBEV risk areas due to the low incidence of human TBEV disease. The fact that three out of four seroconversions occurred in the counties of (1) Elbe-Elster and (2) Northern Saxony supports the theory of active infection cycles in these counties. Therefore, TBEV-seropositive horses could be an additional tool to assess the risk of human TBEV, besides the sole evaluation based on the number of human cases.

Since its first emergence in central Europe in 1996, Usutu virus has been isolated in many European countries, including Germany [40,41]. Although WNV and USUV share many virological aspects in this study, we confirmed previously detected antibodies against

USUV in four retested horses and detected one new USUV-seropositive horse, as well as one horse with a potential co-infection of USUV and WNV. Since these horses did not travel abroad and were born in Germany, we conclude that these infections were also acquired autochthonously in the study area. Because holdings with already known USUV-positive equids were included, the seropositive ratio of USUV is likely overestimated.

5. Conclusions

This study showed further evidence for the presence of WNV infection in the eastern-central German horse population. The seroconversion in horses for WNV and TBEV demonstrates that these viruses circulate in the study area and were transmitted to horses also in 2021. Nevertheless, horses were WNV sentinels in areas without previous clinical cases in horses and humans. Risk factors predicting seropositivity for TBEV in horses were increasing age and decreasing number of horses on the holding. As searching for TBEV in ticks has been shown to not be constructive, serology in horses is a very useful sentinel tool to detect virus circulation in a given area to detect natural foci. This paper confirmed the presence of equine USUV infections in eastern-central Germany. Finally, this work provided evidence for the presence of neutralizing antibodies against TBEV and USUV in horse sera for at least 15 months in eastern-central Germany.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15051108/s1>, Table S1: Holdings included in the study and results of serological testing (n = 1232); Table S2: Descriptive statistics for equids included in the study, and answers from questionnaire about potential risk factors for WNV-seropositivity (n = 1211); Table S3: Descriptive statistics for horses included in the study, and answers from questionnaire about potential risk factors for TBEV seropositivity (n = 1211); Table S4: Comparison between the datasets of the present study and Ganzenberg et al. (2022); Table S5: Outcome of the virus neutralization tests (VNT) for 117 horses testing positive or equivocal by competitive ELISA (cELISA); Table S6: univariate analyses (chi-square, *t*-test) of potential risk factors for WNV seropositivity in 1211 horses; Table S7: Logistic regression model (complete data) for the relation of potential risk factors with WNV seropositivity in 1211 horses; Table S8: Logistic regression model (complete data) for the relation of potential risk factors with WNV seropositivity in 1228 horses (17 previously positive horses from 2020 included); Table S9: Logistic regression model (complete data) for the relation of risk factors with TBEV seropositivity in 1211 horses; Table S10: Logistic regression model (complete data) for the relation of risk factors with TBEV seropositivity in 1935 horses (complete dataset of all tested horses in 2020 and 2022); File S1: standardized questionnaire for epidemiological data collection.

Author Contributions: Conceptualization: K.L.L., M.P., S.G. and L.M.R.G.; methodology: K.L.L., M.P., U.Z. and L.M.R.G.; formal analyses: U.Z. and L.M.R.G.; investigation: U.Z. and L.M.R.G.; resources: T.W.V., U.H., U.Z. and M.H.G.; data curation: U.Z., A.O. and L.M.R.G.; writing—original draft preparation: L.M.R.G. and A.O.; writing—review and editing: A.O., K.L.L., M.P., S.G., U.Z., M.S., T.W.V., U.H., M.H.G. and L.M.R.G.; visualization: U.Z. and L.M.R.G.; supervision: K.L.L. and M.P.; project administration: K.L.L., M.P. and L.M.R.G.; funding acquisition: M.P. and K.L.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This project was funded as part of the collaborative project “WISSDIP” (Prevalence of WNV infections in mosquitoes and mammals in endemically affected rural and urban areas in Germany—possible immunoprophylaxis in horses) by the Federal Ministry of Education and Research (01KI2026B), Boehringer Ingelheim Vetmedica GmbH, Germany (funding number: 493469), and the Albrecht Daniel Thaer-Institute of Agricultural and Horticultural Sciences. The funding bodies had no role in the design of the study; in the implementation of the experiment; in the collection, analysis, or interpretation of the data; in the writing of the manuscript; or in the decision to publish the results.

Institutional Review Board Statement: This study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki. The animal study protocol was approved by the ‘Landesdirektion Sachsen’ (Saxony) (Nr. A06/20), the ‘Landesamt für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit Brandenburg’ (Nr. 2347-A-33-1-2020), and the ‘Landesverwaltungsamt, Referat Verbraucherschutz, Veterinärangelegenheiten Sachsen-Anhalt’ (Saxony-Anhalt) (AZ: 42502-3-892 KlinikPferd).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all horse owners in the study.

Data Availability Statement: The results data of the study are available in the publication or the Supplementary Materials. Further specific information regarding the datasets analyzed during the study can be obtained from the corresponding authors upon reasonable request.

Acknowledgments: This study was realized thanks to the help of colleagues and staff at the animal disease funds in Saxony and Saxony-Anhalt, the 'Landesamt für Arbeitsschutz, Verbraucherschutz und Gesundheit', and colleagues at the Veterinary Offices for Elbe-Elster, Potsdam-Mittelmark, and Dahme-Spreewald. This help and friendly cooperation are highly appreciated and were essential in completing this work. Additionally, we thank all the horse owners who volunteered to participate in the study; for this active participation of owners and animals, we are very thankful. Furthermore, we thank Cornelia Steffen and Katja Wittig (FLL, Greifswald-Insel Riems) for their excellent technical assistance in the laboratory.

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

References

- Deubel, V.; Fiette, L.; Gounon, P.; Drouet, M.T.; Khun, H.; Huerre, M.; Banet, C.; Malkinson, M.; Despres, P. Variations in biological features of West Nile viruses. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2001**, *951*, 195–206. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Castle, E.; Wengler, G. Nucleotide sequence of the 5'-terminal untranslated part of the genome of the flavivirus West Nile virus. *Arch. Virol.* **1987**, *92*, 309–313. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Fuzik, T.; Formanova, P.; Ruzek, D.; Yoshii, K.; Niedrig, M.; Plevka, P. Structure of tick-borne encephalitis virus and its neutralization by a monoclonal antibody. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–11. [\[CrossRef\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#)
- Chancey, C.; Grinev, A.; Volkova, E.; Rios, M. The Global Ecology and Epidemiology of West Nile Virus. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–20. [\[CrossRef\]](#)
- Pachler, K.; Lebl, K.; Berer, D.; Rudolf, I.; Hubalek, Z.; Nowotny, N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 2119–2122. [\[CrossRef\]](#)
- Fall, G.; Di Paola, N.; Faye, M.; Dia, M.; Freire, C.C.M.; Loucoubar, C.; Zanotto, P.M.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. [\[CrossRef\]](#)
- van der Meulen, K.M.; Pensaert, M.B.; Nauwynck, H.J. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch. Virol.* **2005**, *150*, 637–657. [\[CrossRef\]](#)
- 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. [\[CrossRef\]](#)
- Kilpatrick, A.M.; Kramer, L.D.; Campbell, S.R.; Alleyne, E.O.; Dobson, A.P.; Daszak, P. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 425–429. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Savage, H.M. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes (vol 61, pg 600, 1999). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2000**, *62*, 162.
- Turell, M.J.; Dohm, D.J.; Sardelis, M.R.; Oguinn, M.L.; Andreadis, T.G.; Blow, J.A. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J. Med. Entomol.* **2005**, *42*, 57–62. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Root, J.J.; Bosco-Lauth, A.M. West Nile Virus Associations in Wild Mammals: An Update. *Viruses* **2019**, *11*, 459. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Bunning, M.L.; Bowen, R.A.; Cropp, C.B.; Sullivan, K.G.; Davis, B.S.; Komar, N.; Godsey, M.S.; Baker, D.; Hettler, D.L.; Holmes, D.A.; et al. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg. Infect. Dis.* **2002**, *8*, 380–386. [\[CrossRef\]](#)
- Mencattelli, G.; Ndione, M.H.D.; Rosa, 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. [\[CrossRef\]](#)
- Zeller, H.G.; Schuffenecker, I. West Nile virus: An overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *23*, 147–156. [\[CrossRef\]](#)
- Bakonyi, T.; Ivanics, E.; Erdelyi, 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. [\[CrossRef\]](#)
- de Heus, P.; Kolodziejek, J.; Camp, J.V.; Dimmel, K.; Bago, Z.; Hubalek, Z.; van den Hoven, R.; Cavalleri, J.V.; Nowotny, N. Emergence of West Nile virus lineage 2 in Europe: Characteristics of the first seven cases of West Nile neuroinvasive disease in horses in Austria. *Transbound. Emerg. Dis.* **2020**, *67*, 1189–1197. [\[CrossRef\]](#)

20. Bakonyi, T.; Ferenczi, E.; Erdelyi, K.; Kutasi, O.; Csorgo, T.; Seidel, B.; Weissenbock, H.; Brugger, K.; Ban, E.; Nowotny, N. Explosive spread of a neuroinvasive lineage 2 West Nile virus in Central Europe, 2008/2009. *Vet. Microbiol.* **2013**, *165*, 61–70. [[CrossRef](#)]
21. Papa, A.; Xanthopoulou, K.; Gewehr, S.; Mourelatos, S. Detection of West Nile virus lineage 2 in mosquitoes during a human outbreak in Greece. *Clin. Microbiol. Infect.* **2011**, *17*, 1176–1180. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Sirbu, A.; Ceianu, C.S.; Panculescu-Gatej, R.I.; Vazquez, A.; Tenorio, A.; Rebreanu, R.; Niedrig, M.; Nicolescu, G.; Pistol, A. Outbreak of West Nile virus infection in humans, Romania, July to October 2010. *Euro Surveill.* **2011**, *16*, 19762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Busquets, N.; Laranjo-Gonzalez, M.; Soler, M.; Nicolas, O.; Rivas, R.; Talavera, S.; Villalba, R.; San Miguel, E.; Torner, N.; Aranda, C.; et al. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia). *Transbound. Emerg. Dis.* **2019**, *66*, 617–621. [[CrossRef](#)]
24. Ziegler, U.; Luhken, R.; Keller, M.; Cadar, D.; van der Grinten, E.; Michel, F.; Albrecht, K.; Eiden, M.; Rinder, M.; Lachmann, L.; et al. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antivir. Res.* **2019**, *162*, 39–43. [[CrossRef](#)]
25. Wodak, E.; Richter, S.; Bago, Z.; Revilla-Fernandez, S.; Weissenbock, H.; Nowotny, N.; Winter, P. Detection and molecular analysis of West Nile virus infections in birds of prey in the eastern part of Austria in 2008 and 2009. *Vet. Microbiol.* **2011**, *149*, 358–366. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Pietsch, C.; Michalski, D.; Munch, J.; Petros, S.; Bergs, S.; Trawinski, H.; Lubbert, C.; Liebert, U.G. Autochthonous West Nile virus infection outbreak in humans, Leipzig, Germany, August to September 2020. *Eurosurveillance* **2020**, *25*, 2001786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ziegler, U.; Santos, P.D.; Groschup, M.H.; Hattendorf, C.; Eiden, M.; Hoper, D.; Eisermann, P.; Keller, M.; Michel, F.; Klopffleisch, R.; et al. West Nile Virus Epidemic in Germany Triggered by Epizootic Emergence, 2019. *Viruses* **2020**, *12*, 448. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Ziegler, U.; Bergmann, F.; Fischer, D.; Muller, K.; Holicki, C.M.; Sadeghi, B.; Sieg, M.; Keller, M.; Schwehn, R.; Reuschel, M.; et al. Spread of West Nile Virus and Usutu Virus in the German Bird Population, 2019–2020. *Microorganisms* **2022**, *10*, 807. [[CrossRef](#)]
29. Gardner, I.A.; Wong, S.J.; Ferraro, G.L.; Balasuriya, U.B.; Hullinger, P.J.; Wilson, W.D.; Shi, P.Y.; MacLachlan, N.J. Incidence and effects of West Nile virus infection in vaccinated and unvaccinated horses in California. *Vet. Res.* **2007**, *38*, 109–116. [[CrossRef](#)]
30. Ostlund, E.N.; Andresen, J.E.; Andresen, M. West Nile encephalitis. *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* **2000**, *16*, 427–441. [[CrossRef](#)]
31. Lohmann, K.L.; Sieg, M.; Landmann, M.; Ganzenberg, S.; Arnold, C.; Vahlenkamp, T.; Ulrich, R.G. West-Nil-Virus-Infektion bei 12 Pferden in Mitteldeutschland. *Tierarztl. Prax. Ausg. G Grosstiere Nutztiere* **2022**, *50*, 362–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Seino, K.K.; Long, M.T.; Gibbs, E.P.; Bowen, R.A.; Beachboard, S.E.; Humphrey, P.P.; Dixon, M.A.; Bourgeois, M.A. 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*, 1465–1471. [[CrossRef](#)]
33. Minke, J.M.; Siger, L.; Cupillard, L.; Powers, B.; Bakonyi, T.; Boyum, S.; Nowotny, N.; Bowen, R. Protection provided by a recombinant ALVAC(R)-WNV vaccine expressing the prM/E genes of a lineage 1 strain of WNV against a virulent challenge with a lineage 2 strain. *Vaccine* **2011**, *29*, 4608–4612. [[CrossRef](#)]
34. Long, M.T.; Gibbs, E.P.; Mellencamp, M.W.; Bowen, R.A.; Seino, K.K.; Zhang, S.; Beachboard, S.E.; Humphrey, P.P. Efficacy, duration, and onset of immunogenicity of a West Nile virus vaccine, live Flavivirus chimera, in horses with a clinical disease challenge model. *Equine Vet. J.* **2007**, *39*, 491–497. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Long, M.T.; Gibbs, E.P.; Mellencamp, M.W.; Zhang, S.; Barnett, D.C.; Seino, K.K.; Beachboard, S.E.; Humphrey, P.P. Safety of an attenuated West Nile virus vaccine, live Flavivirus chimera in horses. *Equine Vet. J.* **2007**, *39*, 486–490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Bergmann, F.; Trachsel, D.S.; Stoeckle, S.D.; Bernis Sierra, J.; Lübke, S.; Groschup, M.H.; Gehlen, H.; Ziegler, U. Seroepidemiological Survey of West Nile Virus Infections in Horses from Berlin/Brandenburg and North Rhine-Westphalia, Germany. *Viruses* **2022**, *14*, 243. [[CrossRef](#)]
37. Ziegler, U.; Angenvoort, J.; Klaus, C.; Nagel-Kohl, U.; Sauerwald, C.; Thalheim, S.; Horner, S.; Braun, B.; Kenkies, S.; Tyczka, J.; et al. Use of competition ELISA for monitoring of West Nile virus infections in horses in Germany. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2013**, *10*, 3112–3120. [[CrossRef](#)]
38. Ganzenberg, S.; Sieg, M.; Ziegler, U.; Pfeffer, M.; Vahlenkamp, T.W.; Hörügel, U.; Groschup, M.H.; Lohmann, K.L. Seroprevalence and Risk Factors for Equine West Nile Virus Infections in Eastern Germany, 2020. *Viruses* **2022**, *14*, 1191. [[CrossRef](#)]
39. Williams, M.C.; Knight, E.M.; Haddow, A.J.; Simpson, D.I.H. Isolation of West Nile Virus from Man + of Usutu Virus from Bird-Biting Mosquito *Mansonia Aurites* (Theobald) in Entebbe Area of Uganda. *Ann. Trop. Med. Parasit.* **1964**, *58*, 367–374. [[CrossRef](#)]
40. Weissenbock, 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. [[CrossRef](#)]
41. 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*, 699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Weissenbock, H.; Bakonyi, T.; Rossi, G.; Mani, P.; Nowotny, N. Usutu virus, Italy, 1996. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 274–277. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

44. Chvala, S.; Bakonyi, T.; Bukovsky, C.; Meister, T.; Brugger, K.; Rubel, F.; Nowotny, N.; Weissenböck, H. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003–2005. *Vet. Microbiol.* **2007**, *122*, 237–245. [\[CrossRef\]](#)
45. Weissenböck, H.; Hubalek, Z.; Halouzka, J.; Pichlmair, A.; Maderner, A.; Fragner, K.; Kolodziejek, J.; Loupal, G.; Kolbl, S.; Nowotny, N. Screening for West Nile virus infections of susceptible animal species in Austria. *Epidemiol. Infect.* **2003**, *131*, 1023–1027. [\[CrossRef\]](#)
46. Cook, C.L.; Huang, Y.S.; Lyons, A.C.; Alto, B.W.; Unlu, I.; Higgs, S.; Vanlandingham, D.L. North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2018**, *12*, e0006732. [\[CrossRef\]](#)
47. Holicki, C.M.; Scheuch, D.E.; Ziegler, U.; Lettow, J.; Kampen, H.; Werner, D.; Groschup, M.H. German *Culex pipiens* biotype molestus and *Culex torrentium* are vector-competent for Usutu virus. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 625. [\[CrossRef\]](#)
48. Zannoli, S.; Sambri, V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* **2019**, *7*, 184. [\[CrossRef\]](#)
49. Constant, O.; Gil, P.; Barthelemy, J.; Bollere, K.; Foulongne, V.; Desmetz, C.; Leblond, A.; Desjardins, I.; Pradier, S.; Joulie, 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*, 2200068. [\[CrossRef\]](#)
50. Cavalleri, J.M.V.; Korbacska-Kutasi, O.; Leblond, A.; Paillot, R.; Pusterla, N.; Steinmann, E.; Tomlinson, J. European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. *J. Vet. Intern. Med.* **2022**, *36*, 1858–1871. [\[CrossRef\]](#)
51. 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. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Pecorari, M.; Longo, G.; Gennari, W.; Grotola, A.; Sabbatini, A.M.; Tagliazucchi, S.; Savini, G.; Monaco, F.; Simone, M.L.; Lelli, R.; et al. First human case of usutu virus neuroinvasive infection, italy, august–september 2009. *Eurosurveillance* **2009**, *14*, 15–16. [\[CrossRef\]](#)
53. Holbrook, M.R.; Shope, R.E.; Barrett, A.D.T. Use of Recombinant E Protein Domain III-Based Enzyme-Linked Immunosorbent Assays for Differentiation of Tick-Borne Encephalitis Serocomplex Flaviviruses from Mosquito-Borne Flaviviruses. *J. Clin. Microbiol.* **2004**, *42*, 4101–4110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Wondim, M.A.; Czupryna, P.; Pancewicz, S.; Kruszewska, E.; Groth, M.; Moniuszko-Malinowska, A. Epidemiological Trends of Trans-Boundary Tick-Borne Encephalitis in Europe, 2000–2019. *Pathogens* **2022**, *11*, 704. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
55. Toneri, E.; Kipar, A.; Voutilainen, L.; Vene, S.; Vaheri, A.; Vapalahti, O.; Lundkvist, A. The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*). *PLoS ONE* **2013**, *8*, e81214. [\[CrossRef\]](#)
56. Imhoff, M.; Hagedorn, P.; Schulze, Y.; Hellenbrand, W.; Pfeffer, M.; Niedrig, M. Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2015**, *6*, 592–600. [\[CrossRef\]](#)
57. Brandenburg, P.J.; Obiegala, A.; Schmuck, H.M.; Dobler, G.; Chitimia-Dobler, L.; Pfeffer, M. Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Virus Antibodies in Wild Rodents from Two Natural TBE Foci in Bavaria, Germany. *Pathogens* **2023**, *12*, 185. [\[CrossRef\]](#)
58. Estrada-Pena, A.; de la Fuente, J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antivir. Res.* **2014**, *108*, 104–128. [\[CrossRef\]](#)
59. Deviatkin, A.A.; Kholodilov, I.S.; Vakulenko, Y.A.; Karganova, G.G.; Lukashev, A.N. Tick-Borne Encephalitis Virus: An Emerging Ancient Zoonosis? *Viruses* **2020**, *12*, 247. [\[CrossRef\]](#)
60. Dobler, G. Zoonotic tick-borne flaviviruses. *Vet. Microbiol.* **2010**, *140*, 221–228. [\[CrossRef\]](#)
61. Kaiser, R. Tick-borne encephalitis. *Nervenarzt* **2016**, *87*, 667–678. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Klaus, C.; Horugel, U.; Hoffmann, B.; Beer, M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: Clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet. Microbiol.* **2013**, *163*, 368–372. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Pautienius, A.; Armonaite, A.; Simkute, E.; Zagrabskaitė, R.; Buitkuvienė, J.; Alpizar-Jara, R.; Grigas, J.; Zakiene, I.; Zienius, D.; Salomskas, A.; et al. Cross-Sectional Study on the Prevalence and Factors Influencing Occurrence of Tick-Borne Encephalitis in Horses in Lithuania. *Pathogens* **2021**, *10*, 140. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
64. Magouras, I.; Schoster, A.; Fouche, N.; Gerber, V.; Groschup, M.H.; Ziegler, U.; Fricker, R.; Griot, C.; Vogtlin, A. Neurological disease suspected to be caused by tick-borne encephalitis virus infection in 6 horses in Switzerland. *J. Vet. Intern. Med.* **2022**, *36*, 2254–2262. [\[CrossRef\]](#)
65. Angelini, P.; Tamba, M.; Finarelli, A.C.; Bellini, R.; Albieri, A.; Bonilauri, P.; Cavrini, F.; Dottori, M.; Gaibani, P.; Martini, E.; et al. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: The integrated surveillance system 2009. *Eurosurveillance* **2010**, *15*, 11–15. [\[CrossRef\]](#)
66. Paternoster, G.; Martins, S.B.; Mattivi, A.; Cagarelli, R.; Angelini, P.; Bellini, R.; Santi, A.; Galletti, G.; Pupella, S.; Marano, G.; et al. Economics of One Health: Costs and benefits of integrated West Nile virus surveillance in Emilia-Romagna. *PLoS ONE* **2017**, *12*, e0188156. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
67. Leblond, A.; Hendriks, P.; Sabatier, P. West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2007**, *7*, 403–410. [\[CrossRef\]](#)
68. Klaus, C.; Beer, M.; Saier, R.; Schubert, H.; Bischoff, S.; Suss, J. Evaluation of serological tests for detecting tick-borne encephalitis virus (TBEV) antibodies in animals. *Berl. Und Munch. Tierarztl. Wochenschr.* **2011**, *124*, 443–449. [\[CrossRef\]](#)

