



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap

# **Förekomst av antikroppar mot Sindbis och flavivirus hos hästar i Sverige**

**Occurrence of antibodies against Sindbis and flaviviruses  
in horses in Sweden**

*Agnes Björnström*

*Uppsala*

*2020*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*



# Förekomst av antikroppar mot Sindbis och flavivirus hos hästar i Sverige

## Occurrence of antibodies against Sindbis and flaviviruses in horses in Sweden

*Agnes Björnström*

**Handledare:** Anne-Lie Blomström, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap

**Biträdande handledare:** Jenny Hesson, Institutionen för medicinsk biokemi och mikrobiologi, Uppsala universitet

**Examinator:** Johanna Lindahl, Institutionen för kliniska vetenskaper

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

**Nivå och fördjupning:** Avancerad nivå, A2E

**Kurskod:** EX0869

**Kursansvarig institution:** Institutionen för kliniska vetenskaper

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2020

**Elektronisk publicering:** <https://stud.epsilon.slu.se>

**Nyckelord:** Sindbisvirus, Tick-borne encephalitis virus, West Nile virus, Usutu virus, häst, fåglar, myggor

**Key words:** Sindbis virus, Tick-borne encephalitis virus, West Nile virus, Usutu virus, horse, birds, mosquitoes

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## SAMMANFATTNING

Sindbisvirus (SINV) är ett positivt enkelsträngat RNA virus tillhörande genus *Alfavirus* inom familjen *Togaviridae*. SINV finns i många delar av världen och orsakar sjukdom hos människor i bland annat Sverige, Finland och Ryssland. I Sydafrika har viruset även kopplats samman med sjukdom hos hästar. SINV cirkulerar i en enzootisk cykel mellan fåglar och myggor och i Sverige finns viruset endemiskt i myggpopulationen i de centrala delarna av Sverige. Eventuell förekomst och sjukdomsbild hos hästar i Sverige är dock okänd. Huvudsyftet med studien var därför att undersöka förekomst av antikroppar mot SINV hos hästar i Sverige. I studien undersöktes även förekomst av antikroppar hos häst mot tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV) och Usutu virus (USUV) vilka är virus tillhörande genus *Flavivirus* inom familjen *Flaviviridae*. TBEV finns i Sverige men seroprevalens och eventuell sjukdomsbild hos hästar är okänd. WNV och USUV har ännu inte rapporterats hos hästar i Sverige men antikroppar mot dessa virus har hittats hos hästar i flera länder i Europa.

Provmaterialet som består av hästserum är insamlat från klinisk kemiska laboratoriet på universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges lantbruksuniversitet under perioden april-augusti. Proverna kommer antingen från patienter på hästkliniken på UDS eller är inskickade från veterinärer runtom i landet. Totalt samlades 651 prover in och av dessa analyserades 633 för SINV E1, 187 för SINV E2 samt 614 för TBEV, WNV och USUV. Det som undersöktes var förekomst av IgG antikroppar. Proverna analyserades i en suspension multiplex immunoassay (SMIA) och resultatet från denna erhöles sedan genom analys i ett Luminex-Magpix instrument.

Utifrån de cut-off värden som beräknades var totalt 78 prover SMIA positiva för SINV vilket motsvarar 12 % av antalet analyserade prover, 216 prover var SMIA positiva för TBEV vilket motsvarar 35 % av antalet analyserade prover. För WNV och USUV var 73 respektive 24 prover SMIA positiva vilket motsvarar 12 % respektive 4 % av antalet analyserade prover. De insamlade proverna grupperades efter län och hade en spridning från Norrbottens län i norr till Skåne län i söder. SMIA positiva prover för SINV och TBEV kom från 17 olika län och för WNV och USUV-positiva kom proverna från 11 respektive 10 olika län. Positiva SMIA prover fanns för samtliga virus från alla månader prover samlats in.