69. Seidowski, D.; Ziegler, U.; von Ronn, J.A.; Muller, K.; Huppopp, K.; Muller, T.; Freuling, C.; Muhle, R.U.; Nowotny, N.; Ulrich, R.G.; et al. West Nile virus monitoring of migratory and resident birds in Germany. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 639–647. [\[CrossRef\]](#)
70. de Heus, P.; Kolodziejek, J.; Hubalek, Z.; Dimmel, K.; Racher, V.; Nowotny, N.; Cavalleri, J.M.V. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses* **2021**, *13*, 1873. [\[CrossRef\]](#)
71. Barbic, L.; Listes, E.; Katic, S.; Stevanovic, V.; Madic, J.; Staresina, V.; Labrovic, A.; Di Gennaro, A.; Savini, G. Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet. Microbiol.* **2012**, *159*, 504–508. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
72. Mangana-Vougiouka, O.; Boutsini, S.; Ntousi, D.; Patakakis, M.; Orfanou, E.; Zafiropoulou, K.; Dilaveris, D.; Panagiotatos, D.; Nomikou, K. Epizootiological investigation of the most important infectious equine diseases in Greece. *Rev. Sci. Tech. Oie* **2013**, *32*, 775–787. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
73. Napp, S.; Llorente, F.; Beck, C.; Jose-Cunilleras, E.; Soler, M.; Pailer-Garcia, L.; Amaral, R.; Aguilera-Sepulveda, P.; Pifarre, M.; Molina-Lopez, R.; et al. Widespread Circulation of Flaviviruses in Horses and Birds in Northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses* **2021**, *13*, 2404. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
74. Jimenez-Clavero, M.A.; Llorente, F.; Sotelo, E.; Soriguer, R.; Gomez-Tejedor, C.; Figuerola, J. West Nile virus serosurveillance in horses in Donana, Spain, 2005 to 2008. *Vet. Rec.* **2010**, *167*, 379–380. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
75. Garcia-Bocanegra, I.; Arenas-Montes, A.; Napp, S.; Jaen-Tellez, J.A.; Fernandez-Morente, M.; Fernandez-Molera, V.; Arenas, A. Seroprevalence and risk factors associated to West Nile virus in horses from Andalusia, Southern Spain. *Vet. Microbiol.* **2012**, *160*, 341–346. [\[CrossRef\]](#)
76. Rexhepi, A.; Sherifi, K.; Berxholi, K.; Xhekaj, B.; Muja-Bajraktari, N.; Ozkul, A.; von Possel, R.; Emmerich, P. First Serological Evidence of West Nile Virus Among Equines and Birds in Kosovo, 2018–2019. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2021**, *21*, 116–120. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Ziegler, U.; Skrypnyk, A.; Keller, M.; Staubach, C.; Bezymennyi, M.; Damiani, A.M.; Osterrieder, N.; Groschup, M.H. West Nile virus antibody prevalence in horses of Ukraine. *Viruses* **2013**, *5*, 2469–2482. [\[CrossRef\]](#)
78. Bazanow, B.; Jansen van Vuren, P.; Szymanski, P.; Stygar, D.; Fracka, A.; Twardon, J.; Kozdrowski, R.; Paweska, J.T. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **2018**, *10*, 87. [\[CrossRef\]](#)
79. Maquart, M.; Dahmani, M.; Marie, J.L.; Gravier, P.; Leparç-Goffart, I.; Davoust, B. First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 275–277. [\[CrossRef\]](#)
80. Lupulovic, D.; Martin-Acebes, M.A.; Ladic, S.; Alonso-Padilla, J.; Blazquez, 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. [\[CrossRef\]](#)
81. Guerrero-Carvajal, F.; Bravo-Barriga, D.; Martin-Cuervo, M.; Aguilera-Sepulveda, P.; Ferraguti, M.; Jimenez-Clavero, M.A.; Llorente, F.; Alonso, J.M.; Frontera, E. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound. Emerg. Dis.* **2021**, *68*, 1432–1444. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
82. Berxholi, K.; Ziegler, U.; Rexhepi, A.; Schmidt, K.; Mertens, M.; Korro, K.; Cuko, A.; Angenwoort, J.; Groschup, M.H. Indigenous West Nile Virus Infections in Horses in Albania. *Transbound. Emerg. Dis.* **2013**, *60*, 45–50. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
83. Folly, A.J.; Waller, E.S.L.; McCracken, F.; McElhinney, L.M.; Roberts, H.; Johnson, N. Equine seroprevalence of West Nile virus antibodies in the UK in 2019. *Parasit. Vectors* **2020**, *13*, 596. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
84. Niczyporuk, J.S.; Samorek-Salamonowicz, E.; Lecollinet, S.; Pancewicz, S.A.; Kozdrun, W.; Czekaj, H. Occurrence of West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Horses, and Humans in Poland. *Biomed. Res. Int.* **2015**, *2015*, 1–5. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
85. Madic, J.; Savini, G.; Di Gennaro, A.; Monaco, F.; Jukic, B.; Kovac, S.; Rudan, N.; Listes, E. Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. *Vet. Rec.* **2007**, *160*, 772–773. [\[CrossRef\]](#)
86. Angenwoort, J.; Brault, A.C.; Bowen, R.A.; Groschup, M.H. West Nile viral infection of equids. *Vet. Microbiol.* **2013**, *167*, 168–180. [\[CrossRef\]](#)
87. Nielsen, C.F.; Reisen, W.K.; Armijos, M.V.; MacLachlan, N.J.; Scott, T.W. High subclinical West Nile virus incidence among nonvaccinated horses in Northern California associated with low vector abundance and infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2008**, *78*, 45–52. [\[CrossRef\]](#)
88. Beck, C.; Jimenez-Clavero, M.A.; Leblond, A.; Durand, B.; Nowotny, N.; Leparç-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. [\[CrossRef\]](#)
89. Vinogradova, E.B. *Culex Pipiens Pipiens Mosquitoes: Taxonomy, Distribution, Ecology, Physiology, Genetics, Applied Importance and Control*; Pensoft: Moscow and Sofia, Russia, 2000; p. 250.
90. Camino, E.; Schmid, S.; Weber, F.; Pozo, P.; de Juan, L.; Konig, M.; Cruz-Lopez, F. Detection of antibodies against tick-borne encephalitis flaviviruses in breeding and sport horses from Spain. *Ticks Tick. Borne Dis.* **2020**, *11*, 101487. [\[CrossRef\]](#)
91. Müller, K. Untersuchung zum Vorkommen von Antikörpern gegen das “Tick Borne Encephalitis Virus” (TBEV) beim Pferd im Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf. Ph.D. Thesis, VVB Laufersweiler. Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen, Giessen, Germany, 2006.
92. Rushton, J.O.; Lecollinet, S.; Hubalek, Z.; Svobodova, P.; Lussy, H.; Nowotny, N. Tick-borne Encephalitis Virus in Horses, Austria, 2011. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 635–637. [\[CrossRef\]](#)

93. Janitza-Futterer, D. Serologische Untersuchungen zur endemischen Situation der Infektion mit dem FSME-Virus in einer süd-badischen Pferde- und Hundepopulation. Ph.D. Thesis, Tierärztliche Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München, Germany, 2003.
94. Sikutova, S.; Hornok, S.; Hubalek, Z.; Dolezalkova, I.; Juricova, Z.; Rudolf, I. Serological survey of domestic animals for tick-borne encephalitis and Bhanja viruses in northeastern Hungary. *Vet. Microbiol.* **2009**, *135*, 267–271. [[CrossRef](#)]
95. Mburu, M.M.; Zembere, K.; Mzilahowa, T.; Terlouw, A.D.; Malenga, T.; van den Berg, H.; Takken, W.; McCann, R.S. Impact of cattle on the abundance of indoor and outdoor resting malaria vectors in southern Malawi. *Malar. J.* **2021**, *20*, 353. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
96. Huang, C.I.; Kay, S.C.; Davis, S.; Tufts, D.M.; Gaffett, K.; Tefft, B.; Diuk-Wasser, M.A. High burdens of *Ixodes scapularis* larval ticks on white-tailed deer may limit Lyme disease risk in a low biodiversity setting. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2019**, *10*, 258–268. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
97. Klaus, C.; Beer, M.; Saier, R.; Schau, U.; Moog, U.; Hoffmann, B.; Diller, R.; Suss, J. Goats and sheep as sentinels for tick-borne encephalitis (TBE) virus—Epidemiological studies in areas endemic and non-endemic for TBE virus in Germany. *Ticks Tick-Borne Dis.* **2012**, *3*, 27–37. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
98. RKI. Karte der FSME-Risikogebiete. Available online: https://www.rki.de/DE/Content/InfAZ/F/FSME/Karte_Tab.html (accessed on 17 January 2023).

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

3.2 Ergänzende Daten der Publikation

Tabelle 2: Auflistung der beprobten Betriebe

LK	ID	Pferde / Betrieb (n)	WNV-geimpfte Pferde/ Betrieb n (%)	Beprobte Pferde/ Betrieb n (%)	WNV pos. Pferde/ Betrieb n(%)	TBEV pos. Pferde/ Betrieb n(%)	USUV pos. Pferde/ Betrieb n(%)
ABI	42	21	0	21 (100,0)	0	0	0
	43	10	0	8 (80,0)	0	0	0
	44	25	15 (60)	10 (40,0)	0	1 (10,0)	0
	49	6	0	5 (83,3)	0	0	0
	59	80	56 (70)	9 (11,3)	0	0	0
	60	20	2 (10)	5 (25,0)	0	0	0
Gesamt	6	162	73	58	0	1	0
DR	50	19	1 (5,3)	18 (94,7)	0	3 (16,7)	0
Gesamt	1	19	1	18	0	3	0
JL	20	18	0	15 (83,3)	1 (5,5)	0	0
	21	15	4 (26,6)	6 (40,0)	0	0	0
	22	6	3 (50,0)	3 (50,0)	0	0	0
	23	50	0	45 (90,0)	0	4 (8,0)	0
	24	8	0	6 (75,0)	0	0	0
	26	7	1 (14,3)	3 (42,9)	0	0	0
	27	11	0	11 (100,0)	0	0	1 (9,1)
	28	5	0	4 (80,0)	0	0	0
Gesamt	8	120	8	93	1	4	1
SZK	13	7	2 (28,6)	3 (42,9)	0	0	0
	14	2	0	2 (10,00)	0	0	0
	15	24	2 (8,3)	10 (42,7)	0	0	0
	16	14	7 (50,0)	7 (50,0)	1 (7,1)	0	0
	17	4	0	4 (100,0)	0	0	0
	18	7	0	7 (100,0)	0	0	0
	19	5	0	4 (80,0)	0	0	0
	25	6	1 (16,6)	5 (8,33)	0	0	0
	51	25	4 (16,0)	9 (36,0)	1 (4,0)	0	0
	Gesamt	9	94	16	51	2	0
SLK	1	75	30 (40,0)	23 (3,6)	2 (2,6)	0	0
	2	30	12 (40,0)	10 (33,3)	5 (16,6)	0	0
	3	20	3 (15,0)	5 (25,0)	0	0	0
	4	5	0	4 (80,0)	0	0	0
	5	7	3 (43,3)	3 (43,3)	0	2 (66,6)	0
	7	5	0	4 (80,0)	0	0	0
	8	25	8 (32,0)	12 (48,0)	0	1 (8,3)	0
	9	49	15 (30,6)	30 (61,2)	2 (4,1)	0	0
	10	5	0	5 (100,0)	1 (20)	0	0
	11	24	3 (12,5)	5 (20,8)	0	0	0
	12	6	1 (16,6)	5 (83,3)	0	0	0
	28	12	0	11 (91,7)	0	0	0
	29	6	0	6 (100,0)	0	0	0
	30	2	0	2 (100,0)	1 (50,0)	0	0
	31	27	19 (70,4)	7	0	0	0
	Gesamt	15	298	94	132	11	3

WB	34	7	0	4 (57,1)	0	0	0	
	35	34	10 (29,4)	18 (52,9)	1 (2,9)	2 (5,9)	0	
	36	8	0	3 (37,5)	0	0	1 (12,5)	
	37	32	0	13 (40,6)	0	0	0	
Gesamt	4	81	10	38	1	2	1	
LD	69	13	0	11 (84,6)	0	0	0	
	90	7	0	7 (100,0)	1 (14,3)	0	0	
	102	8	0	8 (100,0)	0	0	0	
Gesamt	3	28	0	26	1	0	0	
NS	45	14	0	12 (85,7)	0	1 (7,1)	0	
	46	22	24 (51,1)	15 (31,9)	0	4 (8,5)	0	
	47	40	40 (75,0)	11 (27,5)	0	0	0	
	48	37	7 (19,4)	26 (70,3)	1 (2,7)	0	0	
	61	6	1 (16,7)	5 (83,3)	1 (16,7)	0	0	
	62	17	8 (47,1)	7 (41,2)	0	0	0	
	88	11	0	10 (90,9)	0	0	0	
	Gesamt	7	147	80	86	2	5	0
CS	63	22	0	20 (90,9)	0	1 (4,5)	0	
	64	30	0	5 (100,0)	0	4 (80,0)	0	
	65	5	0	5 (100,0)	0	0	0	
	66	17	1 (5,9)	13 (76,5)	0	0	0	
	67	55	24 (43,6)	30 (54,5)	0	1 (1,8)	0	
	68	5	0	5 (100,0)	0	0	0	
	79	20	1 (9,1)	9 (81,8)	0	1 (9,1)	0	
	80	20	5 (25,0)	3 (15,0)	0	0	0	
	81	4	0	4 (100,0)	0	0	0	
	82	4	0	4 (100,0)	0	0	0	
	83	30	0	9 (30,0)	1 (3,3)	0	0	
	103	45	2 (4,4)	21 (46,7)	0	0	0	
	104	4	0	4 (100,0)	0	0	0	
	Gesamt	14	361	33	137	1	8	0
MS	89	21	0	13 (61,9)	0	4 (19,1)	0	
	101	7	0	6 (85,7)	0	0	0	
	113	33	3 (17,6)	11 (64,7)	0	0	0	
	114	20	0	16 (80,0)	2 (10,0)	1 (5,0)	0	
Gesamt	4	81	3	46	2	5	0	
D	75	20	6 (30,0)	11 (55,0)	0	0	0	
	76	11	0	10 (90,9)	0	1 (9,1)	2 (18,2)	
	77	11	0	7 (100,0)	0	0	0	
	78	9	0	5 (100,0)	0	0	0	
	100	18	0	16 (88,9)	2 (11,2)	0	0	
Gesamt	5	69	6	49	2	1	2	
EE	33	30	2 (6,7)	21 (70,0)	0	10 (47,6)	0	
	38	80	0	42 (52,5)	3 (3,75)	0	0	
	39	6	0	5 (83,3)	0	1 (16,6)	0	
	40	5	0	5 (100,0)	0	0	1 (20,0)	
	41	17	0	13 (76,5)	0	1 (5,9)	0	
	52	4	0	4 (100,0)	0	0	0	
	53	7	0	7 (100,0)	0	0	0	
	54	1	0	1 (100,0)	0	0	0	
	55	6	0	6 (100,0)	0	0	0	
	56	24	1 (4,2)	21 (87,5)	2 (8,3)	0	0	
	57	10	0	4 (40,0)	0	0	0	
	58	10	4 (80,0)	4 (40,0)	2 (20,0)	0	0	
	93	30	3 (10,0)	26 (86,7)	1 (3,3)	0	0	
	Gesamt	13	230	10	159	8	12	1

OSL	71	60	12 (20,0)	32 (53,3)	3 (5,0)	1 (1,7)	0
	73	2	0	1 (50,0)	0	0	0
	74	1	0	1 (100,0)	0	0	0
Gesamt	3	63	12	34	3	1	0
DS	70	95	15 (15,8)	49 (51,6)	2 (2,1)	0	0
	72	15	0	11 (73,3)	1 (6,7)	2 (13,3)	0
	91	19	6 (31,6)	9 (47,4)	0	0	0
	92	7	0	7 (100,0)	0	0	0
	94	6	0	6 (100,0)	0	2 (33,3)	0
	95	7	0	5 (71,4)	0	0	0
	96	27	11 (40,7)	15 (55,6)	0	0	0
	97	13	0	12 (92,3)	0	9 (69,2)	0
	98	9	7 (77,7)	2 (22,2)	0	0	0
	99	11	0	11 (100,0)	0	0	0
	106	17	6 (35,3)	5 (29,4)	1 (5,9)	0	0
	110	23	1 (4,3)	20 (86,9)	0	9 (39,1)	0
Gesamt	12	249	46	152	4	22	0
PM	84	8	0	8 (100,0)	0	0	0
	85	15	0	10 (100,0)	0	0	0
	86	20	10 (50,0)	9 (45,0)	0	0	0
	87	6	0	5 (83,3)	0	0	0
	107	12	0	6 (50,0)	0	0	0
	108	14	0	14 (100,0)	0	0	0
	109	6	0	5 (83,3)	0	0	0
	111	55	15 (27,3)	9 (16,4)	0	0	0
	112	4	0	4 (100,0)	0	0	0
	115	180	0	83 (46,1)	2 (1,1)	2 (1,1)	0
	Gesamt	10	320	25	153	2	2
Gesamtes Studien- gebiet	114	2322	417	1232	40	69	5

LK: Landkreis; ID: Identifikation der Betriebe; WNV: West-Nil Virus; FSMEV: Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus; USJV: Usutu-Virus;
ABI: Anhalt-Bitterfeld; WB: Wittenberg; JL: Jerichower Land; SK: Salzlandkreis; SL: Saalekreis;
D: Dessau-Rosslau; EE: Elbe-Elster; OSL: Oberspreewald-Lausitz; DS: Dahme-Spreewald; PM: Potsdam-Mittelmark;
NS Nordsachsen; CS Mittelsachsen,
LD: Leipzig-Land, MS Meißen; D: Dresden

Tabelle 3: Deskriptive Statistik WNV

Variable	Kategorie	beprobte (n=1211)		WNV positive Pferde (n= 40)		WNV negative Pferde (n=1171)	
		Anzahl (n)	Prozent (%)	Anzahl (n)	Prozent (%)	Anzahl (n)	Prozent (%)
Pferde-Ebene							
Fellfarbe	Dunkel	635	52,4	25	62,5	610	52,1
	Fuchs	203	16,8	6	15,0	197	16,8
	Hell	138	11,4	0	0,0	138	11,8
	Sehr hell/ weiß	117	9,7	6	15,0	111	9,5
	mehrfarbig	118	9,7	3	7,5	115	9,8
Geschlecht	Weiblich	673	55,6	18	45,0	655	55,9
	Männlich	538	44,4	22	55,0	516	44,1
Rassetyp	Warmblut	607	50,1	19	47,5	588	50,2
	Kaltblut	69	5,7	6	15,0	63	5,4
	Vollblut	80	6,6	0	0,0	80	6,8
	Pony	448	37,0	15	37,5	433	37,0
	Esel/ Muli	7	0,6	0	0,0	7	0,6
Alter (in Jahren)	1	10	0,8	0	0,0	10	0,9
	2	57	4,7	1	2,5	56	4,8
	3	72	5,9	0	0,0	72	6,1
	4	64	5,3	2	5,0	62	5,3
	5	54	4,5	3	7,5	51	4,4
	6	63	5,2	2	5,0	61	5,2
	7	60	5,0	4	10,0	56	4,8
	8	63	5,2	3	7,5	60	5,1
	9	36	3,0	1	2,5	35	3,0
	10	51	4,2	3	7,5	48	4,1
	11	57	4,7	3	7,5	54	4,6
	12	52	4,3	2	5,0	50	4,3
	13	44	3,6	2	5,0	42	3,6
	14	46	3,8	2	5,0	44	3,8
	15	39	3,2	1	2,5	38	3,2
	16	49	4,0	1	2,5	48	4,1
	17	39	3,2	1	2,5	38	3,2
	18	43	3,6	3	7,5	40	3,4
	19	35	2,9	1	2,5	34	2,9
	20	47	3,9	1	2,5	46	3,9
	21	29	2,4	1	2,5	28	2,4
	22	32	2,6	0	0,0	32	2,7
	23	23	1,9	0	0,0	23	2,0
	24	29	2,4	0	0,0	29	2,5
	25	18	1,5	0	0,0	18	1,5
	26	15	1,2	1	2,5	14	1,2
	27	17	1,4	0	0,0	17	1,5
	28	20	1,7	0	0,0	20	1,7
	29	17	1,4	1	2,5	16	1,4
	30	9	0,7	0	0,0	9	0,8
	31	11	0,9	0	0,0	11	0,9
	32	8	0,7	0	0,0	8	0,7
	33	2	0,2	0	0,0	2	0,2
Geburtsland	Deutschland	1029	85,0	33	82,5	996	85,1
	WNV-Endemie-Gebiete ^a	94	7,8	5	12,5	89	7,6
	WNV-freies-Gebiet ^b	88	7,3	2	5,0	86	7,3
Nutzung	Freizeit	436	36,0	11	27,5	425	36,3
	Sport	468	38,6	23	57,5	445	38,0
	Zucht	212	17,5	4	10,0	208	17,8
	Beistellpferd	95	7,8	2	5,0	93	7,9

Nutzungsort	Ausschließlich Halle/ Platz	23	1,9	0	0,0	23	2,0
	Vorwiegend Halle/ Platz	430	35,5	21	52,5	409	34,9
	Vorwiegend im Gelände	472	39,0	13	32,5	459	39,2
	Ausschließlich im Gelände	103	8,5	1	2,5	102	8,7
	Kein Training	183	15,1	5	12,5	178	15,2
Transport ^c	Nein	798	65,9	25	62,5	773	66,0
	Ja	413	34,1	15	37,5	398	34,0
Auslandsaufenthalt ^d	Nein	1143	94,4	39	97,5	1104	94,3
	Ja	68	5,6	1	2,5	67	5,7
Grippeähnliche Symptome ^d	Nein	1165	96,2	37	92,5	1128	96,3
	Ja	46	3,8	3	7,5	43	3,7
Neurologische Symptome ^d	Nein	1188	98,1	40	100,0	1148	98,0
	Ja	23	1,9	0	0,0	23	2,0
Betriebs-Ebene							
LK	Anhalt-Bitterfeld	58	4,8	0	0,0	58	4,9
	Wittenberg	38	3,1	1	2,5	37	3,2
	Saalekreis	132	10,9	11	27,5	121	10,3
	Salzlandkreis	49	4,0	2	5,0	47	4,0
	Jerichower Land	84	6,9	1	2,5	83	7,1
	Dessau-Rosslau	18	1,5	0	0,0	18	1,5
	Nordsachsen	86	7,1	2	5,0	84	7,2
	Mittelsachsen	131	10,8	1	2,5	130	11,1
	Leipzig Land	26	2,1	1	2,5	25	2,1
	Meißen	46	3,8	2	5,0	44	3,8
	Dresden	49	4,0	2	5,0	47	4,0
	Elbe-Elster	159	13,1	8	20,0	151	12,9
	Oberspreewald-Leipzig	34	2,8	3	7,5	31	2,6
	Potsdam-Mittelmark	151	12,5	2	5,0	149	12,7
Dahme-Spreewald	150	12,4	4	10,0	146	12,5	
LK-kategorisiert	Kontroll-LK	219	18,1	2	5,0	217	18,5
	Fall-LK	1002	82,7	38	95,0	964	82,3
Anzahl Pferde im Betrieb	1	2	0,2	0	0,0	2	0,2
	2	7	0,6	1	2,5	6	0,5
	3	3	0,2	0	0,0	3	0,3
	4	16	1,3	0	0,0	16	1,4
	5	51	4,2	1	2,5	50	4,3
	6	56	4,6	1	2,5	55	4,7
	7	52	4,3	1	2,5	51	4,4
	8	39	3,2	1	2,5	38	3,2
	9	2	0,2	0	0,0	2	0,2
	10	26	2,1	2	5,0	24	2,0
	11	42	3,5	0	0,0	42	3,6
	12	17	1,4	0	0,0	17	1,5
	13	22	1,8	0	0,0	22	1,9
	14	32	2,6	1	2,5	31	2,6
	15	6	0,5	0	0,0	6	0,5
	17	48	4,0	1	2,5	47	4,0
	18	34	2,8	3	7,5	31	2,6
	19	39	3,2	0	0,0	39	3,3
	20	49	4,0	2	5,0	47	4,0
	21	34	2,8	0	0,0	34	2,9
22	20	1,7	0	0,0	20	1,7	
23	17	1,4	0	0,0	17	1,5	

Anzahl Pferde im Betrieb	24	36	3,0	2	5,0	34	2,9
	25	31	2,6	1	2,5	30	2,6
	27	23	1,9	0	0,0	23	2,0
	30	67	5,5	7	17,5	60	5,1
	32	13	1,1	0	0,0	13	1,1
	34	18	1,5	1	2,5	17	1,5
	37	26	2,1	1	2,5	25	2,1
	40	11	0,9	0	0,0	11	0,9
	45	20	1,7	0	0,0	20	1,7
	47	15	1,2	0	0,0	15	1,3
	49	18	1,5	2	5,0	16	1,4
	50	45	3,7	0	0,0	45	3,8
	55	40	3,3	0	0,0	40	3,4
	60	32	2,6	3	7,5	29	2,5
	75	23	1,9	2	5,0	21	1,8
	80	51	4,2	3	7,5	48	4,1
95	47	3,9	2	5,0	45	3,8	
180	81	6,7	2	5,0	79	6,7	
Haltungsform	Stall ohne Auslauf	8	0,7	0	0,0	8	0,7
	Stall mit Auslauf <12h/ Tag	246	20,3	4	10,0	242	20,6
	Stall mit Auslauf >12h/ Tag	140	11,6	2	5,0	138	11,8
	Dauerhafter Auslauf	817	67,5	34	85,0	783	66,8
Beschaffenheit Auslauf	Paddock	158	13,0	3	7,5	155	13,2
	Koppel	571	47,2	20	50,0	551	47,0
	Kombination	482	39,8	17	42,5	465	39,7
Existenz Unterstand	Nein	535	44,2	12	30,0	523	44,6
	Ja	676	55,8	28	70,0	648	55,3
Existenz stehender Gewässer ^e	Nein	204	16,8	6	15,0	198	16,9
	Ja	1007	83,2	34	85,0	973	83,0
Mückenbekämpfung s-Massnahmen							0,0
Stechmücken-aufkommen	Keine	7	0,6	0	0,0	7	0,6
	Wenig	412	34,0	6	15,0	405	34,6
	Viele	700	57,8	28	70,0	672	57,3
	Massenhaft	92	7,6	6	15,0	88	7,5
Nutzung Insektenschutzspray	Nein	424	35,0	17	42,5	407	34,7
	Ja	787	65,0	23	57,5	764	65,2
Wirkstoff	Kein Produkt verwendet	424	35,0	17	42,5	407	34,7
	Synthetische Repellentien	341	43,3	9	22,5	332	28,3
	Natürliche Repellentien	222	28,2	9	22,5	213	18,2
	Kombinationsprodukte (Insektizid&Repellent)	41	5,2	0	0,0	41	3,5
	Diverse Produkte	183	23,3	5	12,5	178	15,2
Art des Insektenschutzproduktes	Kein Produkt verwendet	424	35,0	17	42,5	407	34,7
	Selbst hergestellt	30	3,8	1	2,5	29	2,5
	Kommerziell	737	93,6	22	55,0	715	61,0
	Beides	24	3,0	0	0,0	24	2,0

Nutzung Fliegendecke	Nein	1048	86,5	35	87,5	1013	86,4
	Ja	163	13,5	5	12,5	158	13,5
Art der Fliegendecke	Keine Decke	1048	86,5	35	87,5	1013	86,4
	Klassisch	116	71,2	4	10,0	112	9,6
	Decke mit Muster (z.B. Zebromuster)	22	13,5	0	0,0	22	1,9
	Ekzemerdecke	25	15,3	1	2,5	24	2,0
Tränkesystem im Stall	Automatische Tränken	332	27,4	12	30,0	320	27,3
	Eimer oder Tröge	272	22,5	9	22,5	263	22,4
	Beides	607	50,1	19	47,5	588	50,2
Baulicher Mückenschutz	Nein	471	38,9	20	50,0	451	38,5
	Ja	740	61,1	20	50,0	720	61,4

^a WNV-endemische Länder bis 2020 (Polen; Tschechische Republik; Ungarn; Österreich; Italien; Spanien; Frankreich; USA; Niederlande; Brasilien; Slowakei;)

^b WNV-freie Länder bis 2020 (Vereinigtes Königreich; Schweiz; Island; Belgien; Irland; Schweden; Norwegen)

^c mehr als 20 Kilometer vom Betrieb

^d In den vergangenen 2 Jahren

^e Innerhalb eines Kilometers um den Betrieb

Tabelle 4: Deskriptive Statistik FSMEV

Variable	Kategorie	beprobt (n=1211)		FSMEV positive		FSMEV negative	
		Anzahl (n)	Prozent (%)	Anzahl (n)	Prozent (%)	Anzahl (n)	Prozent (%)
Pferde-Ebene Fellfarbe	Dunkel	635	52,4	36	52,2	599	52,5
	Fuchs	203	16,8	13	18,8	190	16,6
	Hell	138	11,4	5	7,2	133	11,6
	Sehr hell/ weiß	117	9,7	8	11,6	109	9,5
	mehrfarbig	118	9,7	7	10,1	111	9,7
Geschlecht	Weiblich	673	55,6	42	60,9	631	55,3
	Männlich	538	44,4	27	39,1	511	44,7
Rassetyp	Warmblut	607	50,1	30	43,5	577	50,5
	Kaltblut	69	5,7	6	8,7	63	5,5
	Vollblut	80	6,6	3	4,3	77	6,7
	Pony	448	37,0	29	42,0	419	36,7
	Esel/Muli	7	0,6	1	1,4	6	0,5
Alter (in Jahren)		10	0,8	0	0,0	10	0,9
	2	57	4,7	2	2,9	55	4,8
	3	72	5,9	4	5,8	68	6,0
	4	64	5,3	1	1,4	63	5,5
	5	54	4,5	1	1,4	53	4,6
	6	63	5,2	5	7,2	58	5,1
	7	60	5,0	1	1,4	59	5,2
	8	63	5,2	2	2,9	61	5,3
	9	36	3,0	1	1,4	35	3,1
	10	51	4,2	5	7,2	46	4,0
	11	57	4,7	6	8,7	51	4,5
	12	52	4,3	3	4,3	49	4,3
	13	44	3,6	1	1,4	43	3,8
	14	46	3,8	1	1,4	45	3,9
	15	39	3,2	3	4,3	36	3,2
	16	49	4,0	4	5,8	45	3,9
	17	39	3,2	3	4,3	36	3,2
	18	43	3,6	0	0,0	43	3,8
	19	35	2,9	1	1,4	34	3,0
	20	47	3,9	2	2,9	45	3,9
	21	29	2,4	3	4,3	26	2,3
	22	32	2,6	4	5,8	28	2,5
	23	23	1,9	2	2,9	21	1,8
	24	29	2,4	3	4,3	26	2,3
	25	18	1,5	4	5,8	14	1,2
	26	15	1,2	0	0,0	15	1,3
	27	17	1,4	2	2,9	15	1,3
	28	20	1,7	1	1,4	19	1,7
	29	17	1,4	1	1,4	16	1,4
	30	9	0,7	1	1,4	8	0,7
	31	11	0,9	1	1,4	10	0,9
	32	8	0,7	1	1,4	7	0,6
	33	2	0,2	0	0,0	2	0,2
Nutzung	Freizeit	436	36,0	38	55,1	398	34,9
	Sport	468	38,6	19	27,5	449	39,3
	Zucht	212	17,5	7	10,1	205	18,0
	Beistellpferd	95	7,8	5	7,2	90	7,9

Nutzungsort	Ausschließlich Halle/ Platz	23	1,9	0	0,0	23	2,0
	Vorwiegend Halle/ Platz	430	35,5	25	36,2	405	35,5
	Vorwiegend im Gelände	472	39,0	30	43,5	442	38,7
	Ausschließlich im Gelände	103	8,5	11	15,9	92	8,1
	Kein Training	183	15,1	5	7,2	178	15,6
Transport ^c	Nein	798	65,9	51	73,9	747	65,4
	Ja	413	34,1	18	26,1	395	34,6
Auslandsaufenthalt ^d	Nein	1143	94,4	66	95,7	1077	94,3
	Ja	68	5,6	3	4,3	65	5,7
Grippeähnliche Symptome ^d	Nein	1165	96,2	68	98,6	1097	96,1
	Ja	46	3,8	1	1,4	45	3,9
Neurologische Symptome ^d	Nein	1188	98,1	66	95,7	1122	98,2
	Ja	23	1,9	3	4,3	20	1,8
Betriebs-Ebene							
LK	Anhalt-Bitterfeld	58	4,8	1	1,4	57	5,0
	Wittenberg	38	3,1	2	2,9	36	3,2
	Saalekreis	132	10,9	3	4,3	129	11,3
	Salzlandkreis	49	4,0	0	0,0	49	4,3
	Jerichower Land	84	6,9	4	5,8	80	7,0
	Dessau-Rosslau	18	1,5	3	4,3	15	1,3
	Nordsachsen	86	7,1	5	7,2	81	7,1
	Mittelsachsen	131	10,8	8	11,6	123	10,8
	Leipzig Land	26	2,1	0	0,0	26	2,3
	Meißen	46	3,8	5	7,2	41	3,6
	Dresden	49	4,0	1	1,4	48	4,2
	Elbe-Elster	159	13,1	12	17,4	147	12,9
	Oberspreewald-Leipzig	34	2,8	1	1,4	33	2,9
	Potsdam-Mittelmark	151	12,5	2	2,9	149	13,0
	Dahme-Spreewald	150	12,4	22	31,9	128	11,2
LK-kategorisiert	Offizielles FSMEV-Risikogebiet 2021	278	23,0	18	26,1	260	22,8
	Kein offizielles FSMEV-Risikogebiet 2021	933	77,0	51	73,9	882	77,2
Anzahl Pferde im Betrieb	1	2	0,2	0	0,0	2	0,2
	2	7	0,6	0	0,0	7	0,6
	3	3	0,2	0	0,0	3	0,3
	4	16	1,3	0	0,0	16	1,4
	5	51	4,2	4	5,8	47	4,1
	6	56	4,6	3	4,3	53	4,6
	7	52	4,3	2	2,9	50	4,4
	8	39	3,2	2	2,9	37	3,2
	9	2	0,2	0	0,0	2	0,2
	10	26	2,1	0	0,0	26	2,3
	11	42	3,5	2	2,9	40	3,5
	12	17	1,4	0	0,0	17	1,5
	13	22	1,8	9	13,0	13	1,1
	14	32	2,6	1	1,4	31	2,7
	15	6	0,5	0	0,0	6	0,5
	17	48	4,0	1	1,4	47	4,1
	18	34	2,8	2	2,9	32	2,8
	19	39	3,2	3	4,3	36	3,2
	20	49	4,0	1	1,4	48	4,2

Anzahl Pferde im Betrieb	21	34	2,8	4	5,8	30	2,6
	22	20	1,7	1	1,4	19	1,7
	23	17	1,4	7	10,1	10	0,9
	24	36	3,0	0	0,0	36	3,2
	25	31	2,6	2	2,9	29	2,5
	27	23	1,9	0	0,0	23	2,0
	30	67	5,5	10	14,5	57	5,0
	32	13	1,1	0	0,0	13	1,1
	34	18	1,5	2	2,9	16	1,4
	37	26	2,1	1	1,4	25	2,2
	40	11	0,9	0	0,0	11	1,0
	45	20	1,7	0	0,0	20	1,8
	47	15	1,2	4	5,8	11	1,0
	49	18	1,5	0	0,0	18	1,6
	50	45	3,7	4	5,8	41	3,6
	55	40	3,3	1	1,4	39	3,4
	60	32	2,6	1	1,4	31	2,7
	75	23	1,9	0	0,0	23	2,0
	80	51	4,2	0	0,0	51	4,5
	95	47	3,9	0	0,0	47	4,1
180	81	6,7	2	2,9	79	6,9	
Haltungsform	Stall ohne Auslauf	8	0,7	0	0,0	8	0,7
	Stall mit Auslauf <12h/ Tag	246	20,3	13	18,8	233	20,4
	Stall mit Auslauf >12h/ Tag	140	11,6	5	7,2	135	11,8
	Dauerhafter Auslauf	817	67,5	51	73,9	766	67,1
Beschaffenheit Auslauf	Paddock	158	13,0	6	8,7	152	13,3
	Koppel	571	47,2	38	55,1	533	46,7
	Kombination	482	39,8	25	36,2	457	40,0
Existenz Unterstand	Nein	535	44,2	25	36,2	510	44,7
	Ja	676	55,8	44	63,8	632	55,3
Existenz stehender	Nein	204	16,8	6	8,7	198	17,3
	Ja	1007	83,2	63	91,3	944	82,7
Mückenbekämpfungsmassnahmen							
Stechmücken- aufkommen	Keine	7	0,6	0	0,0	7	0,6
	Wenig	412	34,0	23	57,5	389	33,2
	Viele	700	57,8	38	95,0	662	56,5
	Massenhaft	92	7,6	8	20,0	84	7,2
Nutzung Insektenschutzsp	Nein	424	35,0	22	31,9	402	35,2
	Ja	787	65,0	47	68,1	740	64,8
Wirkstoff	Kein Produkt verwendet	424	35,0	22	31,9	402	35,2
	Synthetische Repellentien	341	28,2	31	44,9	310	27,1
	Natürliche Repellentien	222	18,3	5	7,2	217	19,0
	Kombinationsprodukte (Insektizid&Repellent)	41	3,4	1	1,4	40	3,5
	Diverse Produkte	183	15,1	10	14,5	173	15,1

Art des Insektenschutzproduktes	Kein Produkt verwendet	424	35,0	22	31,9	402	35,2
	Selbst hergestellt	30	2,5	0	0,0	30	2,6
	Kommerziell	737	60,9	46	66,7	691	60,5
	Beides	24	2,0	1	1,4	23	2,0
Nutzung Fliegendecke	Nein	1048	86,5	58	84,1	990	86,7
	Ja	163	13,5	11	15,9	152	13,3
Art der Fliegendecke	Keine Decke	1048	86,5	58	84,1	990	86,7
	Klassisch	116	9,6	7	10,1	109	9,5
	Decke mit Muster (z.B. Zebromuster	22	1,8	4	5,8	18	1,6
	Ekzemerdecke	25	2,1	0	0,0	25	2,2
Baulicher Mückenschutz	Nein	471	38,9	24	34,8	447	39,1
	Ja	740	61,1	45	65,2	695	60,9

^a WNV-endemische Länder bis 2020 (Polen; Tschechische Republik; Ungarn; Österreich; Italien; Spanien; Frankreich; USA; Niederlande; Brasilien; Slowakei;)

^b WNV-freie Länder bis 2020 (Vereinigtes Königreich; Schweiz; Island; Belgien; Irland; Schweden; Norwegen)

^c mehr als 20 Kilometer vom Betrieb

^d In den vergangenen 2 Jahren

^e Innerhalb eines Kilometers um den Betrieb

Tabelle 5: Deskriptive Statistik WNV, Vergleich mit Ganzenberg 2022

Variable	Kategorie	beprobte in 2022 (n=1211)		beprobte in 2020 (n=937)	
		Anzahl (n)	Prozent (%)	Anzahl (n)	Prozent (%)
Pferde-Ebene					
Fellfarbe	Dunkel	635	52,4	529	56,5
	Fuchs	203	16,8	161	17,2
	Hell	138	11,4	72	7,7
	Sehr hell/ weiß	117	9,7	110	11,7
	mehrfarbig	118	9,7	65	6,9
Geschlecht	Weiblich	673	55,6	536	57,2
	Männlich	538	44,4	401	42,8
Rassetyp	Warmblut	607	50,1	554	59,1
	Kaltblut	69	5,7	38	4,1
	Vollblut	80	6,6	49	5,2
	Pony	448	37,0	287	30,6
	Esel/Muli	7	0,6	9	1,0
Alter (in Jahren)	1	10	0,8	43	4,6
	2	57	4,7	48	5,1
	3	72	5,9	34	3,6
	4	64	5,3	40	4,3
	5	54	4,5	52	5,5
	6	63	5,2	39	4,2
	7	60	5,0	28	3,0
	8	63	5,2	31	3,3
	9	36	3,0	40	4,3
	10	51	4,2	47	5,0
	11	57	4,7	39	4,2
	12	52	4,3	41	4,4
	13	44	3,6	39	4,2
	14	46	3,8	39	4,2
	15	39	3,2	26	2,8
	16	49	4,0	42	4,5
	17	39	3,2	41	4,4
	18	43	3,6	37	3,9
	19	35	2,9	35	3,7
	20	47	3,9	23	2,5
	21	29	2,4	24	2,6
	22	32	2,6	26	2,8
	23	23	1,9	21	2,2
	24	29	2,4	22	2,3
	25	18	1,5	20	2,1
	26	15	1,2	8	0,9
	27	17	1,4	15	1,6
	28	20	1,7	7	0,7
	29	17	1,4	10	1,1
	30	9	0,7	10	1,1
	31	11	0,9	6	0,6
	32	8	0,7	2	0,2
	33	2	0,2	2	0,2

Geburtsland	Deutschland	1029	85,0	862	92,0
	WNV-Endemie-Gebiete ^a	94	7,8	35	3,7
	WNV-freies-Gebiet ^b	88	7,3	36	3,8
	Unbekannt	0	0,0	4	0,4
Nutzung	Freizeit	436	36,0	390	41,6
	Sport	468	38,6	284	30,3
	Zucht	212	17,5	182	19,4
	Beistellpferd	95	7,8	81	8,6
Nutzungsort	Ausschließlich Halle/Platz	23	1,9	35	3,7
	Vorwiegend Halle/Platz	430	35,5	287	30,6
	Vorwiegend im Gelände	472	39,0	280	29,9
	Ausschließlich im Gelände	103	8,5	166	17,7
	Kein Training	183	15,1	169	18,0
Transport ^c	Nein	798	65,9	727	77,6
	Ja	413	34,1	210	22,4
Auslandsaufenthalt ^d	Nein	1143	94,4	920	98,2
	Ja	68	5,6	17	1,8
Grippeähnliche Symptome ^d	Nein	1165	96,2	-	-
	Ja	46	3,8	-	-
Neurologische Symptome ^d	Nein	1188	98,1	914	97,5
	Ja	23	1,9	23	2,5
Betriebs-Ebene					
LK	Anhalt-Bitterfeld	58	4,8	107	11,4
	Wittenberg	38	3,1	128	13,7
	Saalekreis	132	10,9	-	-
	Salzlandkreis	49	4,0	-	-
	Jerichower Land	84	6,9	-	-
	Dessau-Rosslau	18	1,5	-	-
	Nordsachsen	86	7,1	136	14,5
	Mittelsachsen	131	10,8	164	17,5
	Leipzig Land	26	2,1	113	12,1
	Meißen	46	3,8	66	7,0
	Dresden	49	4,0	69	7,4
	Elbe-Elster	159	13,1	136	14,5
	Oberspreewald-Leipzig	34	2,8	-	-
	Potsdam-Mittelmark	151	12,5	-	-
	Dahme-Spreewald	150	12,4	-	-
LK-kategorisiert	Kontroll-LK	219	18,1	299	31,9
	Fall-LK	1002	82,7	638	68,1

Anzahl Pferde im Betrieb	1	2	0,2	0	-
	2	7	0,6	4	0,4
	3	3	0,2	6	0,6
	4	16	1,3	27	2,9
	5	51	4,2	48	5,1
	6	56	4,6	96	10,2
	7	52	4,3	54	5,8
	8	39	3,2	59	6,3
	9	2	0,2	28	3,0
	10	26	2,1	38	4,1
	11	42	3,5	65	6,9
	12	17	1,4	35	3,7
	13	22	1,8	34	3,6
	14	32	2,6	24	2,6
	15	6	0,5	20	2,1
	16	0	-	20	2,1
	17	48	4,0	11	1,2
	18	34	2,8	22	2,3
	19	39	3,2	1	0,1
	20	49	4,0	30	3,2
	21	34	2,8	4	0,4
	22	20	1,7	32	3,4
	23	17	1,4	0	-
	24	36	3,0	0	-
	25	31	2,6	23	2,5
	27	23	1,9	0	-
	28	0	-	11	1,2
	30	67	5,5	32	3,4
	32	13	1,1	0	-
	33	0	-	36	3,8
	34	18	1,5	32	3,4
	37	26	2,1	0	-
	40	11	0,9	44	4,7
	45	20	1,7	6	0,6
	47	15	1,2	0	-
	48	0	-	20	2,1
49	18	1,5	0	-	
50	45	3,7	6	0,6	
55	40	3,3	0	-	
60	32	2,6	0	-	
65	0	-	4	0,4	
75	23	1,9	0	-	
80	51	4,2	63	6,7	
95	47	3,9	0	-	
160	0	-	2	0,2	
180	81	6,7	0	-	
Haltungsform	Stall ohne Auslauf	8	0,7	0	0,0
	Stall mit Auslauf <12h/Tag	246	20,3	206	22,0
	Stall mit Auslauf >12h/Tag	140	11,6	107	11,4
	Dauerhafter Auslauf	817	67,5	624	66,6

Beschaffenheit Auslauf	Paddock	158	13,0	97	10,4
	Koppel	571	47,2	594	63,4
	Kombination	482	39,8	246	26,3
Existenz Unterstand	Nein	535	44,2	501	53,5
	Ja	676	55,8	436	46,5
Existenz stehender Gewässer ^e	Nein	204	16,8	257	27,4
	Ja	1007	83,2	680	72,6
Mückenbekämpfungs- Massnahmen				97	10,4
Nutzung Insektenschutzspray	Nein	424	35,0	404	43,1
	Ja	787	65,0	533	56,9
Wirkstoff	Kein Produkt verwendet	424	35,0	404	43,1
	Insektizide	0	-	26	2,8
	Synthetische Repellentien	341	28,2	121	12,9
	Natürliche Repellentien	222	18,3	137	14,6
	Kombinationsprodukte (Insektizid&Repellent)	41	3,4	240	25,6
	Diverse Produkte	183	15,1	9	1,0
Nutzung Fliegendecke	Nein	1048	86,5	838	89,4
	Ja	163	13,5	99	10,6
Art der Fliegendecke	Keine Decke	1048	86,5	838	89,4
	Klassisch	116	9,6	50	5,3
	Decke mit Muster (z.B. Zebromuster	22	1,8	31	3,3
	Ekzemerdecke	25	2,1	18	1,9
Baulicher Mückenschutz	Nein	471	38,9	687	73,3
	Ja	740	61,1	250	26,7

^a WNV-endemische Länder bis 2020 (Polen; Tschechische Republik; Ungarn; Österreich; Italien; Spanien; Frankreich; USA; Niederlande; Brasilien; Slowakei)

^b WNV-freie Länder bis 2020 (Vereinigtes Königreich; Schweiz; Island; Belgien; Irland; Schweden; Norwegen)

^c mehr als 20 Kilometer vom Betrieb

^d In den vergangenen 2 Jahren

^e Innerhalb eines Kilometers um den Betrieb

Tabelle 6: Serologische Ergebnisse WNV, FSMEV und USUV

ID	kompetetiver ELISA WNV-IgG (%)	VNT WNV ND ₅₀ Titer	VNT TBEV ND ₅₀ Titer	VNT USUV ND ₅₀ Titer	Endergebnis (mittels VNT)
Evaluation	pos: S/N ≤ 40 fraglich: 40 < S/N ≤ 50 neg: S/N ≥ 50	positive VNT titer: fettgedruckt (*): kreuzragierende Antikörper neg: < 10			
19	17	960	< 10	< 10	WNV positiv
20	28	120	< 10	20 *	WNV positiv
24	7	1280	< 10	60 *	WNV positiv
28	26	80	< 10	< 10	WNV positiv
30	31	80	< 10	< 10	WNV positiv
31	9	640	< 10	< 10	WNV positiv
32	31	100	< 10	< 10	WNV positiv
75	5	80	< 10	< 10	WNV positiv
85	6	40	< 10	< 10	WNV positiv
98	5	640	< 10	15*	WNV positiv
135	7	80	< 10	< 10	WNV positiv
165	6	80	< 10	< 10	WNV positiv
268	4	960	< 10	20*	WNV positiv
314	5	640	< 10	< 10	WNV positiv
349	8	100	< 10	< 10	WNV positiv
361	18	100	< 10	< 10	WNV positiv
365	6	160	< 10	< 10	WNV positiv
510	8	160	< 10	< 10	WNV positiv
545	10	160	< 10	< 10	WNV positiv
576	6	320	< 10	< 10	WNV positiv
580	4	1280	< 10	20*	WNV positiv
590	6	80	< 10	< 10	WNV positiv
594	4	480	< 10	30*	WNV positiv
620	5	480	< 10	< 10	WNV positiv
739	11	30	< 10	< 10	WNV positiv
755	5	240	< 10	< 10	WNV positiv
781	9	60	< 10	< 10	WNV positiv
782	9	640	< 10	< 10	WNV positiv

783	7	160	< 10	< 10	WNV positiv
806	9	40	< 10	< 10	WNV positiv
877	4	480	< 10	20*	WNV positiv
943	6	40	< 10	20*	WNV positiv
986	11	80	< 10	< 10	WNV positiv
1047	8	160	< 10	< 10	WNV positiv
1051	14	20	< 10	< 10	WNV positiv
1098	5	480	< 10	15*	WNV positiv
1173	6	120	< 10	< 10	WNV positiv
1182	18	20	< 10	< 10	WNV positiv
1198	5	120	< 10	10*	WNV positiv
1249	6	80	< 10	< 10	WNV positiv
235	5	15*	< 10	80	USUV positiv
332	10	10*	< 10	80	USUV positiv
395	34	< 10	< 10	15	USUV positiv
828	12	< 10	< 10	15	USUV positiv
831	11	< 10	< 10	20	USUV positiv
44	19	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
45	22	< 10	480	< 10	FSMEV positiv
66	22	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
216	41	< 10	160	< 10	FSMEV positiv
217	31	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
218	24	< 10	60	< 10	FSMEV positiv
220	16	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
288	26	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
291	20	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
292	11	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
295	11	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
298	12	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
299	5	< 10	1920	< 10	FSMEV positiv
300	32	< 10	160	< 10	FSMEV positiv
301	11	< 10	480	< 10	FSMEV positiv
303	16	< 10	640	< 10	FSMEV positiv
305	13	< 10	100	< 10	FSMEV positiv
321	19	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
322	16	< 10	160	< 10	FSMEV positiv
389	22	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
398	28	< 10	480	< 10	FSMEV positiv

444	7	< 10	480	< 10	FSMEV positiv
456	12	< 10	80	< 10	FSMEV positiv
462	19	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
465	12	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
466	7	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
467	12	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
521	14	< 10	160	< 10	FSMEV positiv
527	26	< 10	40	< 10	FSMEV positiv
534	8	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
649	16	< 10	60	< 10	FSMEV positiv
653	8	< 10	160	< 10	FSMEV positiv
654	8	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
655	9	< 10	60	< 10	FSMEV positiv
656	11	< 10	60	< 10	FSMEV positiv
678	15	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
780	13	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
804	11	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
808	11	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
832	4	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
860	24	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
931	7	< 10	1920	< 10	FSMEV positiv
933	11	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
934	10	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
935	23	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
987	11	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
989	11	< 10	1280	< 10	FSMEV positiv
1013	14	< 10	640	< 10	FSMEV positiv
1014	44	< 10	480	< 10	FSMEV positiv
1016	25	< 10	160	< 10	FSMEV positiv
1018	10	< 10	480	< 10	FSMEV positiv
1019	8	< 10	960	< 10	FSMEV positiv
1020	7	< 10	1920	< 10	FSMEV positiv
1021	13	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
1022	9	< 10	1920	< 10	FSMEV positiv
1023	7	< 10	1280	< 10	FSMEV positiv
1097	9	< 10	480	< 10	FSMEV positiv

1128	7	< 10	1280	< 10	FSMEV positiv
1129	35	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
1132	30	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
1133	17	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
1134	8	< 10	320	< 10	FSMEV positiv
1139	13	< 10	480	< 10	FSMEV positiv
1141	11	< 10	240	< 10	FSMEV positiv
1143	12	< 10	120	< 10	FSMEV positiv
1144	16	< 10	60	< 10	FSMEV positiv
1181	45	< 10	30	< 10	FSMEV positiv
1229	41	< 10	40	< 10	FSMEV positiv
1242	33	< 10	40	< 10	FSMEV positiv
454	5	60	160	< 10	nicht differenzierbar
460	5	20	60	< 10	nicht differenzierbar
566	7	80	< 10	80	nicht differenzierbar
96	9	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
172	35	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
273	28	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
810	44	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
903	48	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
1102	18	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
1140	46	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar
1248	13	< 10	< 10	< 10	nicht ermittelbar

Tabelle 7: Ergebnisse Univariate Analyse WNV

Variable	Kategorie	χ^2	df	p	χ^2 (2020*)	df (2020*)	p (2020*)
Pferde-Ebene							
Fellfarbe	Dunkel	5,0349	4	0,284	8,5957	4	0,07
	Fuchs						
	Hell						
	Sehr hell/ weiß						
	mehrfarbig						
Geschlecht	Weiblich	1,8733	1	0,171	0,564	1	0,45
	Männlich						
Rassetyp	Warmblut	71,446	4	0,128	7,1446	4	0,13
	Kaltblut						
	Vollblut						
	Pony						
	Esel/ Muli						
Geburtsland	Deutschland	15,185	2	0,468	5,5949	2	0,06
	WNV-Endemie-Gebiete ^a						
	WNV-freies-Gebiet ^b						
Nutzung	Freizeit	63,939	3	0,094	9,7984	3	0,02
	Sport						
	Zucht						
	Beistellpferd						
Nutzungsort	Ausschließlich Halle/ Platz	6,535	4	0,163	4,6001	4	0,33
	Vorwiegend Halle/ Platz						
	Vorwiegend im Gelände						
	Ausschließlich im Gelände						
	Kein Training						
Transport ^c	Nein	0,2323	1	0,645	2,8417	1	0,09
	Ja						
Auslandsaufenthalt ^d	Nein	0,756	1	0,384	1,6354	1	0,2
	Ja						
Grippeähnliche Symptome ^d	Nein	1,551	1	0,213	0,0041	1	0,95
	Ja						
Neurologische Symptome ^d	Nein	0,104	1	0,747	0,0166	1	0,9
	Ja						

Betriebs-Ebene							
Haltungsform	Stall ohne Auslauf						
	Stall mit Auslauf <12h/ Tag	5,8008	2	0,055	12,7536	2	0,002
	Stall mit Auslauf >12h/ Tag						
	Dauerhafter Auslauf						
Beschaffenheit Auslauf	Paddock	1,1224	2	0,571	3,5929	2	0,17
	Koppel						
	Kombination						
Existenz Unterstand	Nein	3,372	1	0,066	8,9253	1	0,03
	Ja						
Existenz stehender Gewässer ^e	Nein	0,1006	1	0,7511	0,8371	1	0,36
	Ja						
Mückenbekämpfungsmassnahmen							
Nutzung Insektenschutzspra	Nein	1,0193	1	0,313	9,1273	1	0,003
	Ja						
Wirkstoff	Kein Produkt verwendet	3,112	4	0,540	7,5337	4	0,11
	Synthetische Repellentien						
	Natürliche Repellentien						
	Kombinationsprodukte (Insektizid & Repellent)						
	Diverse Produkte						
Art des Insektenschutzproduktes	Kein Produkt verwendet	0,8651	3	0,83	1,7221	3	0,63
	Selbst hergestellt						
	Kommerziell						
	Beides						

Nutzung Fliegendecke	Nein	0,0327	1	0,856	1,0523	1	0,31
	Ja						
Art der Fliegendecke	Keine Decke	0,802	3	0,850	0,5158	3	0,92
	Klassisch						
	Decke mit Muster (z.B. Zebramuster)						
	Ekzemerdecke						
Tränkesystem im Stall	Automatische Tränken	0,1576	2	0,924	3,2959	2	0,19
	Eimer oder Tröge						
	Beides						
Baulicher Mückenschutz	Nein	2,147	1	0,143	3,4893	1	0,06
	Ja						

χ^2 : Chi² Quadrat; df: Anzahl der Freiheitsgrade; p: Signifikanz

^a WNV-endemische Länder bis 2020 (Polen; Tschechische Republik; Ungarn; Österreich; Italien; Spanien; Frankreich)

^b WNV-freie Länder bis 2020 (Vereinigtes Königreich; Schweiz; Island; Belgien; Irland; Schweden; Norwegen)

^c In den vergangenen 2 Jahren

^d In den vergangenen 2 Jahren

^e Innerhalb eines Kilometers um den Betrieb

* p berechnet mit 17 bereits 2020 positiv getesteten Pferden

Tabelle 8: Ergebnisse logistische Regression WNV (2022)

Variable	Kategorie	B	SE	Wald	df	p	Exp (B)	95% KI
Alter		-0,027	0,027	1,016	1	0,313	0,973	0,9-1
Fellfarbe	Fuchs	Ref.						
	Dunkel	-0,505	0,638	0,625	1	0,429	0,604	0,2-2
	Hell	-0,020	0,506	0,002	1	0,969	0,980	0,4-2,6
	mehrfarbig	-18,233	3245,295	0,000	1	0,996	0,000	0,000
	Sehr hell/ weiß	-0,730	0,771	0,898	1	0,469	0,482	0,1-2,2
Geschlecht	Weiblich	Ref.						
	Männlich	-0,267	0,353	0,574	1	0,449	0,765	0,4-1,5
Rassetyp	Kaltblut	Ref.		7,063				
	Esel	0,919	0,609	2,278	1	0,131	2,507	0,8-8,3
	Maultier	-16,913	15085,639	0	1	1,000	0	0
	Pony	-17,165	40192,97	0	1	1	0	0
	Vollblut	0,012	0,449	0,001	1	0,98	1,012	0,4-2,5
	Warmblut	-17,34	4286,591	0,948	1	0,997	0	0
Geburtsland	Deutschland	Ref.						
	WNV-Endemie-Gebiete ^a	0,048	0,812	0,004	1	0,953	1,049	0,2-5,2
	WNV-freies-Gebiet ^b	1,106	0,905	1,492	1	0,222	0,956	0,5-17,8
Nutzung	Zucht	Ref.						
	Freizeit	-0,511	0,426	1,436	1	0,231	0,296	1,1-1,1
	Beistellpferd	-0,752	0,842	0,797	1	0,372	0,6	0,3-1,4
	Sport	1,216	0,7	3,011	1	0,083	0,471	0,1-2,5
Nutzungsort	Ausschließlich Halle/ Platz	Ref.						
	Ausschließlich im Gelände	19,766	40192,393	0	1	1	1,112	0
	Vorwiegend Halle/ Platz	18,682	40192,393	0	1	1	1,343	0
	Vorwiegend im Gelände	19,07	40192,393	0	1	1	0,732	0
	Kein Training	18,418	40192,393	0	1	1	1,49	0
Transport ^c	Nein	Ref.						
	Ja	0,358	0,395	0,821	1	0,436	1,43	0,7-3,1
Grippeähnliche Symptome ^d	Nein	Ref.						
	Ja	1,126	0,83	1,838	1	0,175	3,083	0,6-15,7
Neurologische Symptome ^d	Nein	Ref.						
	Ja	-17,171	7884,173	0	1	0,998	0	0
Auslandsaufenthalt ^d	Nein	Ref.						
	Ja	-1,117	1,126	0,984	1	0,321	0,327	0,1-3,0
Anzahl der Pferde im Betrieb		0,006	0,005	1,32	1	0,251	1,006	0,9-1,0

Haltungsform	Stall mit Auslauf <12h/Tag	Ref.						
	Stall mit Auslauf >12h/Tag	-1,076	0,785	1,881	1	0,17	0,341	0,1-1,6
	Dauerhafter Auslauf	-1,052	0,674	2,436	1	0,119	0,349	0,1-1,3
Beschaffenheit Auslauf	Kombination	Ref.						
	Paddock	-0,528	0,482	1,197	1	0,274	0,59	0,2-1,5
	Koppel	-0,826	0,714	1,338	1	0,274	0,438	0,1-1,8
Existenz Unterstand	Nein	Ref.						
	Ja	0,885	0,548	2,607	1	0,106	2,424	0,8-7,1
Existenz stehender Gewässer ^e	Nein	Ref.						
	Ja	-0,026	0,511	0,003	1	0,959	0,974	0,4-2,7
Nutzung Insektenschutzsp	Nein	Ref.						
	Ja	-0,761	0,446	2,916	1	0,088	0,467	0,2-1,1
Nutzung Fliegendecke	Nein	Ref.						
	Ja	0,105	0,541	0,038	1	0,846	1,111	0,4-3,2
Baulicher Mückenschutz	Nein	Ref.						
	Ja	-0,429	0,358	1,435	1	0,231	0,651	0,3-1,3
Konstante		-20,933	40192,393	0	1	1	0	

Exp(B): odds ratio (Potenzierung des B-Koeffizienten); SE.: Standardfehler; df: Anzahl der Freiheitsgrade; p: Signifikanz

KI: Konfidenzintervall; Ref.: Referenzvariable

^a WNV-endemische Länder bis 2020 (Polen; Tschechische Republik; Ungarn; Österreich; Italien; Spanien; Frankreich; USA; Niederlande)

^b WNV-freie Länder bis 2020 (Vereinigtes Königreich; Schweiz; Island; Belgien; Irland; Schweden; Norwegen)

^c In den vergangenen 2 Jahren

^d In den vergangenen 2 Jahren

^e Innerhalb eines Kilometers um den Betrieb

Tabelle 9: Ergebnisse logistische Regression WNV (2022 und 2020)

Variable	Kategorie	B	SE	Wald	df	p	Exp (B)	95%KI
Alter		0,012	0,023	0,265	1	0,607	1,012	1,0,1,1
Fellfarbe	Fuchs	Ref.						
	Dunkel	-0,175	0,591	0,088	1	0,767	0,839	0,3-2,7
	Hell	0,208	0,467	0,198	1	0,656	1,231	0,5-3,1
	mehrfarbig	-1,593	0,873	3,325	1	0,068	0,203	0,1-1,1
	Sehr hell/ weiß	-0,643	0,747	0,741	1	0,389	0,526	0,1-2,3
Geschlecht	Weiblich	Ref.						
	Männlich	-0,191	0,319	0,357	1	0,55	0,823	0,4-1,5
Rassetyp	Kaltblut	Ref.						
	Esel	1,337	0,594	5,071	1	0,24	3,807	1,2-12,1
	Maultier	2,019	1,336	2,282	1	0,131	7,53	0,5,103,4
	Pony	-17,595	40192,97	0	1	1	0	0,0
	Vollblut	-0,342	0,426	0,643	1	0,423	0,711	0,3-1,6
	Warmblut	-0,015	0,845	0	1	0,986	0,985	0,2-5,2
Geburtsland	Deutschland	Ref.						
	WNV- Endemie- Gebiete ^a	0,033	0,693	0,002	1	0,962	1,034	0,3-4,0
	WNV-freies- Gebiet ^b	0,794	0,796	0,996	1	0,318	2,212	0,5-10,5
Nutzung	Zucht	Ref.						
	Freizeit	-0,167	0,526	0,1	1	0,751	0,846	0,3-2,4
	Beistellpferd	-0,697	0,411	2,876	1	0,09	0,498	0,2-1,1
	Sport	-1,371	0,906	2,288	1	0,13	0,254	0,1-1,5
Nutzungsort	Ausschließlich Halle/ Platz	Ref.						
	Ausschließlich im Gelände	0,588	1,306	0,203	1	0,652	1,801	0,1-23,3
	Vorwiegend	-0,657	1,045	0,395	1	0,529	0,518	0,1,4,0
	Vorwiegend im Gelände	0,592	0,648	0,834	1	0,361	1,807	0,5-6,4
	Kein Training	0,266	0,697	0,146	1	0,702	1,305	0,3-5,1
Transport ^c	Nein	Ref.						
	Ja	0,635	0,368	2,976	1	0,085	1,887	0,9-3,9
Grippeähnliche Symptome ^d	Nein	Ref.						
	Ja	0,885	0,822	1,157	1	0,282	2,422	0,5-12,1
Neurologische Symptome ^d	Nein	Ref.						
	Ja	-17,649	7938,883	0	1	0,998	0	0
Auslandsaufenth alt ^d	Nein	Ref.						
	Ja	-1,639	1,126	2,119	1	0,146	0,702	0,1-1,8
Anzahl der Pferde im Betrieb		0,001	0,005	0,059	1	0,808	1,001	0,9-1,0

Haltungsform	Stall mit	Ref.						
	Stall mit Auslauf >12h/Tag	-1,649	0,799	4,256	1	0,39	0,192	0,1-0,9
	Dauerhafter Auslauf	-1,524	0,666	5,239	1	0,022	0,218	0,1-0,8
Beschaffenheit Auslauf	Kombination	Ref.						
	Paddock	-0,204	0,466	0,191	1	0,662	0,747	0,3-0,9
	Koppel	-0,583	0,621	0,88	1	0,348	0,558	0,2-1,9
Existenz Unterstand	Nein	Ref.						
	Ja	0,841	0,537	2,452	1	0,117	2,319	0,8-6,6
Existenz stehender	Nein	Ref.						
	Ja	-0,103	0,482	0,046	1	0,831	0,902	0,4-2,2
Nutzung Insektenschutzs	Nein	Ref.						
	Ja	-3,339	1,333	6,269	1	0,012	0,084	<0,1-0,5
Nutzung Fliegendecke	Nein	Ref.						
	Ja	-0,343	0,535	0,411	1	0,521	0,709	0,2-2,0
Baulicher Mückenschutz	Nein	Ref.						
	Ja	-0,313	0,336	0,866	1	0,352	0,731	0,4-1,4
Konstante		18,16	3701,875	0	1	0,996	0	

Exp(B): odds ratio (Potenzierung des B-Koeffizienten); SE,: Standardfehler; df: Anzahl der Freiheitsgrade; p: Significanz;
KI: Konfidenzintervall; Ref.: Referenzvariable

^a WNV-endemische Länder bis 2020 (Polen; Tschechische Rebulick; Ungarn; Österreich; Italien; Spanien; Frankreich; US.

^b WNV-freie Länder bis 2020 (Vereinigtes Königreich; Schweiz; Island; Belgien; Irland; Schweden; Norwegen)

^c In den vergangenen 2 Jahren

^d In den vergangenen 2 Jahren

^e Innerhalb eines Kilometers um den Betrieb

Tabelle 10: Ergebnisse logistische Regression FSMEV (2022)

Variable	Kategorie	B	SE	Wald	df	p	Exp (B)	95% KI
Alter		0,033	0,015	4,585	1	0,032	1.034	1,0-1,1
Anzahl der Pferde im Betrieb		-0,009	0,004	4,637	1	0,031	0,991	0,9-1,0
Haltungsform	Stall mit Auslauf <12h/ Tag	Ref.						
	Stall mit Auslauf >12h/ Tag	0,548	0,55	0,991	2	0,319	1.729	0,6-5,1
	Dauerhafter Auslauf	0,646	0,493	1,717	2	0,19	1.908	0,7-5,0
Existenz Unterstand	Nein	Ref.						
	Ja	0,249	0,313	0,634	1	0,426	1.283	0,7-2,4
Nutzung Insektenschutz	Nein	Ref.						
	Ja	0,048	0,288	2,0	1	0,867	1	0,5-1,7
Konstante		-3,704	0,578	41,073	1	<0,001	0,025	

Exp(B): odds ratio (Potenzierung des B-Koeffizienten); SE: Standardfehler; df: Anzahl der Freiheitsgrade; p: Signifikanz; KI: Konfidenzintervall; Ref.: Referenzvariable

Tabelle 11: Ergebnisse logistische Regression FSMEV (2022 und 2020)

Variable	Kategorie	B	SE	Wald	df	p	Exp (B)	95% KI
Alter		0,014	0,014	1,025	1	0,311	1.013	0,9-1,0
Anzahl der Pferde im Betrieb		-0,006	0,004	2,687	1	0,101	0,994	0,9-1,0
Haltungsform	Stall mit	Ref.						
	Stall mit Auslauf >12h/ Tag	-0,23	0,393	0,434	2	0,558	0,794	0,4-1,7
	Dauerhafter Auslauf	-0,15	0,33	0,002	2	0,965	0,985	0,5-1,9
Existenz Unterstand	Nein	Ref.						
	Ja	0,45	0,274	2,699	1	0,1	1.568	0,9-2,7
Nutzung Insektenschutz	Nein	Ref.						
	Ja	0,155	0,258	0,359	1	0,549	1.167	0,7-1,9
Konstante		-3,486	0,365	91,207	1	<0,001	0,031	

Exp(B): odds ratio (Potenzierung des B-Koeffizienten); SE: Standardfehler; df: Anzahl der Freiheitsgrade; p: Signifikanz; KI: Konfidenzintervall; Ref.: Referenzvariable

4 Diskussion und Schlussfolgerung

4.1 West-Nil-Virus

Insgesamt ist das Verhältnis der WNV-seropositiven Pferde mit 3,3 % (95 % CI: 2,38-4,40) auf der Pferdeebene und 21 % (95 % KI: 14,52-29,48) auf Betriebsebene vergleichbar mit den Ergebnisse von Ganzenberg et al. 2022 (GANZENBERG et al. 2022), wo eine Seroprävalenz von 5,8 % auf Pferde- und 21 % auf Betriebsebene ermittelt wurde. Bei der Kontaktierung der Pferdehalterinnen handelt es sich aus Praktikabilitätsgründen um eine Datenerhebung im Sinne einer willkürlichen Stichprobe. Dies bedeutet, dass nur Betriebe in die Studie aufgenommen wurden, die auf die initiale Kontaktierung geantwortet haben und einer Beprobung zustimmten. Somit handelt es sich nicht um eine zufällige Stichprobe und es kann über die tatsächliche Seroprävalenz im Studiengebiet nur eine eingeschränkte Aussage getroffen werden. Um dies zu berücksichtigen, wird im Weiteren nur von der Seropositivitätsrate und nicht von der Seroprävalenzrate gesprochen.

Da 17 bekannte WNV-positive Pferde von der Probennahme ausgeschlossen wurden, ist die in dieser Studie ermittelte Seropositivitätsrate möglicherweise zu niedrig angesetzt. Unter der Annahme, dass diese 17 Pferde während des Probenentnahmezeitraums weiterhin seropositiv waren, würde die korrigierte Seropositivitätsrate 4,6 % (95 % CI: 3,53-5,88) auf Pferdeebene und 25 % (95 % CI: 18,30-34,18) auf Betriebsebene betragen. In einer kürzlich durchgeführten Studie an hospitalisierten Pferden in Deutschland wurde eine WNV-Seroprävalenz von 8,2 % (im Jahr 2020) und 13,8 % (im Jahr 2021) festgestellt (BERGMANN et al. 2022). Die in der hier beschriebenen Studie ermittelte Seroprävalenz ist deutlich niedriger, was möglicherweise auf die unterschiedlichen Studiendesigns zurückzuführen ist, nämlich die ausschließliche Untersuchung von hospitalisierten Pferden in der früheren Studie (BERGMANN et al. 2022). Die vorliegenden Ergebnisse sind vergleichbar mit früheren Berichten aus Österreich (5,3 %) (DE HEUS et al. 2021), Kroatien (3,4 %) (BARBIC et al. 2012), Griechenland (4,0 %) (MANGANA-VOUGIOUKA et al. 2013) und Nordspanien (5,0 %) (NAPP et al. 2021). Höhere Seroprävalenzen zwischen 7,1 % und 22,2 % wurden aus dem Kosovo, der Ukraine, Polen, Korsika, Serbien und Albanien berichtet (JIMENEZ-CLAVERO et al. 2010, LUPULOVIC et al. 2011, GARCIA-BOCANEGRA et al. 2012, BERXHOLI et al. 2013, ZIEGLER et al. 2013, MAQUART et al. 2017, BAZANOW et al. 2018, GUERRERO-CARVAJAL et al. 2021, REXHEPI et al. 2021). Niedrige Seroprävalenzen wurden aus Kroatien (0,4 %) und Polen (0,3 %) gemeldet, während in England keine WNV-Infektionen festgestellt wurden (MADIC et al. 2007, NICZYPORUK et al. 2015, FOLLY et al. 2020). Da das WNV in Südosteuropa seit vielen Jahren endemisch ist, überrascht es nicht, dass ein längerer Zeitraum der Viruszirkulation zu höheren Seroprävalenzen in diesen Gebieten führt. Frühere Studien aus Polen und Kroatien, die in der Vergangenheit niedrigere Seroprävalenzen meldeten, wurden durch Studien mit höheren festgestellten Seroprävalenzen aktualisiert, diese deuten auf eine

anhaltende Ausbreitung des WNV in der Pferdepopulation in diesen Ländern hin. Ein ähnlicher Effekt ist für Deutschland zu erwarten. Das Fehlen bestätigter positiver Ergebnisse aus England ist ein starker Indikator dafür, dass das WNV in Großbritannien noch nicht präsent ist. Das Fehlen neurologischer Symptome entspricht den Ergebnissen früherer Studien (GARDNER et al. 2007, NIELSEN et al. 2008, ANGENVOORT et al. 2013).

In der vorliegenden Studie wurden die Seren nicht auf WNV-IgM-Antikörper oder spezifische WNV-RNS untersucht, da die Wahrscheinlichkeit eines positiven Nachweises aufgrund des Fehlens akuter klinischer Symptome bei den beprobten Pferden und aufgrund der Jahreszeit, in der die Serumproben entnommen wurden, als zu gering eingeschätzt wurde. Während der Wintersaison treten bei Pferden in Deutschland keine WNV-Infektionen auf, weil die Vektoren nicht mehr aktiv sind (KAMPEN et al. 2021). Allerdings kann es immer noch zu verzögerten Meldungen kommen, sodass das Eintragungsdatum im Tierseucheninformationssystem nicht unbedingt dem Zeitpunkt der klinischen Erkrankung oder des positiven Testergebnisses entspricht. Ähnlich wie bei Ganzenberg et al. 2022 waren acht Seren im cELISA positiv, wurden aber nicht im Neutralisationstest bestätigt. Mögliche Erklärungen sind das Vorhandensein von kreuzreagierenden Antikörpern gegen andere Flaviviren, für die kein Neutralisationstest durchgeführt wurde, wie das Japanische Enzephalitis-Virus (JEV), das Louping-III-Virus (LIV) oder ein anderes unerkanntes Flavivirus. JEV und LIV sind jedoch in Deutschland noch nicht nachgewiesen worden (BECK et al. 2013). Eine alternative Erklärung, nämlich das Vorhandensein von nicht-neutralisierenden Antikörpern gegen das WNV in einem frühen Infektionsstadium ohne das Vorhandensein von neutralisierenden Eigenschaften gegen das WNV, wie von Ganzenberg et al. 2022 diskutiert, wird in dieser Studie als unwahrscheinlich angesehen, da neutralisierende Antikörper ab 12 Tage nach einer WNV-Infektion beim Pferd nachweisbar sind, und der letzte mögliche Infektionszeitpunkt für alle in der Studie beprobten Pferde mindestens 4 Wochen zurückliegt (BIELEFELDT-OHMANN et al. 2017). Weiterhin sind akute Infektionen während des Probenentnahmezeitraums auch aufgrund der niedrigen Temperaturen und der damit verbundenen niedrigen Abundanz von Vektoren als unwahrscheinlich einzustufen (SAUER et al. 2022).

Da in der logistischen Regression keine Risikofaktoren für WNV-Seropositivität ermittelt wurden, wurde ein erweitertes Regressionsmodell erstellt, das 17 bekannte seropositive Pferde aus der Studie von 2020 einschließt (GANZENBERG et al. 2022). Dieses ergab ein reduziertes Risiko für Pferde, die ständig im Freien gehalten wurden und für Pferde, bei denen Repellentien verwendet wurden (Tabelle 9, Ergänzende Daten der Publikation). Die Assoziation der permanenten Außenhaltung mit der WNV-Seropositivität steht im Widerspruch zu den bisherigen Erkenntnissen, und es fehlt bislang eine plausible Erklärung. Die Verwendung eines Repellents als Schutzfaktor gegen WNV-Seropositivität ist hingegen aufgrund der Schutzwirkung dieser Produkte gegen

Insektenstiche plausibel. Da die Signifikanz der beiden Modelle gering ist, sind weitere Untersuchungen erforderlich, um diese Risikofaktoren zu bestätigen.

Vergleicht man die in dieser Studie ermittelten Ergebnisse mit den offiziell gemeldeten humanen WNV-Fällen des Robert-Koch-Instituts, fällt auf, dass auch in Landkreisen in denen noch keine WNV-Erkrankungen beim Menschen aufgetreten sind, seropositive Pferde gefunden wurden (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023b). So wurden bis jetzt noch keine humanen WNV-Erkrankungen aus den Landkreisen Potsdam-Mittelmark, Dahme-Spreewald, Elbe-Elster, Oberspreewald-Lausitz, Dresden und Mittelsachsen gemeldet. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen jedoch nahe, dass sich in diesen Landkreisen bereits Pferde mit dem Virus infiziert haben und daher auch Menschen in diesen Regionen einem realen Infektionsrisiko ausgesetzt sind. Weiterhin werden durch positive serologische Ergebnisse beim Pferd, aktive Infektionszyklen in den Landkreisen Wittenberg, Salzlandkreis, Saalekreis, Leipzig-Land, Nordsachsen und Meißen bestätigt. Diese Beobachtungen stimmen mit den Fallmeldungen des RKI überein, da aus diesen Landkreisen auch humane WNV-Fälle gemeldet wurden. Somit decken sich die serologischen WNV-Nachweise bei Pferden in dieser Studie mit den offiziellen Fallmeldungen des RKI und geben darüber hinaus Aufschluss, in welchen angrenzenden Landkreisen ebenfalls humane WNV-Fälle zu erwarten sind, da sich dort bereits Pferde infiziert haben.

Im Landkreis Jerichower Land wurden bis jetzt keine Fälle bei Menschen, Pferden oder Vögeln gemeldet. In der vorliegenden Arbeit konnten jedoch bei einem Pferd aus diesem Landkreis neutralisierende Antikörper gegen das WNV nachgewiesen werden. Aus der Besitzerbefragung ging jedoch hervor, dass dieses Pferd erst seit einigen Wochen im Bestand war. Somit liegt der Schluss nahe, dass sich dieses Pferd wahrscheinlich nicht im Bestand mit dem WNV infiziert hat und hier nicht sicher von einer autochthonen WNV-Infektion aus dem Landkreis Jerichower Land ausgegangen werden kann.

Die Grenzen des Einsatzes von Pferden als WNV-Sentinel lassen sich gut am Beispiel des Landkreises Dessau-Roßlau veranschaulichen. In diesem kam es bis heute noch zu keinem berichteten Fall bei Menschen, Pferden oder Vögeln und auch die vorliegende Studie konnte keinen serologischen Hinweis auf eine WNV-Infektion beim Pferd finden. Entomologische Untersuchungen wiesen jedoch in diesem Landkreis WNV-infizierte Stechmücken nach und implizieren damit ein reales Infektionsrisiko für Mensch und Tier (KAMPEN et al. 2021). Anhalt-Bitterfeld ist der einzige Landkreis, in welchem die vorliegende Studie keinen serologischen WNV-Nachweis beim Pferd zeigen konnte. Die vorangegangene Arbeit von Ganzenberg et al. 2022 wies jedoch 2020 neutralisierende Antikörper gegen das WNV bei neun Pferden nach.

4.2 Usutu-Virus

Seit seinem ersten Auftreten in Mitteleuropa im Jahr 1996 wurde das USUV in vielen europäischen Ländern, darunter auch Deutschland, isoliert (WEISSENBOCK et al. 2002, VILIBIC-CAVLEK et al. 2020). Die vorliegende Studie bestätigte zuvor nachgewiesene Antikörper gegen das USUV bei vier erneut getesteten Pferden und entdeckte ein neues USUV-seropositives Pferd sowie ein Pferd mit einer möglichen Ko-Infektion von USUV und WNV. Bisher wurde bereits bei einem Menschen aus Österreich eine Ko-Infektion mit beiden Viren mittels RNS-Nachweis beschrieben (ABERLE et al. 2018). Da Ko-Infektionen von USUV und WNV bei Vögeln und Stechmücken in Deutschland bereits beschrieben worden sind, ist davon auszugehen, dass auch Pferde sich potenziell mit beiden Viren infizieren können. Diese bestätigten Ko-Infektionen wurden nach dem Nachweis von Virus-RNS aus Vögeln und Stechmücken beschrieben (SANTOS et al. 2021, KORSTEN et al. 2023). Da die Virämie, zumindest beim WNV - für das USUV liegen hierfür keine Daten vor - beim Pferd im Gegensatz zum Vogel nach einer Infektion mit den beiden Viren nur äußerst kurz ist, ist ein vergleichbarer Nachweis bei dieser Tierart äußerst unwahrscheinlich (BUNNING et al. 2002). Aufgrund der hohen Kreuzreaktivität der beiden Viren im VNT sind die Befunde der vorliegenden Arbeit lediglich hinweisend auf das Vorliegen einer Ko-Infektion. Diese kann aber durchaus auch zeitversetzt stattgefunden haben, da hier nur die Antikörper gegen beide Viren nachgewiesen wurden.

Weiterhin reagierte ein Pferd, das in der Vorgängerarbeit von 2020 neutralisierende Antikörper gegen das USUV im cELISA und VNT aufwies, in der vorliegenden Arbeit negativ im cELISA (GANZENBERG et al. 2022). Beim Menschen konnten neutralisierende bzw. IgG-Antikörper bis zu 2 Jahre nach einem initial positiven Testergebnis nachgewiesen werden (PERCIVALLE et al. 2020). Geht man von einer ähnlich langen Persistenz neutralisierender Antikörper beim Pferd aus, so ist anzunehmen, dass sich das Pferd zwischen 2018 und 2020 mit dem USUV infiziert hat.

Da die USUV-positiven Pferde nicht ins Ausland reisten, in Deutschland geboren wurden und in den letzten zwölf Monaten vor Beprobung nicht weiter als 20 km vom Bestand weg transportiert wurden, schließen wir, dass diese Infektionen wahrscheinlich autochthon im Untersuchungsgebiet erworben wurden. Da Betriebe mit bereits bekannten USUV-positiven Pferden eingeschlossen wurden, ist die Seropositivitätsrate von USUV in dieser Studie wahrscheinlich überschätzt. Da bis jetzt keine humane USUV-Infektion in Deutschland beschrieben ist, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit in Übereinstimmung mit Daten aus dem Screening von Blutdatenbanken sowie des Wildvogel-Monitorings ein reales Infektionsrisiko für den Menschen in Deutschland auf (CADAR et al. 2017, FRIEDRICH LOEFFLER-INSTITUT 2018, SANTOS et al. 2021).

4.3 Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus

Unsere Ergebnisse zeigten eine Seropositivitätsrate für FSMEV-Infektionen von 5,6 %. Vergleichbare Seroprävalenzen wurden in Spanien (3,1 %) und Hessen (2,9 %) ermittelt (MÜLLER 2006, CAMINO et al. 2020), während höhere Prävalenzen in Österreich (26,1 %), Litauen (37,5 %) und Baden-Württemberg (23,4 %) festgestellt wurden (JANITZA-FUTTERER 2003, RUSHTON et al. 2013, PAUTIENIUS et al. 2021). Von den 69 im VNT bestätigten FSMEV-seropositiven Pferden waren 51 in den letzten 12 Monaten nicht weiter als 20 km vom Betrieb wegtransportiert worden. Bei diesen ist eine autochthone FSMEV-Infektion im Studiengebiet wahrscheinlich. Aufgrund der Einbeziehung von Pferden, die bereits 2020 neutralisierende Antikörper gegen das FSMEV aufwiesen, ist die Seropositivitätsrate für das FSMEV wahrscheinlich überschätzt. Das Alter und die Anzahl der Pferde im Betrieb waren Risikofaktoren für eine FSMEV-Infektion (Tabelle 10, Ergänzende Daten der Publikation). Pferde mit einem höheren Alter hatten ein höheres Risiko, seropositiv zu sein. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den Ergebnissen einer früheren Studie, in der ein höherer Anteil jüngerer Pferde (Durchschnittsalter 5,9 Jahre) Antikörper gegen das FSMEV in einer einzelnen Herde aufwies (RUSHTON et al. 2013). In anderen Studien wurden jedoch keine signifikanten Zusammenhänge zwischen Alter und Seropositivität nachgewiesen (PAUTIENIUS et al. 2021). Unsere Ergebnisse stimmen mit früheren Befunden bei Rindern aus Ungarn überein, bei denen Individuen, die jünger als 36 Monate waren, eine signifikant niedrigere Seroprävalenz aufwiesen (SIKUTOVA et al. 2009). Aufgrund der Beobachtung, dass alle zuvor FSMEV-positiven Pferde noch bis zu 19 Monate nach der Erstuntersuchung FSMEV-neutralisierende Antikörper aufwiesen, erscheint ein kumulativer Anstieg der FSME-Seropositivitätsrate mit dem Alter in der Pferdepopulation wahrscheinlich (KLAUS et al. 2013, GANZENBERG et al. 2022). Ein weiterer Prädiktor für die FSMEV-Seropositivität war in dieser Studie die "Anzahl der Pferde im Betrieb". Pferde in Betrieben mit einer höheren Anzahl von Tieren waren mit geringerer Wahrscheinlichkeit seropositiv. Eine mögliche Erklärung ist die Zooprohylaxe-Theorie, nach der die Anwesenheit von Rindern in ländlichen Malariagebieten den Menschen vor der Infektion schützen, indem sie Stechmücken vom menschlichen Wirt ablenken (MBURU et al. 2021). Ähnliche Effekte werden auch für die Beziehung zwischen Hirschzecken (*Ixodes scapularis*) und Weißwedelhirschen in Nordamerika diskutiert, wobei Letztere als möglicher inkompetenter Verdünnungswirt für die Lyme-Borreliose in Nordamerika dienen (HUANG et al. 2019). Eine andere Erklärung für die Signifikanz dieser Variable könnte die schwache Korrelation mit der Variable Alter sein. Diese negative Korrelation ist höchstwahrscheinlich auf die Einbeziehung mehrerer Zuchtbetriebe zurückzuführen, da Zuchtbetriebe als Betriebe mit einer hohen Anzahl von Pferden und insbesondere einem hohen Anteil an jungen Pferden charakterisiert waren. Da die Odds Ratios beider Variablen nur minimal von eins abwichen muss hervorgehoben werden, dass ihr Einfluss als relativ schwach zu bewerten ist. Weiterhin war keiner dieser Risikofaktoren in dem

erweiterten Regressionsmodell, das alle zuvor getesteten Pferde von Ganzenberg et al. 2022 und die vorliegende Studienpopulation einschloss, nachweisbar (Tabelle 11, Ergänzende Daten der Publikation).

Aufgrund der Beobachtung, dass Weidetiere als gute Sentinels für das FSMEV in einem bestimmten Gebiet gelten, würde man einen Zusammenhang zwischen FSMEV-Fällen beim Menschen und der Seropositivitätsrate bei Pferden erwarten (JANITZA-FUTTERER 2003, KLAUS et al. 2013). In der vorliegenden Studie wurde jedoch die höchste FSME-Seropositivitätsrate im Landkreis Dahme-Spreewald gefunden (15 %; 95 % CI: 9,69-21,01), der nicht als offizielles Risikogebiet registriert ist (ROBERT KOCH-INSTITUT 2023a). Auf der anderen Seite wurde in einigen offiziellen Risikogebieten, wie z. B. Oberspreewald-Lausitz (3 %; 95 % CI: 0,01-16,22), eine sehr niedrige Seropositivitätsrate nachgewiesen. Weiterhin zeigten andere als Risikogebiet klassifizierte Landkreise wie Dessau-Rosslau (17 %; 95 % CI: 5,01-40,05) eine hohe Seropositivitätsrate. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass FSME-Infektionen bei Pferden in dem untersuchten Gebiet regelmäßig vorkommen, auch wenn die einzelnen Landkreise noch nicht als offizielle FSME-Risikogebiete anerkannt sind, da die Inzidenz von FSME-Erkrankungen beim Menschen noch keine Anerkennung des Landkreises als offizielles Risikogebiet zulässt. Die Tatsache, dass drei von vier Serokonversionen in den Landkreisen Elbe-Elster (1) und Nordsachsen (2) auftraten, stützt die Vermutung, dass aktive Infektionszyklen in diesen Landkreisen präsent sind. Anhand der Auswertung der durch den Fragebogen erhobenen Daten ergab sich für den nicht als Risikogebiet ausgewiesenen Landkreis Wittenberg, dass die zwei einzigen FSMEV-seropositiven Pferde in den vergangenen zwölf Monaten weiter als 20 km vom Betrieb transportiert worden sind und eine autochthone Infektion im Landkreis Wittenberg somit nicht sicher ist. Im ebenfalls nicht als Risikogebiet ausgewiesenen Landkreis Elbe-Elster wurde bei elf von zwölf Pferden ein Verbringen von mehr als 20 km vom Betrieb festgestellt. Da aber eine Serokonversion bei dem einzigen nicht verbrachten Pferd aus diesem Landkreis festgestellt werden konnte, gilt eine Infektion im Laufe des Jahres 2021 als gesichert. Somit stützen die Ergebnisse dieser Arbeit auch in diesem Landkreis die Vermutung, dass FSMEV-Infektionen beim Pferd auch in nicht ausgewiesenen Risikogebieten vorkommen. Eine Reisehistorie wurde weiterhin bei drei FSMEV-seropositiven Pferden aus dem Landkreis Dahme-Spreewald und einem FSMEV-seropositiven Pferd aus Potsdam-Mittelmark festgestellt.

Insgesamt könnten FSMEV-seropositive Pferde, neben der alleinigen Bewertung auf der Grundlage der Zahl der menschlichen Fälle, ein zusätzliches Instrument zur Bewertung des Risikos von FSMEV-Infektionen beim Menschen sein.

4.4 Schlussfolgerungen

Diese Studie lieferte weitere Beweise für das Vorkommen von Infektionen mit den drei untersuchten Flaviviren in der mitteldeutschen Pferdepopulation.

Die Serokonversion bei Pferden für WNV und FSMEV zeigt, dass diese Viren im Untersuchungsgebiet zirkulieren und auch im Jahr 2021 auf Pferde übertragen wurden. Diese Arbeit bestätigt weiterhin das Vorhandensein von USUV-Infektionen bei Pferden in Ost- und Mitteldeutschland. Schließlich hat diese Arbeit die Langlebigkeit von neutralisierenden Antikörpern gegen USUV und FSMEV in Pferdeseren für 15 bzw. 19 Monate in Ost- und Mitteldeutschland gezeigt. In Bezug auf den Einsatz als Sentinels für die drei untersuchten zoonotischen Flaviviren kommen Pferde prinzipiell in Betracht. Im Fall des WNV konnten serologische Nachweise beim Pferd in allen Landkreisen, bei denen bisher Fälle beim Menschen aufgetreten waren, gefunden werden. Weiterhin wurde auch in Landkreisen, in denen noch keine WNV-Infektion beim Menschen gemeldet wurden, serologisch positive Pferde ermittelt. Im Fall der FSME konnten im Rahmen der vorliegenden Studie Antikörper bei Pferden auch in noch nicht als Risikogebiet ausgewiesenen Landkreisen festgestellt werden. Pferde könnten somit ein weiteres ergänzendes Werkzeug zur Abschätzung des Risikos einer humanen FSMEV-Infektion darstellen.

5 Zusammenfassung

Verfasser Leonard Max Richard Gothe

Titel Zoonotische Flavivirusinfektionen bei Pferden aus Mitteldeutschland

Institut Institut für Tierhygiene und Öffentliches Veterinärwesen und Klinik für Pferde,
Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig

Eingereicht im September 2023

77 Seiten, 3 Abbildungen, 11 Tabellen, 1 Publikation, 232 Quellen

Einleitung

Zoonotische, durch Vektoren übertragene Arboviren (engl.: arthropod-borne-viruses) aus der Familie der Flaviviridae, wie das West-Nil-Virus (WNV), das Usutu-Virus (USUV) und das Frühsommer-Meningoenzephalitis-Virus (FSMEV) stellen eine erhebliche Bedrohung für die Gesundheit von Menschen und Tieren dar. Das WNV wurde im Jahr 2018 erstmalig in Deutschland nachgewiesen. Seitdem wird von Infektionen bei Menschen, Pferden und Vögeln regelmäßig v. a. aus der ostdeutschen Tiefebene berichtet. Der natürliche Infektionszyklus des WNV und des USUV spielt sich vorwiegend zwischen Vögeln und Stechmücken ab, aber auch Menschen und Pferde sind immer wieder von milden bis hin zu fatalen Krankheitsverläufen nach einer WNV-Infektion betroffen. Eine noch größere Bedeutung für die öffentliche Gesundheit wird dem Virus der Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME) mit bis zu 10 000 Erkrankungen in Eurasien jährlich zugeschrieben. Im Gegensatz zum WNV und USUV wird es vor allem von Zecken übertragen und hat in Kleinsäugetern sein Hauptreservoir. Da Pferde ebenfalls nach Infektionen mit dem WNV und FSMEV erkranken können und spezifische Antikörper nach einer Infektion mit allen drei untersuchten Flaviviren ausbilden, sind sie geeignet, um Aufschluss über deren Verbreitung in Deutschland zu geben.

Ziel der Untersuchungen

Ziel dieser Studie war der Vergleich der Flavivirus-Seropositivitätsrate in der mitteldeutschen Pferdepopulation mit den Zahlen der 2020 durchgeführten Arbeit von Ganzenberg et al. 2022, sowie die Ausweitung des Untersuchungsgebiets auf noch nicht beprobte Landkreise. Durch die erneute Beprobung von bereits 2020 getesteten Pferden sollten Serokonversionen festgestellt und die bereits von Ganzenberg et al. 2022 erhobenen Risikofaktoren für eine Infektion mit dem WNV anhand des neu gesammelten Materials überprüft werden. Abschließend wurden zusätzlich anhand des Studienmaterials Risikofaktoren für die Infektion von Pferden mit dem FSME-Virus untersucht.

Tiere, Material und Methoden

Das bereits von Ganzenberg et al. 2022 definierte Studiengebiet, welches neun Landkreise in den Bundesländern Sachsen, Sachsen-Anhalt und Brandenburg umfasste, wurde für die erneute Erfassung der Flavivirus-Seropositivitätsrate 2022 an der Nordgrenze um sechs Landkreise erweitert. Erneut wurden Pferdehalter mit fünf oder mehr gemeldeten Equiden zur Teilnahme an der Studie

eingeladen. Zur Teilnahme waren wie bereits bei Ganzenberg et al. 2022 gesunde Pferde geeignet, die mindestens zwölf Monate alt und nicht gegen das WNV geimpft waren, und die dauerhaft in der Region gehalten wurden. Nach der Probennahme erfolgte bei allen Serumproben ein Screening mittels kommerziellem kompetitivem ELISA (cELISA) auf flavivirusspezifische Antikörper. Alle positiven und grenzwertigen Proben aus den ELISA-Untersuchungen wurden beim Referenzlabor im Virusneutralisationstest (VNT) differenziert und bestätigt. Die per Fragebogen erhobenen individuellen sowie haltungsspezifischen Daten wurden mittels logistischer Regression auf Risikofaktoren für eine Infektion mit dem WNV und dem FSMEV untersucht.

Ergebnisse

Im Frühjahr 2022 (Januar-März) wurde von 1232 Pferden aus 114 Betrieben Blut entnommen und das Serum anschließend im cELISA auf flavivirusspezifische Antikörper untersucht. Von allen untersuchten Seren zeigten 125 ein positives Ergebnis. Von diesen konnten im anschließend durchgeführten VNT 40/125 (3,3 %) als neutralisierend gegen das WNV, 5/125 (0,4 %) als neutralisierend gegen das USUV und 69/125 (5,6 %) als neutralisierend gegen das FSMEV bestätigt werden. Bei drei Seren konnte keine eindeutige Zuordnung zu einem der drei Viren erfolgen. Diese Seren stellen somit potenzielle Doppelinfektionen dar. Abschließend konnten die Antikörper aus acht Seren keinem der drei untersuchten Viren im Neutralisationstest zugeordnet werden. Weiterhin wurden eine WNV-Serokonversion und vier FSMEV-Serokonversionen bei in der Testung von 2020 noch seronegativen Pferden festgestellt. Bei 17 Tieren, welche 2020 positiv auf Antikörper gegen das FSMEV getestet wurden, waren erneut Antikörper nachweisbar. Weiterhin konnten bei vier Tieren erneut Antikörper gegen das USUV festgestellt werden. Bei USUV-positiven Pferden waren bis zu 15 Monate und bei FSMEV-positiven Pferden bis zu 19 Monate seit der vorherigen Testung vergangen. Während im Regressionsmodell keine Risikofaktoren für eine WNV-Infektion festgestellt werden konnten, wurden für eine Infektion mit dem FSMEV das Alter der Tiere und die Anzahl der Pferde im Bestand als Risikofaktoren ermittelt. Das Risiko einer Infektion mit dem FSMEV war bei älteren Tieren größer und bei Tieren in großen Beständen kleiner.

Schlussfolgerungen

Diese Studie lieferte weitere Beweise für das Vorkommen von Infektionen mit den drei untersuchten Flaviviren in der mitteldeutschen Pferdepopulation.

Die Serokonversion bei Pferden für WNV und FSMEV zeigt, dass diese Viren im Untersuchungsgebiet zirkulieren und auch im Jahr 2021 auf Pferde übertragen wurden. Schließlich hat diese Arbeit gezeigt, dass neutralisierende Antikörper gegen das USUV und das FSMEV in Pferdeseren für mindestens 15 bzw. 19 Monate nach einer vorherigen Infektion persistieren.

Prinzipiell kommen Pferde als Sentinels für alle drei untersuchten Flaviviren in Betracht. Im Fall des WNV konnten serologische Nachweise beim Pferd in allen Landkreisen, bei denen bisher Fälle beim Menschen aufgetreten waren, gefunden werden. Weiterhin wurde auch in Landkreisen, in denen noch keine WNV-Infektion beim Menschen gemeldet wurde, serologisch positive Pferde ermittelt. Für die FSME konnte die Studie Antikörper bei Pferden auch in noch nicht als Risikogebiete ausgewiesenen Landkreisen feststellen. Pferde könnten somit ein weiteres ergänzendes Werkzeug zur Abschätzung des Risikos einer humanen FSMEV-Infektion darstellen.

6 Summary

Author Leonard Max Richard Gothe
Title Zoonotic flavivirus infections in horses from Eastern-Central Germany
Institute Institute for Animal Hygiene and Veterinary Public Health and Department for Horses, Faculty of Veterinary Medicine, Leipzig University

Submitted in September 2023

77 pages, 3 figures, 11 tables, 1 publication, 232 references

Keywords: West Nile Virus, Equids, Seroprevalence, ELISA, Microneutralization test, Germany, Europe

Introduction

Zoonotic arboviruses of the Flaviviridae family, such as West Nile virus (WNV), Usutu virus (USUV), and tick-borne encephalitis virus (TBEV), pose a significant threat to human and animal health. WNV and USUV are mosquito-borne viruses. Since WNV emerged in Germany for the first time in 2018, infections in humans, horses and birds have been regularly detected. The natural infection cycle of these two viruses plays out predominantly between birds and mosquitoes, but humans and horses are regularly affected by mild to fatal courses of disease after infection with WNV. An even greater public health significance is attributed to the TBEV, with up to 10,000 human cases annually in Eurasia. Unlike WNV and USUV, TBEV is transmitted primarily by ticks and has its main reservoir in small mammals. Since horses also show clinical signs after infection with WNV and TBEV and form specific antibodies against all 3 investigated flaviviruses, they are suitable for providing information about flavivirus distribution in Germany.

Aims of the study

This study aimed to compare the flavivirus seropositivity rate in the eastern-central German horse population with the 2020 results from Ganzenberg et al. (2022), and to extend the study area to counties not yet sampled. By re-sampling horses already tested in 2020, seroconversion of formerly seronegative horses to seropositive horses was investigated. Furthermore, risk factors for WNV infection determined by Ganzenberg et al. in 2020 were verified using newly collected data, and risk factors for infection of horses with TBEV were additionally examined using the study material.

Animals, material, and methods

The study area defined by Ganzenberg et al. 2022, which included nine counties in the states of Saxony, Saxony-Anhalt, and Brandenburg, was extended by 6 counties at the northwestern border to define the new study area for the 2022 sampling. Once again, horse owners with five or more registered equids were invited to participate in the study. As described by Ganzenberg et al. 2022, healthy horses that were at least 12 months old, not vaccinated against WNV and kept permanently in the region were eligible to participate. All collected serum samples were screened for flavivirus-specific antibodies using a commercial competitive ELISA (cELISA). All positive or borderline samples from the cELISA assays were differentiated and confirmed at the reference laboratory via virus

neutralization test (VNT). Individual and holding-specific data were collected by questionnaire and analyzed for risk factors for infection with WNV and TBEV using logistic regression.

Results

From January to March 2022, blood was collected from 1232 horses residing on 114 holdings, and tested for flavivirus-specific antibodies by cELISA. Of all sera tested, 125 showed a positive or equivocal result. Of these, 40/125 (3.3 %) could be confirmed as containing neutralizing WNV, 5/125 (0.4 %) as neutralizing USUV, and 69/125 (5,6 %) as neutralizing TBEV in the subsequently performed VNT. In 3 sera, no clear assignment to one of the three viruses could be made. These sera, therefore, represent potential double infections. Eight sera did not contain neutralizing antibodies against any of the 3 tested viruses. Furthermore, one WNV seroconversion and 4 TBEV seroconversions were detected in horses that had tested seronegative in 2020. In 17 animals which tested positive for antibodies against TBEV in 2020, antibodies could still be detected. Furthermore, antibodies against USUV were detected again in 4 animals. Based on the time period between sample collections, antibodies against USUV persisted for at least 15 months, and antibodies against TBEV persisted for at least 19 months. While the WNV regression model did not identify any risk factors for WNV infection, the age of the animals and the number of horses on the holding were identified as risk factors for TBEV infection. The risk of infection with TBEV was bigger in older animals, whereas it became smaller in animals on larger holdings.

Conclusions

This study provided further evidence for the occurrence of infections with the three investigated flaviviruses in the eastern-central German horse population.

Seroconversion of horses for WNV and TBEV indicates that these viruses are circulating in the study area and were also transmitted to horses in 2021. Finally, this work demonstrated the persistence of neutralizing antibodies against USUV and TBEV in horse sera for at least 15 and 19 months, respectively.

In principle, horses can be considered sentinels for all 3 flaviviruses. In the case of WNV, neutralizing antibodies in horses were found in all counties where human cases had occurred so far. Furthermore, serologically positive horses were also found in counties where WNV infection in humans had not yet been reported. For TBEV, the study was able to detect antibodies in horses even in counties not yet designated as official risk areas. Horses could thus represent a complementary tool for assessing the risk of human TBEV infection.

7 Literaturverzeichnis

Aberle SW, Kolodziejek J, Jungbauer C, Stiasny K, Aberle JH, Zoufaly A, Hourfar MK, Weidner L and Nowotny N. Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Euro Surveill.* 2018; 23(43): 7-12.

Abutarbush SM and Al-Majali AM. West Nile virus infection in horses in Jordan: clinical cases, seroprevalence and risk factors. *Transbound Emerg Dis.* 2014; 61 Suppl 1: 1-6.

Aharonson-Raz K, Lichter-Peled A, Tal S, Gelman B, Cohen D, Klement E and Steinman A. Spatial and temporal distribution of West Nile virus in horses in Israel (1997-2013)--from endemic to epidemics. *PLoS One.* 2014; 9(11): doi:10.1371/journal.pone.0113149.

Ahmadnejad F, Otarod V, Fallah MH, Lowenski S, Sedighi-Moghaddam R, Zavareh A, Durand B, Lecollinet S and Sabatier P. Spread of West Nile virus in Iran: a cross-sectional serosurvey in equines, 2008-2009. *Epidemiol Infect.* 2011; 139(10): 1587-1593.

Allan BF, Langerhans RB, Ryberg WA, Landesman WJ, Griffin NW, Katz RS, Oberle BJ, Schutzenhofer MR, Smyth KN, de St Maurice A, Clark L, Crooks KR, Hernandez DE, McLean RG, Ostfeld RS and Chase JM. Ecological correlates of risk and incidence of West Nile virus in the United States. *Oecologia.* 2009; 158(4): 699-708.

Amicizia D, Domnich A, Panatto D, Lai PL, Cristina ML, Avio U and Gasparini R. Epidemiology of tick-borne encephalitis (TBE) in Europe and its prevention by available vaccines. *Hum Vaccines Immunother.* 2013; 9(5): 1163-1171.

Angelini P, Tamba M, Finarelli AC, Bellini R, Albieri A, Bonilauri P, Cavrini F, Dottori M, Gaibani P, Martini E, Mattivi A, Pierro AM, Rugna G, Sambri V, Squintani G and Macini P. West Nile virus circulation in Emilia-Romagna, Italy: the integrated surveillance system 2009. *Euro Surveill.* 2010; 15(16): 11-15.

Angenvoort J, Brault AC, Bowen RA and Groschup MH. West Nile viral infection of equids. *Vet Microbiol.* 2013; 167(1-2): 168-180.

Autorino GL, Battisti A, Deubel V, Ferrari G, Forletta R, Giovannini A, Lelli R, Murri S and Scicluna MT. West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(12): 1372-1378.

Azmi K, Tirosh-Levy S, Manasrah M, Mizrahi R, Nasereddin A, Al-Jawabreh A, Ereqat S, Abdeen Z, Lustig Y, Gelman B, Schwartz G and Steinman A. West Nile Virus: Seroprevalence in Animals in Palestine and Israel. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17(8): 558-566.

Bakonyi T, Erdelyi K, Brunthaler R, Dan A, Weissenbock H and Nowotny N. Usutu virus, Austria and Hungary, 2010-2016. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6(10): doi: 10.1038/emi.2017.1072.

Bakonyi T, Gould EA, Kolodziejek J, Weissenbock H and 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. *Virol.* 2004; 328(2): 301-310.

Bakonyi T, Hubalek Z, Rudolf I and Nowotny N. Novel flavivirus or new lineage of West Nile Virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2005; 11(2): 225-231.

Bakonyi T, Ivanics E, Erdelyi K, Ursu K, Ferenczi E, Weissenbock H and Nowotny N. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe. *Emerg Infect Dis.* 2006; 12(4): 618-623.

Banet-Noach C, Simanov L and Malkinson M. Direct (non-vector) transmission of West Nile virus in geese. *Avian Pathol.* 2003; 32(5): 489-494.

Barbic L, Listes E, Katic S, Stevanovic V, Madic J, Staresina V, Labrovic A, Di Gennaro A and Savini G. Spreading of West Nile virus infection in Croatia. *Vet Microbiol.* 2012; 159(3-4): 504-508.

Barros SC, Ramos F, Fagulha T, Duarte M, Henriques M, Luis T and Fevereiro M. Serological evidence of West Nile virus circulation in Portugal. *Vet Microbiol.* 2011; 152(3-4): 407-410.

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, Cusinato R and Palu G. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis.* 2013; 208(7): 1086-1092.

Bazanow B, Jansen van Vuren P, Szymanski P, Stygar D, Fracka A, Twardon J, Kozdrowski R and Paweska JT. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses.* 2018; 10(2): doi: 10.3390/v10020087.

Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparc-Goffart I, Zientara S, Jourdain E and 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(11): 6049-6083.

Becker N, Jost H, Ziegler U, Eiden M, Hoper D, Emmerich P, Fichet-Calvet E, Ehichioya DU, Czajka C, Gabriel M, Hoffmann B, Beer M, Tenner-Racz K, Racz P, Gunther S, Wink M, Bosch S, Konrad A, Pfeffer M, Groschup MH and Schmidt-Chanasit J. Epizootic Emergence of Usutu Virus in Wild and Captive Birds in Germany. *PLoS One.* 2012; 7(2): doi:10.1371/journal.pone.0032604.

Ben Hassine T, De Massis F, Calistri P, Savini G, BelHaj Mohamed B, Ranen A, Di Gennaro A, Sghaier S and 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(5): 385-389.

Bentler KT, Hall JS, Root JJ, Klenk K, Schmit B, Blackwell BF, Ramey PC and Clark L. Serologic evidence of West Nile virus exposure in North American mesopredators. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2007; 76(1): 173-179.

Bergmann F, Trachsel DS, Stoeckle SD, Bernis Sierra J, Lübke S, Groschup MH, Gehlen H and Ziegler U. Seroepidemiological Survey of West Nile Virus Infections in Horses from Berlin/Brandenburg and North Rhine-Westphalia, Germany. *Viruses.* 2022; 14(2): doi:10.3390/v14020243.

Berxholi K, Ziegler U, Rexhepi A, Schmidt K, Mertens M, Korro K, Cuko A, Angenvoort J and Groschup MH. Indigenous West Nile Virus Infections in Horses in Albania. *Transbound Emerg Dis.* 2013; 60: 45-50.

Best SM. Flaviviruses. *Curr Biol.* 2016; 26(24): R1258-R1260.

Bielefeldt-Ohmann H, Bosco-Lauth A, Hartwig AE, Uddin MJ, Barcelon J, Suen WW, Wang WQ, Hall RA and Bowen RA. Characterization of non-lethal West Nile Virus (WNV) infection in horses: Subclinical pathology and innate immune response. *Microb Pathog.* 2017; 103: 71-79.

Bogovic P and Strle F. Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management. *World J Clin Cases*. 2015; 3(5): 430-441.

Bondre VP, Jadi RS, Mishra AC, Yergolkar PN and Arankalle VA. West Nile virus isolates from India: evidence for a distinct genetic lineage. *J Gen Virol*. 2007; 88: 875-884.

Botha EM, Markotter W, Wolfaardt M, Paweska JT, Swanepoel R, Palacios G, Nel LH and Venter M. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains. *Emerging Infect Dis*. 2008; 14(2): 222-230.

Brandenburg PJ, Obiegala A, Schmuck HM, Dobler G, Chitimia-Dobler L and Pfeiffer M. Seroprevalence of Tick-Borne Encephalitis (TBE) Virus Antibodies in Wild Rodents from Two Natural TBE Foci in Bavaria, Germany. *Pathogens*. 2023; 12(2): doi:10.3390/pathogens12020185.

Brockmann SO, Oehme R, Buckenmaier T, Beer M, Jeffery-Smith A, Spannenkreb M, Haag-Milz S, Wagner-Wiening C, Schlegel C, Fritz J, Zange S, Bestehorn M, Lindau A, Hoffmann D, Tiberi S, Mackenstedt U and Dobler G. A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016. *Euro Surveill*. 2018; 23(15): doi:10.2807/1560-7917.ES.2018.2823.2815.2817-00336.

Brugman VA, Hernandez-Triana LM, Medlock JM, Fooks AR, Carpenter S and Johnson N. The Role of *Culex pipiens* L. (Diptera: Culicidae) in Virus Transmission in Europe. *Int J Environ Res Public Health*. 2018; 15(2): doi:10.3390/ijerph15020389.

Buckley A, Dawson A, Moss SR, Hinsley SA, Bellamy PE and Gould EA. Serological evidence of West Nile virus, Usutu virus and Sindbis virus infection of birds in the UK. *J Gen Virol*. 2003; 84(Pt 10): 2807-2817.

Bundesgesetzblatt Teil 1 Nr. 80. Erste Verordnung zur Änderung tierseuchenrechtlicher Verordnungen: Deutscher Bundestag (Stand: 2023 Feb 10). 2009: Verfügbar unter: https://www.bgbl.de/xaver/bgbl/start.xav?start=%2F%2F%5B%40attr_id%43D%27bgbl109s3922.pdf%3927%3925D#__bgbl__%3922F%3922F%*3925B%3940attr_id%3923D%3927bgbl3109s3939.pdf%3922%3927%3925D__1651861872893.

Bunning ML, Bowen RA, Cropp CB, Sullivan KG, Davis BS, Komar N, Godsey MS, Baker D, Hettler DL, Holmes DA, Biggerstaff BJ and Mitchell CJ. Experimental infection of horses with West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8(4): 380-386.

Butenko AMS, I.V.;Skvortsova,T.M.;Gromashevskii,V.L.;Kondrashina,N.G. Detection of the Koutango virus (Flavivirus, Togaviridae) in Somalia. *Med Parazitol (Mosk)*. 1986; 3: 65–68.

Byas AD and Ebel GD. Comparative Pathology of West Nile Virus in Humans and Non-Human Animals. *Pathogens*. 2020; 9(1): doi:10.3390/pathogens9010048.

Byrne SN, Halliday GM, Johnston LJ and King NJ. Interleukin-1beta but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(3): 702-709.

Cadar D, Maier P, Muller S, Kress J, Chudy M, Bialonski A, Schlaphof A, Jansen S, Jost H, Tannich E, Runkel S, Hitzler WE, Hutschenreuter G, Wessiepe M and Schmidt-Chanasit J. Blood donor screening for West Nile virus (WNV) revealed acute Usutu virus (USUV) infection, Germany, September 2016. *Euro Surveill*. 2017; 22(14): 9-13.

Cadar D and Simonin Y. Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses*. 2022; 15(1): doi:10.3390/v15010077.

Camino E, Schmid S, Weber F, Pozo P, de Juan L, König M and Cruz-Lopez F. Detection of antibodies against tick-borne encephalitis flaviviruses in breeding and sport horses from Spain. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020; 11(5): 101487.

Cantile C, Del Piero F, Di Guardo G and Arispici M. Pathologic and immunohistochemical findings in naturally occurring West Nile Virus infection in horses. *Vet Pathol*. 2001; 38(4): 414-421.

Cardinale E, Bernard C, Lecollinet S, Rakotoharinome VM, Ravaomanana J, Roger M, Olive MM, Meenowa D, Jaumally MR, Melanie J, Heraud JM, Zientara S and Cetre-Sossah C. West Nile virus infection in horses, Indian ocean. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2017; 53: 45-49.

Castle E and Wengler G. Nucleotide sequence of the 5'-terminal untranslated part of the genome of the flavivirus West Nile virus. *Arch Virol*. 1987; 92(3-4): 309-313.

Cavalleri JMV, Korbacska-Kutasi O, Leblond A, Paillet R, Pusterla N, Steinmann E and Tomlinson J. European College of Equine Internal Medicine consensus statement on equine flaviviridae infections in Europe. *J Vet Intern Med*. 2022; 36: doi:10.1111/jvim.16581.

CDC. Intrauterine West Nile virus infection-New York. *MMWR Morb. Mort. Rep*. 2002; 51: 1135-1136.

Chen S, Wu Z, Wang M and Cheng A. Innate Immune Evasion Mediated by Flaviviridae Non-Structural Proteins. *Viruses*. 2017; 9(10): doi:10.3390/v9100291.

Chevalier V, Dupressoir A, Tran A, Diop OM, Gotteland C, Diallo M, Etter E, Ndiaye M, Grosbois V, Dia M, Gaidet N, Sall AA, Soti V and Niang M. Environmental risk factors of West Nile virus infection of horses in the Senegal River basin. *Epidemiol Infect*. 2010; 138(11): 1601-1609.

Chevalier V, Lancelot R, Diaite A, Mondet B, Sall B and De Lamballerie X. Serological assessment of West Nile fever virus activity in the pastoral system of Ferlo, Senegal. *Ann N Y Acad Sci*. 2006; 1081: 216-225.

Chevalier V, Lecollinet S and Durand B. West Nile Virus in Europe: A Comparison of Surveillance System Designs in a Changing Epidemiological Context. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011; 11(8): 1085-1091.

Chitimia-Dobler L, Lemhofer G, Krol N, Bestehorn M, Dobler G and Pfeffer M. Repeated isolation of tick-borne encephalitis virus from adult *Dermacentor reticulatus* ticks in an endemic area in Germany. *Parasit Vectors*. 2019; 12: doi:10.1186/s13071-13019-13346-13076.

Chvala S, Bakonyi T, Bukovsky C, Meister T, Brugger K, Rubel F, Nowotny N and Weissenböck H. Monitoring of Usutu virus activity and spread by using dead bird surveillance in Austria, 2003-2005. *Vet Microbiol*. 2007; 122(3-4): 237-245.

Ciccozzi M, Peletto S, Cella E, Giovanetti M, Lai A, Gabanelli E, Acutis PL, Modesto P, Rezza G, Platonov AE, Lo Presti A and Zehender G. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2. *Infect Genet Evol*. 2013; 17: 46-50.

Constant O, Gil P, Barthelemy J, Bollere K, Foulongne V, Desmetz C, Leblond A, Desjardins I, Pradier S, Joulie A, Sandoz A, Amaral R, Boisseau M, Rakotoarivony I, Baldet T, Marie A, Frances B, Reboul Salze F, Tinto B, Van de Perre P, Salinas S, Beck C, Lecollinet S, Gutierrez S and Simonin Y. 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): doi:10.2807/1560-7917.ES.2022.2827.2825.2200068.

Conze TM, Bago Z, Revilla-Fernandez S, Schlegel J, Goehring LS and Matiasek K. Tick-Borne Encephalitis Virus (TBEV) Infection in Two Horses. *Viruses.* 2021; 13(9): doi:10.3390/v13091775.

Cook CL, Huang YS, Lyons AC, Alto BW, Unlu I, Higgs S and Vanlandingham DL. North American *Culex pipiens* and *Culex quinquefasciatus* are competent vectors for Usutu virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018; 12(8): doi:10.1371/journal.pntd.0006732.

Curry P. SASKATCHEWAN MOSQUITOES AND WEST NILE VIRUS. *Blue Jay.* 2004; 62(2): 104-111.

Dai X, Shang G, Lu S, Yang J and Xu J. A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7(1): 74.

Dandawate CN, Rajagopalan PK, Pavri KM and Work TH. VIRUS ISOLATIONS FROM MOSQUITOES COLLECTED IN NORTH ARCOT DISTRICT, MADRAS STATE, AND CHITTOOR DISTRICT, ANDHRA PRADESH BETWEEN NOVEMBER 1955 AND OCTOBER 1957. *Indian J Med Res.* 1969; 57(8): 1420-1426.

de Heus P, Kolodziejek J, Hubalek Z, Dimmel K, Racher V, Nowotny N and Cavalleri JMV. West Nile Virus and Tick-Borne Encephalitis Virus Are Endemic in Equids in Eastern Austria. *Viruses.* 2021; 13(9): doi:10.3390/v13091873.

de Oliveira-Filho EF, Fischer C, Berneck BS, Carneiro IO, Kuhne A, de Almeida Campos AC, Ribas JRL, Netto EM, Franke CR, Ulbert S and Drexler JF. Ecologic Determinants of West Nile Virus Seroprevalence among Equids, Brazil. *Emerg Infect Dis.* 2021; 27(9): 2466-2470.

Debiasi RL and Tyler KL. West Nile virus meningoencephalitis. *Nat Clin Pract Neurol.* 2006; 2(5): 264-275.

DeGrootte JP, Sugumaran R, Brend SM, Tucker BJ and Bartholomay LC. Landscape, demographic, entomological, and climatic associations with human disease incidence of West Nile virus in the state of Iowa, USA. *Int J Health Geogr.* 2008; 7: doi:10.1186/1476-1072x-1187-1119.

Deubel V, Fiette L, Gounon P, Drouet MT, Khun H, Huerre M, Banet C, Malkinson M and Despres P. Variations in biological features of West Nile viruses. *Ann N Y Acad Sci.* 2001; 951: 195-206.

Deviatkin AA, Kholodilov IS, Vakulenko YA, Karganova GG and Lukashev AN. Tick-Borne Encephalitis Virus: An Emerging Ancient Zoonosis? *Viruses.* 2020; 12(2): doi:10.3390/v12020247.

Durand B, Chevalier V, Pouillot R, Labie J, Marendat I, Murgue B, Zeller H and Zientara S. West Nile virus outbreak in horses, southern France, 2000: results of a serosurvey. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(8): 777-782.

Durand B, Dauphin G, Zeller H, Labie J, Schuffenecker I, Murri S, Moutou F and Zientara S. Serosurvey for West Nile virus in horses in southern France. *Vet Rec.* 2005; 157(22): 711-713.

Ecker M, Allison SL, Meixner T and Heinz FX. Sequence analysis and genetic classification of tick-borne encephalitis viruses from Europe and Asia. *J Gen Virol.* 1999; 80: 179-185.

Epp T, Waldner C, Leighton FA, Berke O and Townsend HG. Seroprevalence and risk factors for infection with West Nile virus in Saskatchewan horses, 2003. *Can J Vet Res.* 2007a; 71(4): 256-263.

Epp T, Waldner C, West K and Townsend H. Factors associated with West Nile virus disease fatalities in horses. *Can Vet J.* 2007b; 48(11): 1137-1145.

Estrada-Pena A and de la Fuente J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. *Antiviral Res.* 2014; 108: 104-128.

Euringer K, Gisl P, Kaier K, Peilstocker J, Schmidt M, Muller-Steinhardt M, Rauscher B, Bressau E, Kern WV, Dobler G and Borde JP. Tick-borne encephalitis virus IgG antibody surveillance: vaccination- and infection-induced seroprevalences, south-western Germany, 2021. *Euro Surveill.* 2023; 28(12): doi:10.2807/1560-7917.ES.2023.2828.2812.2200408.

Europäisches Parlament. Verordnung (EU) 2016/429: Europäisches Parlament; 2016 (Stand: 2023 Feb 10). 2016: Verfügbar unter: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/DE/TXT/?uri=celex%3A32016R30429>.

European Centre for Disease Prevention and Control. Fact Sheet West Nile Virus, Case definition (Stand: 2023 Feb 10). 2021: Verfügbar unter: <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/facts>.

Fall G, Di Paola N, Faye M, Dia M, Freire CCD, Loucoubar C, Zanotto PMD, Faye O and Sall AA. Biological and phylogenetic characteristics of West African lineages of West Nile. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017; 11(11): doi:10.1371/journal.pntd.0006078.

Fall G, Diallo D, Soumaila H, Ndiaye E, Lagare A, Sadio BD, Ndione MHD, Wiley M, Dia M, Diop M, Ba A, Sidikou F, Ngoy BB, Faye O, Testa J, Loucoubar C, Sall AA, Diallo M and Faye O. First Detection of the West Nile Virus Koutango Lineage in Sandflies in Niger. *Pathogens.* 2021; 10(3): doi:10.3390/pathogens10030257.

Fall G, Diallo M, Loucoubar C, Faye O and Sall AA. Vector competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for lineages 1, 2, Koutango and a putative new lineage of West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2014; 90(4): 747-754.

Fang Y and Reisen WK. Previous infection with West Nile or St. Louis encephalitis viruses provides cross protection during reinfection in house finches. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75(3): 480-485.

Folly AJ, Waller ESL, McCracken F, McElhinney LM, Roberts H and Johnson N. Equine seroprevalence of West Nile virus antibodies in the UK in 2019. *Parasit Vectors.* 2020; 13(1): 596.

Fouche N, Oesch S, Ziegler U and Gerber V. Clinical Presentation and Laboratory Diagnostic Work-Up of a Horse with Tick-Borne Encephalitis in Switzerland. *Viruses.* 2021; 13(8): doi:10.3390/v13081474.

Friedrich Loeffler-Institut. Aktuelles Tierseuchengeschehen: Usutu Virus (Stand 2023 Jul 11). 2018: Verfügbar unter: <https://www.fli.de/de/aktuelles/tierseuchengeschehen/usutu-virus/#:~:text=In%20Deutschland%20sind%20bisher%20keine,%C23%96sterreich%22C%20Frankreich%20und%20Italien%20nach>.

Friedrich Loeffler-Institut. Amtliche Methode und Falldefinition: Infektion mit dem West-Nil-Virus bei einem Vogel oder einem Pferd (Stand 2023 Jul 6). 2022: Verfügbar unter: https://www.openagrar.de/servlets/MCRFileNodeServlet/openagrar_derivate_00025599/TS00025512e-Infektion-West-Nil-Virus-Vogel-Pferd-00022022-00025506-00025510-bf.pdf.

Gamino V and Hofle U. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: a review. *Vet Res.* 2013; 44(1): 39.

Ganzenberg S. Seroprävalenz und Risikofaktoren der West-Nil-Virus-Infektion bei Pferden in Mitteldeutschland [Dissertation med. vet]. Leipzig: Univ. Leipzig; 2022.

Ganzenberg S, Sieg M, Ziegler U, Pfeffer M, Vahlenkamp TW, Hörügel U, Groschup MH and Lohmann KL. Seroprevalence and Risk Factors for Equine West Nile Virus Infections in Eastern Germany, 2020. *Viruses.* 2022; 14(6): doi:10.3390/v14061191.

Garcia-Bocanegra I, Arenas-Montes A, Napp S, Jaen-Tellez JA, Fernandez-Morente M, Fernandez-Molera V and Arenas A. Seroprevalence and risk factors associated to West Nile virus in horses from Andalusia, Southern Spain. *Vet Microbiol.* 2012; 160(3-4): 341-346.

Garcia-Bocanegra I, Jaen-Tellez JA, Napp S, Arenas-Montes A, Fernandez-Morente M, Fernandez-Molera V and Arenas A. West Nile fever outbreak in horses and humans, Spain, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17(12): 2397-2399.

Garcia-Tapia D, Loiacono CM and Kleiboeker SB. Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 110(3-4): 229-244.

Gardner IA, Wong SJ, Ferraro GL, Balasuriya UB, Hullinger PJ, Wilson WD, Shi PY and MacLachlan NJ. Incidence and effects of West Nile virus infection in vaccinated and unvaccinated horses in California. *Vet Res.* 2007; 38(1): 109-116.

Girard YA, Klingler KA and Higgs S. West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2004; 4(2): 109-122.

Goddard LB. Vector competence of California mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Infect Dis.* 2002; 8(12): 1385-1391.

Gomez A, Kramer LD, Dupuis AP, 2nd, Kilpatrick AM, Davis LJ, Jones MJ, Daszak P and Aguirre AA. Experimental infection of eastern gray squirrels (*Sciurus carolinensis*) with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 79(3): 447-451.

Guerrero-Carvajal F, Bravo-Barriga D, Martin-Cuervo M, Aguilera-Sepulveda P, Ferraguti M, Jimenez-Clavero MA, Llorente F, Alonso JM and Frontera E. Serological evidence of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids from western Spain. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(3): 1432-1444.

Habarugira G, Moran J, Colmant AMG, Davis SS, O'Brien CA, Hall-Mendelin S, McMahon J, Hewitson G, Nair N, Barcelon J, Suen WW, Melville L, Hobson-Peters J, Hall RA, Isberg SR and Bielefeldt-Ohmann H. Mosquito-Independent Transmission of West Nile virus in Farmed Saltwater Crocodiles (*Crocodylus porosus*). *Viruses.* 2020a; 12(2): doi:10.3390/v12020198.

Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA and Bielefeldt-Ohmann H. West Nile Virus: An Update on Pathobiology, Epidemiology, Diagnostics, Control and "One Health" Implications. *Pathogens.* 2020b; 9(7): doi:10.3390/pathogens9070589.

Hayes EB. West Nile virus disease in children. *Pediatr Infect Dis J*. 2006; 25(11): 1065-1066.

Hayes EB and Gubler DJ. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States. *Annu Rev Med*. 2006; 57: 181-194.

Hesson JC, Schafer M and Lundstrom JO. First report on human-biting *Culex pipiens* in Sweden. *Parasit Vectors*. 2016; 9(1): 632.

Hinckley AF, O'Leary DR and Hayes EB. Transmission of West Nile virus through human breast milk seems to be rare. *Pediatrics*. 2007; 119(3): 666-671.

Holding M, Dowall SD, Medlock JM, Carter DP, McGinley L, Curran-French M, Pullan ST, Chamberlain J, Hansford KM, Baylis M, Vipond R and Hewson R. Detection of new endemic focus of tick-borne encephalitis virus (TBEV), Hampshire/Dorset border England, September 2019. *Euro Surveill*. 2019; 24(47): 7-11.

Holzmann H, Aberle SW, Stiasny K, Werner P, Mischak A, Zainer B, Netzer M, Koppi S, Bechter E and Heinz FX. Tick-borne encephalitis from eating goat cheese in a mountain region of Austria. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(10): 1671-1673.

Honig V, Palus M, Kaspar T, Zemanova M, Majerova K, Hofmannova L, Papezik P, Sikutova S, Rettich F, Hubalek Z, Rudolf I, Votypka J, Modry D and Ruzek D. Multiple Lineages of Usutu Virus (Flaviviridae, Flavivirus) in Blackbirds (*Turdus merula*) and Mosquitoes (*Culex pipiens*, *Cx. modestus*) in the Czech Republic (2016-2019). *Microorganisms*. 2019; 7(11): doi:10.3390/microorganisms7110568.

Huang CI, Kay SC, Davis S, Tufts DM, Gaffett K, Tefft B and Diuk-Wasser MA. High burdens of *Ixodes scapularis* larval ticks on white-tailed deer may limit Lyme disease risk in a low biodiversity setting. *Ticks Tick Borne Dis*. 2019; 10(2): 258-268.

Hubalek Z and Halouzka J. West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerg Infect Dis*. 1999; 5(5): 643-650.

Hubalek Z, Halouzka J, Juricova Z and Sebesta O. First isolation of mosquito-borne West Nile virus in the Czech Republic. *Acta Virologica*. 1998; 42(2): 119-120.

Imhoff M, Hagedorn P, Schulze Y, Hellenbrand W, Pfeffer M and Niedrig M. Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk. *Ticks Tick Borne Dis*. 2015; 6(5): 592-600.

Iwamoto M, Jernigan DB, Guasch A, Trepka MJ, Blackmore CG, Hellinger WC, Pham SM, Zaki S, Lanciotti RS, Lance-Parker SE, DiazGranados CA, Winquist AG, Perlino CA, Wiersma S, Hillyer KL, Goodman JL, Marfin AA, Chamberland ME, Petersen LR, Blake P, Bower W, Dowdy L, Fleming J, Guarner J, Jimenez J, Kuehnert M, Leguen F, Luu T, Mallon S, Moseley R, Nejman A, Page P, Pealer L, Qi XS, Rico E, Roehrig J, Rollin P, Salameh M, Shieh WJ, Tso P, Withum D and West Nile Virus Transplant R. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients. *N Engl J Med*. 2003; 348(22): 2196-2203.

Janitza-Futterer D. Serologische Untersuchungen zur endemischen Situation der Infektion mit dem FSME-Virus in einer südbadischen Pferde- und Hundepopulation [Dissertation med. vet.]. München: Ludwig-Maximilians-Univ. München; 2003.

Jansen S, Heitmann A, Luhken R, Leggewie M, Helms M, Badusche M, Rossini G, Schmidt-Chanasit J and Tannich E. *Culex torrentium*: A Potent Vector for the Transmission of West Nile Virus in Central Europe. *Viruses*. 2019; 11(6): doi:10.3390/v11060492.

Jimenez-Clavero MA, Llorente F, Sotelo E, Soriguer R, Gomez-Tejedor C and Figuerola J. West Nile virus serosurveillance in horses in Donana, Spain, 2005 to 2008. *Vet Rec*. 2010; 167(10): 379-380.

Johnson N, Wakeley PR, Mansfield KL, McCracken F, Haxton B, Phipps LP and Fooks AR. Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2010; 10(7): 665-671.

Johnson RT and Mims CA. Pathogenesis of Viral Infections of the Nervous System. *N Engl J Med*. 1968; 278(2): 84-92.

Kaiser R. Frühsommermeningoenzephalitis. *Nervenarzt*. 2016; 87(6): 667-678.

Kampen H, Tews BA and Werner D. First Evidence of West Nile Virus Overwintering in Mosquitoes in Germany. *Viruses*. 2021; 13(12): doi:10.3390/v13122463.

Kelley TW, Prayson RA, Ruiz AI, Isada CM and Gordon SM. The Neuropathology of West Nile Virus Meningoencephalitis: A Report of Two Cases and Review of the Literature. *Am J Clin Pathol*. 2003; 119(5): 749-753.

Kilpatrick AM, Kramer LD, Campbell SR, Alleyne EO, Dobson AP and Daszak P. West Nile virus risk assessment and the bridge vector paradigm. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(3): 425-429.

Kilpatrick AM, LaDeau SL and Marra PP. Ecology of west nile virus transmission and its impact on birds in the western hemisphere. *Auk*. 2007; 124(4): 1121-1136.

Kilpatrick AM, Meola MA, Moudy RM and Kramer LD. Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog*. 2008; 4(6): doi:10.1371/journal.ppat.1000092.

Klaus C, Horugel U, Hoffmann B and Beer M. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Vet Microbiol*. 2013; 163(3-4): 368-372.

Klenk K, Snow J, Morgan K, Bowen R, Stephens M, Foster F, Gordy P, Beckett S, Komar N, Gubler D and Bunning M. Alligators as West Nile virus amplifiers. *Emerg Infect Dis*. 2004; 10(12): 2150-2155.

Komar N, Langevin S, Hinten S, Nemeth N, Edwards E, Hettler D, Davis B, Bowen R and Bunning M. Experimental infection of North American birds with the New York 1999 strain of West Nile virus. *Emerg Infect Dis*. 2003; 9(3): 311-322.

Korsten C, Al-Hosary AA, Holicki CM, Schafer M, Tews BA, Vasic A, Ziegler U, Groschup MH and Silaghi C. Simultaneous Coinfections with West Nile Virus and Usutu Virus in *Culex pipiens* and *Aedes vexans* Mosquitoes. *Transbound Emerg Dis*. 2023; 2023: doi:10.1155/2023/6305484.

Kramer LD, Li J and Shi P-Y. West Nile virus. *Lancet Neurol*. 2007; 6(2): 171-181.

Kutasi O, Bakonyi T, Lecollinet S, Biksi I, Ferenczi E, Bahuon C, Sardi S, Zientara S and Szenci O. Equine Encephalomyelitis Outbreak Caused by a Genetic Lineage 2 West Nile Virus in Hungary. *J Vet Intern Med.* 2011; 25(3): 586-591.

Lanciotti RS, Ebel GD, Deubel V, Kerst AJ, Murri S, Meyer R, Bowen M, McKinney N, Morrill WE, Crabtree MB, Kramer LD and Roehrig JT. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology.* 2002; 298(1): 96-105.

Landesman WJ, Allan BF, Langerhans RB, Knight TM and Chase JM. Inter-annual associations between precipitation and human incidence of West Nile virus in the United States. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(3): 337-343.

Lang L. The Food and Drug Administration approves second West Nile virus screening test for donated blood and organs. *Gastroenterology.* 2007; 133(5): 1402.

Leblond A, Hendriks P and Sabatier P. West Nile virus outbreak detection using syndromic monitoring in horses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007; 7(3): 403-410.

Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, Touzain F, Lucas P, Eraud C, Bahuon C, Zientara S, Beck C and Decors A. Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerg Infect Dis.* 2016; 22(12): 2225.

Lelli R. West Nile virus in Europe: understanding the present to gauge the future. *Euro Surveill.* 2010; 15(15): doi:10.2807/ese.2815.2815.19538-en.

Lim PY, Behr MJ, Chadwick CM, Shi PY and Bernard KA. Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo. *J of Virol.* 2011; 85(10): 5197-5201.

Lindquist L and Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *Lancet.* 2008; 371(9627): 1861-1871.

Lipowski D, Popiel M, Perlejewski K, Nakamura S, Bukowska-Osko I, Rzedkiewicz E, Dzieciatkowski T, Milecka A, Wenski W, Ciszek M, Debska-Slizien A, Ignacak E, Cortes KC, Pawelczyk A, Horban A, Radkowski M and Laskus T. A Cluster of Fatal Tick-borne Encephalitis Virus Infection in Organ Transplant Setting. *J Infect Dis.* 2017; 215(6): 896-901.

Lohmann KL, Sieg M, Landmann M, Ganzenberg S, Arnold C, Vahlenkamp T and Ulrich RG. West-Nil-Virus-Infektion bei 12 Pferden in Mitteldeutschland. *Tierarztl Prax Ausg G Grosstiere Nutztiere.* 2022; 50(06): 362-376.

Lu Z, Fu SH, Cao L, Tang CJ, Zhang S, Li ZX, Tusong M, Yao XH, Zhang HL, Wang PY, Wumaier M, Yuan XY, Li MH, Zhu CZ, Fu LP and Liang GD. Human Infection with West Nile Virus, Xinjiang, China, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(8): 1421-1423.

Lupulovic D, Martin-Acebes MA, Lazic S, Alonso-Padilla J, Blazquez AB, Escribano-Romero E, Petrovic T and Saiz JC. First serological evidence of West Nile virus activity in horses in Serbia. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(9): 1303-1305.

Lvov DK, Butenko AM, Gromashevsky VL, Kovtunov AI, Prilipov AG, Kinney R, Aristova VA, Dzharkenov AF, Samokhvalov EI, Savage HM, Shchelkanov MY, Galkina IV, Deryabin PG, Gubler DJ, Kulikova LN, Alkhovskiy SK, Moskvina TM, Zlobina LV, Sadykova GK, Shatalov AG, Lvov DN, Usachev VE

and Voronina AG. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations. *Arch Virol.* 2004(18): 85-96.

Mackenzie JS, Lindsay MD, Coelen RJ, Broom AK, Hall RA and Smith DW. ARBOVIRUSES CAUSING HUMAN-DISEASE IN THE AUSTRALASIAN ZOOGEOGRAPHIC REGION. *Arch Virol.* 1994; 136(3-4): 447-467.

Madic J, Savini G, Di Gennaro A, Monaco F, Jukic B, Kovac S, Rudan N and Listes E. Serological evidence for West Nile virus infection in horses in Croatia. *Vet Rec.* 2007; 160(22): 772-773.

Malkinson M, Banet C, Weisman Y, Pokamunski S, King R, Drouet MT and Deubel V. Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis.* 2002; 8(4): 392-397.

Mangana-Vougiouka O, Boutsini S, Ntousi D, Patakakis M, Orfanou E, Zafiropoulou K, Dilaveris D, Panagiotatos D and Nomikou K. Epizootiological investigation of the most important infectious equine diseases in Greece. *Bull Off Int Epizoot.* 2013; 32(3): 775-787.

Mann RA, Fegan M, O'Riley K, Motha J and Warner S. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Murray Valley encephalitis virus and West Nile virus (Kunjin subtype) from an arbovirus disease outbreak in horses in Victoria, Australia, in 2011. *J Vet Diagn Invest.* 2013; 25(1): 35-44.

Maquart M, Dahmani M, Marie JL, Gravier P, Leparc-Goffart I and Davoust B. First Serological Evidence of West Nile Virus in Horses and Dogs from Corsica Island, France. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2017; 17(4): 275-277.

Mburu MM, Zembere K, Mzilahowa T, Terlouw AD, Malenga T, van den Berg H, Takken W and McCann RS. Impact of cattle on the abundance of indoor and outdoor resting malaria vectors in southern Malawi. *Malar J.* 2021; 20(1): doi:10.1186/s12936-12021-03885-x.

Meister T, Lussy H, Bakonyi T, Sikutova S, Rudolf I, Vogl W, Winkler H, Frey H, Hubalek Z, Nowotny N and Weissenboeck H. Serological evidence of continuing high Usutu virus (Flaviviridae) activity and establishment of herd immunity in wild birds in Austria. *Vet Microbiol.* 2008; 127(3-4): 237-248.

Metz MBC, Olufemi OT, Daly JM and Barba M. Systematic review and meta-analysis of seroprevalence studies of West Nile virus in equids in Europe between 2001 and 2018. *Transbound Emerg Dis.* 2021; 68(4): 1814-1823.

Miller DL, Mauel MJ, Baldwin C, Burtle G, Ingram D, Hines ME and Frazier KS. West Nile virus in farmed alligators. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9(7): 794-799.

Mostashari F, Bunning ML, Kitsutani PT, Singer DA, Nash D, Cooper MJ, Katz N, Liljebjelke KA, Biggerstaff BJ, Fine AD, Layton MC, Mullin SM, Johnson AJ, Martin DA, Hayes EB and Campbell GL. Epidemic West Nile encephalitis, New York, 1999: results of a household-based seroepidemiological survey. *Lancet.* 2001; 358(9278): 261-264.

Müller K, König M, Thiel H J. Die tick-borne Enzephalitis (TBE) unter besonderer Berücksichtigung der Infektion beim Pferd. *Tieraerztl. Wochenschr.* 2006; 113(4): 147-151.

Müller K. Untersuchung zum Vorkommen von Antikörpern gegen das "Tick Borne Encephalitis Virus" (TBEV) beim Pferd im Endemiegebiet Marburg-Biedenkopf [Dissertation med. vet]. Giessen: Justus-Liebig-Univ. Giessen; 2006.

Murgue B, Murri S, Zientara S, Durand B, Durand JP and Zeller H. West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(4): 692-696.

Napp S, Llorente F, Beck C, Jose-Cunilleras E, Soler M, Pailler-Garcia L, Amaral R, Aguilera-Sepulveda P, Pifarre M, Molina-Lopez R, Obon E, Nicolas O, Lecollinet S, Jimenez-Clavero MA and Busquets N. Widespread Circulation of Flaviviruses in Horses and Birds in Northeastern Spain (Catalonia) between 2010 and 2019. *Viruses.* 2021; 13(12): doi:10.3390/v13122404.

Nash D, Mostashari F, Fine A, Miller J, O'Leary D, Murray K, Huang A, Rosenberg A, Greenberg A, Sherman M, Wong S, Layton M and West Nile Outbreak Response Working G. The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *N Engl J Med.* 2001; 344(24): 1807-1814.

Niczyporuk JS, Samorek-Salamonowicz E, Lecollinet S, Pancewicz SA, Kozdrun W and Czekaj H. Occurrence of West Nile Virus Antibodies in Wild Birds, Horses, and Humans in Poland. *Biomed Res Int.* 2015: doi:10.1155/2015/234181.

Niedersaechsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit. West-Nil-Virus, Informationen für Pferdehalter (Stand 31.08.2023), Verfügbar unter: [tierseucheninfo.niedersachsen.de/startseite/anzeigepflichtige_tierseuchen/pferde/west_nil_fieber/west-nil-fieber-21711.html](https://www.tierseucheninfo.niedersachsen.de/startseite/anzeigepflichtige_tierseuchen/pferde/west_nil_fieber/west-nil-fieber-21711.html). 2021.

Nielsen CF, Reisen WK, Armijos MV, MacLachlan NJ and Scott TW. High subclinical West Nile virus incidence among nonvaccinated horses in Northern California associated with low vector abundance and infection. *Am J Trop Med Hyg.* 2008; 78(1): 45-52.

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(10): 609-618.

Nikolay B, Fall G, Boye CS, Sall AA and Skern T. Validation of a structural comparison of the antigenic characteristics of Usutu virus and West Nile virus envelope proteins. *Virus Res.* 2014; 189: 87-91.

Nuttall PA. Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten. 2. Abteilung.* 1999; 289(5-7): 492-505.

Olufemi OT, Barba M and Daly JM. A Scoping Review of West Nile Virus Seroprevalence Studies among African Equids. *Pathogens.* 2021; 10(7): doi:10.3390/pathogens10070899.

Orshan L, Bin H, Schnur H, Kaufman A, Valinsky A, Shulman L, Weiss L, Mendelson E and Perner H. Mosquito vectors of West Nile Fever in Israel. *J Med Entomol.* 2008; 45(5): 939-947.

Ostlund EN, Crom RL, Pedersen DD, Johnson DJ, Williams WO and Schmitt BJ. Equine West Nile encephalitis, United States. *Emerg Infect Dis.* 2001; 7(4): 665-669.

Pachler K, Lebl K, Berer D, Rudolf I, Hubalek Z and Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20(12): 2119-2122.

Paramasivan R, Mishra AC and Mourya DT. West Nile virus: the Indian scenario. *Indian J Med Res.* 2003; 118: 101-108.

Paternoster G, Martins SB, Mattivi A, Cagarelli R, Angelini P, Bellini R, Santi A, Galletti G, Pupella S, Marano G, Copello F, Rushton J, Stark KDC and Tamba M. Economics of One Health: Costs and

benefits of integrated West Nile virus surveillance in Emilia-Romagna. *PLoS One*. 2017; 12(11): doi:10.1371/journal.pone.0188156.

Pauli G, Bauerfeind U, Blumel J, Burger R, Drosten C, Groner A, Gurtler L, Heiden M, Hildebrandt M, Jansen B, Offergeld R, Seitz R, Schlenkrich U, Schottstedt V, Strobel J and Willkommen H. Usutu virus. *Transfus Med Hemother*. 2014; 41(1): 73-82.

Pautienius A, Armonaite A, Simkute E, Zagrabaskaite R, Buitkuviene J, Alpizar-Jara R, Grigas J, Zakiene I, Zienius D, Salomskas A and Stankevicius A. Cross-Sectional Study on the Prevalence and Factors Influencing Occurrence of Tick-Borne Encephalitis in Horses in Lithuania. *Pathogens*. 2021; 10(2): doi:10.3390/pathogens10020140.

Pealer LN, Marfin AA, Petersen LR, Lanciotti RS, Page PL, Stramer SL, Stobierski MG, Signs K, Newman B, Kapoor H, Goodman JL, Chamberland ME and Investig WNV. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the United States in 2002. *N Engl J Med*. 2003; 349(13): 1236-1245.

Pecorari M, Longo G, Gennari W, Grottole A, Sabbatini AM, Tagliazucchi S, Savini G, Monaco F, Simone ML, Lelli R and Rumpianesi F. FIRST HUMAN CASE OF USUTU VIRUS NEUROINVASIVE INFECTION, ITALY, AUGUST-SEPTEMBER 2009. *Euro Surveill*. 2009; 14(50): 15-16.

Percivalle E, Cassaniti I, Sarasini A, Rovida F, Adzasehoun KMG, Colombini I, Isernia P, Cuppari I and Baldanti F. 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): doi:10.3390/v12020157.

Pietsch C, Michalski D, Munch J, Petros S, Bergs S, Trawinski H, Lubbert C and Liebert UG. Autochthonous West Nile virus infection outbreak in humans, Leipzig, Germany, August to September 2020. *Euro Surveill*. 2020; 25(46): doi:10.2807/1560-7917.ES.2020.2825.2846.2001786.

Platt KB, Tucker BJ, Halbur PG, Blitvich BJ, Fabiosa FG, Mullin K, Parikh GR, Kitikoon P, Bartholomay LC and Rowley WA. Fox squirrels (*Sciurus niger*) develop West Nile virus viremias sufficient for infecting select mosquito species. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 8(2): 225-233.

Platt KB, Tucker BJ, Halbur PG, Tiawsirisup S, Blitvich BJ, Fabiosa FG, Bartholomay LC and Rowley WA. West Nile virus viremia in eastern chipmunks (*Tamias striatus*) sufficient for infecting different mosquitoes. *Emerg Infect Dis*. 2007; 13(6): 831-837.

Poidinger M, Hall RA and Mackenzie JS. Molecular characterization of the Japanese encephalitis serocomplex of the flavivirus genus. *Virology*. 1996; 218(2): 417-421.

Porter MB, Long MT, Getman LM, Giguere S, MacKay RJ, Lester GD, Alleman AR, Wamsley HL, Franklin RP, Jacks S, Buergelt CD and Detrisac CJ. West Nile virus encephalomyelitis in horses: 46 cases (2001). *J Am Vet Med Assoc*. 2003; 222(9): 1241-1247.

Promed Posts. ISfid, WEST NILE Virus (51): EUROPE (GERMANY) ECDC UPDATE. Archive Number 20181006.6074497 (Stand: 26.06.2023). 2018: Verfügbar unter: <https://promedmail.org/promed-posts/20181006.26074497>.

Ransohoff RM, Kivisakk P and Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2003; 3(7): 569-581.

Reisen WK, Fang Y and Martinez VM. Effects of temperature on the transmission of west nile virus by *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*. 2006; 43(2): 309-317.

Rexhepi A, Sherifi K, Berxholi K, Xhekaj B, Muja-Bajraktari N, Ozkul A, von Possel R and Emmerich P. First Serological Evidence of West Nile Virus Among Equines and Birds in Kosovo, 2018-2019. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2021; 21(2): 116-120.

Robert Koch-Institut. Falldefinitionen des Robert Koch-Instituts zur Übermittlung von Erkrankungs- oder Todesfällen und Nachweisen von Krankheitserregern. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* 2019; 59(6): 818.

Robert Koch-Institut. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. *Epid Bull.* 2023a; 9/2023: 7.

Robert Koch-Institut. Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health. *Epid Bull.* 2023b; 22/2023: 4.

Rodhain F, Petter JJ, Albignac R, Coulanges P and Hannoun C. ARBOVIRUSES AND LEMURS IN MADAGASCAR - EXPERIMENTAL-INFECTION OF LEMUR-FULVUS WITH YELLOW-FEVER AND WEST NILE VIRUSES. *Am J Trop Med Hyg.* 1985; 34(4): 816-822.

Root JJ, Bentler KT, Nemeth NM, Gidlewski T, Spraker TR and Franklin AB. Experimental infection of raccoons (*Procyon lotor*) with West Nile virus. *Am J Trop Med Hyg.* 2010; 83(4): 803-807.

Rushton JO, Lecollinet S, Hubalek Z, Svobodova P, Lussy H and Nowotny N. Tick-borne Encephalitis Virus in Horses, Austria, 2011. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19(4): 635-637.

Salazar P, Traub-Dargatz JL, Morley PS, Wilmot DD, Steffen DJ, Cunningham WE and Salman MD. Outcome of equids with clinical signs of West Nile virus infection and factors associated with death. *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 225(2): 267-274.

Samuel MA and Diamond MS. Pathogenesis of West Nile virus infection: a balance between virulence, innate and adaptive immunity, and viral evasion. *J Virol.* 2006; 80(19): 9349-9360.

Samuel MA, Wang H, Siddharthan V, Morrey JD and Diamond MS. Axonal transport mediates West Nile virus entry into the central nervous system and induces acute flaccid paralysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(43): 17140-17145.

Santini M, Vilibic-Cavlek T, Barsic B, Barbic L, Savic V, Stevanovic V, Listes E, Di Gennaro A and Savini G. First cases of human Usutu virus neuroinvasive infection in Croatia, August-September 2013: clinical and laboratory features. *J Neurovirol.* 2015; 21(1): 92-97.

Santos PD, Michel F, Wylezich C, Hoper D, Keller M, Holicki CM, Szentiks CA, Eiden M, Muluneh A, Neubauer-Juric A, Thalheim S, Globig A, Beer M, Groschup MH and Ziegler U. Co-infections: Simultaneous detections of West Nile virus and Usutu virus in birds from Germany. *Transbound Emerg Dis.* 2021: doi:10.1111/tbed.14050.

Sauer FG, Timmermann E, Lange U, Luhken R and Kiel E. Effects of Hibernation Site, Temperature, and Humidity on the Abundance and Survival of Overwintering *Culex pipiens pipiens* and *Anopheles messeae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2022; 59(6): 2013-2021.

Savage HM. Entomologic and avian investigations of an epidemic of West Nile fever in Romania in 1996, with serologic and molecular characterization of a virus isolate from mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61 (4): 600-611.

Schuler LA, Khaitsa ML, Dyer NW and Stoltenow CL. Evaluation of an outbreak of West Nile virus infection in horses: 569 cases (2002). *J Am Vet Med Assoc.* 2004; 225(7): 1084-1089.

Selim A, Megahed A, Kandeel S, Alouffi A and Almutairi MM. West Nile virus seroprevalence and associated risk factors among horses in Egypt. *Sci Rep.* 2021; 11(1): doi:10.1038/s41598-41021-00449-41596.

Sikutova S, Hornok S, Hubalek Z, Dolezalkova I, Juricova Z and Rudolf I. Serological survey of domestic animals for tick-borne encephalitis and Bhanja viruses in northeastern Hungary. *Vet Microbiol.* 2009; 135(3-4): 267-271.

Simonin Y, Sillam O, Carles MJ, Gutierrez S, Gil P, Constant O, Martin MF, Girard G, Van de Perre P, Salinas S, Leparc-Goffart I and Foulongne V. Human Usutu Virus Infection with Atypical Neurologic Presentation, Montpellier, France, 2016. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24(5): 875-878.

Soverow JE, Wellenius GA, Fisman DN and Mittleman MA. Infectious Disease in a Warming World: How Weather Influenced West Nile Virus in the United States (2001-2005). *Environ Health Perspect.* 2009; 117(7): 1049-1052.

Styer LM, Bernard KA and Kramer LD. Enhanced early West Nile virus infection in young chickens infected by mosquito bite: Effect of viral dose. *Am J Trop Med Hyg.* 2006; 75(2): 337-345.

Sule WF, Oluwayelu DO, Hernandez-Triana LM, Fooks AR, Venter M and Johnson N. Epidemiology and ecology of West Nile virus in sub-Saharan Africa. *Parasit Vectors.* 2018; 11(1): 414.

Swaddle JP and Calos SE. Increased Avian Diversity Is Associated with Lower Incidence of Human West Nile Infection: Observation of the Dilution Effect. *PLoS One.* 2008; 3(6): doi:10.1371/journal.pone.0002488.

Taylor RM, Work TH, Hurlbut HS and Rizk F. A STUDY OF THE ECOLOGY OF WEST NILE VIRUS IN EGYPT. *Am J Trop Med Hyg.* 1956; 5(4): 579-620.

Tiawsirisup S, Platt KB, Tucker BJ and Rowley WA. Eastern cottontail rabbits (*Sylvilagus floridanus*) develop West Nile virus viremia sufficient for infecting select mosquito species. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2005; 5(4): 342-350.

Tonteri E, Kipar A, Voutilainen L, Vene S, Vaheri A, Vapalahti O and Lundkvist A. The three subtypes of tick-borne encephalitis virus induce encephalitis in a natural host, the bank vole (*Myodes glareolus*). *PLoS One.* 2013; 8(12): doi: 10.1371/journal.pone.0081214.

Turell MJ, Dohm DJ, Sardelis MR, Oguinn ML, Andreadis TG and Blow JA. An update on the potential of north American mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile Virus. *J Med Entomol.* 2005; 42(1): 57-62.

Ulloa A, Ferguson HH, Mendez-Sanchez JD, Danis-Lozano R, Casas-Martinez M, Bond JG, Garcia-Zebadua JC, Orozco-Bonilla A, Juarez-Ordaz JA, Farfan-Ale JA, Garcia-Rejon JE, Rosado-Paredes EP, Edwards E, Komar N, Hassan HK, Unnasch TR and Rodriguez-Perez MA. West Nile Virus Activity in Mosquitoes and Domestic Animals in Chiapas, Mexico. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2009; 9(5): 555-560.

van der Meulen KM, Pensaert MB and Nauwynck HJ. West Nile virus in the vertebrate world. *Arch Virol.* 2005; 150(4): 637-657.

Vazquez A, Sanchez-Seco MP, Ruiz S, Molero F, Hernandez L, Moreno J, Magallanes A, Tejedor CG and Tenorio A. Putative New Lineage of West Nile Virus, Spain. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16(3): 549-552.

Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, Klobucar A, Mrzljak A, Ilic M, Bogdanic M, Benvin I, Santini M, Capak K, Monaco F, Listes E and Savini G. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens.* 2020; 9(9): doi:10.3390/pathogens9090699.

Vogels CBF, Goertz GP, Pijlman GP and Koenraadt CJM. Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. *Emerg Microbes Infect.* 2017; 6: doi:10.1038/emi.2017.1082.

Waldvogel A. Zeckenenzephalitis beim Pferd. *Schweiz. Arch. Tierheilk.* 1981; 123: 227-233.

Wang T, Town T, Alexopoulou L, Anderson JF, Fikrig E and Flavell RA. Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat Med.* 2004; 10(12): 1366-1373.

Ward MP, Schuermann JA, Highfield LD and Murray KO. Characteristics of an outbreak of West Nile virus encephalomyelitis in a previously uninfected population of horses. *Vet Microbiol.* 2006; 118(3-4): 255-259.

Weese JS, Baird JD, DeLay J, Kenney DG, Staempfli HR, Viel L, Parent J, Smith-Maxie L and Poma R. West Nile virus encephalomyelitis in horses in Ontario: 28 cases. *Can Vet J.* 2003; 44(6): 469-473.

Weissenböck H, Hubalek Z, Halouzka J, Pichlmair A, Maderner A, Fragner K, Kolodziejek J, Loupal G, Kolbl S and Nowotny N. Screening for West Nile virus infections of susceptible animal species in Austria. *Epidemiol Infect.* 2003; 131(2): 1023-1027.

Weissenböck H, Kolodziejek J, Url A, Lussy H, Rebel-Bauder B and 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): 652-656.

Williams MC, Knight EM, Haddow AJ and Simpson DIH. Isolation of West Nile Virus from Man + of Usutu Virus from Bird-Biting Mosquito *Mansonia Aurites* (Theobald) in Entebbe Area of Uganda. *Ann Trop Med Parasitol.* 1964; 58(3): 367-374.

WOAH. World Organisation for Animal Health: Chapter 8.20 West Nile Fever (Stand: 10.02. 2023). 2021: Verfügbar unter: https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=161&htmlfile=chaptre_wnf.htm.

Wolf RF, Papin JF, Hines-Boykin R, Chavez-Suarez M, White GL, Sakalian M and Dittmer DP. Baboon model for West Nile virus infection and vaccine evaluation. *Virology.* 2006; 355(1): 44-51.

Wondim MA, Czupryna P, Pancewicz S, Kruszewska E, Groth M and Moniuszko-Malinowska A. Epidemiological Trends of Trans-Boundary Tick-Borne Encephalitis in Europe, 2000-2019. *Pathogens.* 2022; 11(6): doi:10.3390/pathogens11060704.

Zannoli S and Sambri V. West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms.* 2019; 7(7): doi:10.3390/microorganisms7070184.

Ziegler U, Angenvoort J, Klaus C, Nagel-Kohl U, Sauerwald C, Thalheim S, Horner S, Braun B, Kenklies S, Tyczka J, Keller M and Groschup MH. Use of competition ELISA for monitoring of West Nile virus infections in horses in Germany. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(8): 3112-3120.

Ziegler U, Jost H, Muller K, Fischer D, Rinder M, Tietze DT, Danner KJ, Becker N, Skuballa J, Hamann HP, Bosch S, Fast C, Eiden M, Schmidt-Chanasit J and Groschup MH. Epidemic Spread of Usutu Virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and Monitoring of Wild Birds for Usutu and West Nile Viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2015; 15(8): 481-488.

Ziegler U, Luhken R, Keller M, Cadar D, van der Grinten E, Michel F, Albrecht K, Eiden M, Rinder M, Lachmann L, Hoper D, Vina-Rodriguez A, Gaede W, Pohl A, Schmidt-Chanasit J and Groschup MH. West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Res*. 2019; 162: 39-43.

Ziegler U, Santos PD, Groschup MH, Hattendorf C, Eiden M, Hoper D, Eisermann P, Keller M, Michel F, Klopffleisch R, Muller K, Werner D, Kampen H, Beer M, Frank C, Lachmann R, Tews BA, Wylezich C, Rinder M, Lachmann L, Grunewald T, Szentiks CA, Sieg M, Schmidt-Chanasit J, Cadar D and Luhken R. West Nile Virus Epidemic in Germany Triggered by Epizootic Emergence, 2019. *Viruses*. 2020; 12(4): doi:10.3390/v12040448.

Ziegler U, Seidowski D, Angenvoort J, Eiden M, Muller K, Nowotny N and Groschup MH. Monitoring of West Nile virus infections in Germany. *Zoonoses Public Health*. 2012; 59 Suppl 2: 95-101.

Zou SMA, Foster GA, Dodd RY, Petersen LR and Stramer SL. West Nile Fever Characteristics among Viremic Persons Identified through Blood Donor Screening. *J Infect Dis*. 2010; 202(9): 1354-1361.

8 Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei meinen beiden „Doktoreltern“ Martin Pfeffer und Katharina Lohmann bedanken, die mir bei Problemen stets mit Rat und Tat zur Seite standen und mich mit viel Geduld auch in den intensiven Abschnitten des Projekts unterstützten.

Meiner Betreuerin Anna Obiegala kommt ebenso meine tiefe Dankbarkeit zu. Ihre Ratschläge und Anregungen gepaart mit großer Geduld machten diese Arbeit möglich.

Dieses Projekt wurde weiterhin nur möglich durch die Zusammenarbeit vieler Institutionen als Teilprojekt „Epidemiologie und Risikofaktoren für die West-Nil-Virus-Infektion“ (ERWIN) des Verbundvorhabens „Prävalenz von WNV-Infektionen bei Stechmücken und Säugetieren in endemisch-betroffenen ländlichen und urbanen Gebieten in Deutschland - mögliche Immunprophylaxen bei Pferden“ (WISSDIP) des Forschungsnetzes Zoonosen. Somit geht mein Dank an alle Beteiligten des Verbundvorhabens sowie Boehringer Ingelheim für die finanzielle Ermöglichung dieses Projekts.

Ein ebenso großes Dankeschön möchte ich auch Stefanie Ganzenberg zukommen lassen. Ohne ihre hilfreichen Ratschläge und bereitwillige, kollegiale Unterstützung wäre das Projekt nicht in diesem Tempo vorangekommen.

Natürlich wäre diese Arbeit auch nicht ohne die bereitwillige Hilfe der Tierseuchenkassen aus Sachsen-Anhalt und Sachsen sowie des LAVG Brandenburgs und der Unterstützung der örtlichen Veterinärämter in Elbe-Elster, Dahme-Spreewald und Potsdam-Mittelmark zustande gekommen, die sich durch die Organisation der Versendung der Einladungsschreiben an die Pferdebesitzer in dieser Studie verdient gemacht haben. An dieser Stelle sei ebenfalls allen engagierten Pferdehalterinnen und Pferdehaltern gedankt, die sich dafür entschieden haben, Teil dieser Arbeit zu werden und die unverzichtbare Grundlage bildeten, auf welcher dieses Projekt steht.

Im Labor der Tierhygiene geht mein größter Dank an Dana Rüster und Evelin Brumme, die mich tatkräftig in der Bearbeitung der Proben unterstützten und die ich als meine Lehrmeisterinnen in allen praktischen Laborfragen betrachte. Auch vielen Dank an Vicky Eichner, die mich in allen organisatorischen Fragen und bei der Navigation durch die Stromschnellen des Verwaltungsapparates der Universität Leipzig stets tatkräftig unterstützte.

Ebenfalls danken, für die exzellente Betreuung und für das zur Verfügung stellen der Laboreinrichtungen bei der Durchführung der cELISA Tests, möchte ich dem gesamten Institut für Virologie der Veterinärmedizinischen Fakultät Leipzig. Gleichfalls bin ich Frau Dr. Ute Ziegler und ihrer Arbeitsgruppe am FLI für die Durchführung der Serumneutralisationstest und die harmonische Zusammenarbeit in tiefer Dankbarkeit verbunden.

Persönlich möchte ich auch meiner Familie danken, die mich über die gesamte Zeit maßgeblich unterstützt hat. Besonders natürlich meiner Frau Julia, die mir neben ihrer eigenen Forschungstätigkeit stets mit Geduld und Besonnenheit zur Seite stand. Meinen Eltern und meinem Bruder für ihr reges Interesse an meiner Arbeit. Und letztlich meinem Sohn, der durch seine näher rückende Geburt das Fertigstellen dieser Dissertation deutlich beschleunigte.