Resultatet i denna studie visar att hästar från många delar av Sverige eventuellt utsatts för SINV infektion vilket är av intresse då detta tidigare endast rapporterats från Sydafrika. Resultatet visar även att hästar i Sverige eventuellt utsatts för infektion med TBEV, WNV och USUV då det fanns SMIA positiva prover även för dessa virus. Dessa resultat är dock ganska osäkra, särskilt de för WNV och USUV, och behöver konfirmeras med ett plaque reduction neutralization test (PRNT) för påvisande av neutraliserande antikroppar för respektive virus. Om positiva prover hittas även med PRNT är det även av intresse att samla in information om eventuella symtom som de berörda hästarna har uppvisat för de olika virusen.

## SUMMARY

Sindbis virus (SINV) is a positive single-stranded RNA virus belonging to the genus *Alfavirus* in the family *Togaviridae*. SINV is found in many parts of the world and causes illness in people in Sweden, Finland and Russia, amongst other countries. In South Africa, the virus has also been linked to disease in horses. SINV circulates in an enzootic cycle between birds and mosquitoes and in Sweden the virus is endemic in the mosquito population in the central parts of Sweden. However, possible incidence and clinical picture among horses in Sweden is unknown. The main aim of this study was therefore to investigate the presence of antibodies against SINV in horses in Sweden. The study also investigated the presence of antibodies in horses against tick-borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV) and Usutu virus (USUV) belonging to the genus *Flavivirus* in the family *Flaviviridae*. TBEV is present in Sweden but the seroprevalence and possible clinical picture in horses is unknown. WNV and USUV has not yet been reported in horses in Sweden but antibodies against these viruses has been found in horses in several countries in Europe.

The sample material, consisting of horse serum, was collected from the clinical chemical laboratory at the university animal hospital (UDS) at Swedish University of Agricultural Sciences during the period April-August. The samples came either from patients at the horse clinic at UDS or were sent from veterinarians around the country. A total of 651 samples were collected, of which 633 were analysed for SINV E1, 187 for SINV E2 and 614 for TBEV, WNV and USUV. What was investigated was the presence of IgG antibodies against the different viruses. The samples were analysed in a suspension multiplex immunoassay (SMIA) and the results from the SMIA were then obtained by analysis in a Luminex-Magpix instrument.

Based on the cut-off values calculated, a total of 78 samples were SMIA positive for SINV which corresponds to 12% of the samples analysed, 216 samples were SMIA positive for TBEV which corresponds to 35% of samples analysed. For WNV and USUV 73 respectively 24 samples were SMIA positive which corresponds to 12% and 4% of the samples analysed. The collected samples were grouped by county and had a spread from Norrbotten county in the north to Skåne county in the south. SMIA positive samples for SINV and TBEV came from 17 different counties and for WNV and USUV the samples came from 11 and 10 different counties respectively. Positive SMIA samples were present from all the months that samples were collected.

The result of this study shows that horses from many parts of Sweden may have been exposed to SINV infection, which is of interest since this previously only has been reported from South Africa. The result also shows that horses in Sweden may have been infected with TBEV, WNV and USUV as there were positive SMIA samples for these viruses as well. However, these results are quite uncertain, especially those for WNV and USUV, and need to be confirmed by a plaque reduction neutralization test (PRNT) to demonstrate the presence of neutralizing antibodies for each virus respectively. If positive samples also are found with the PRNT, it is also of interest to gather information about possible symptoms that the horses involved have shown for the different viruses.

## INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Taxonomi .....	2
Genom och virusstruktur.....	2
Patogenes.....	3
Transmissionscykel .....	3
Epidemiologi av alfavirus .....	4
Sindbisvirus i världen.....	4
Sindbisvirus i Sverige.....	5
Ross river virus.....	6
Getah virus .....	6
Eastern, Western och Venezuelan equine encephalitis virus .....	6
Detektion/diagnos.....	7
Antikroppskinetik.....	8
Material och metoder .....	8
Analysmetoder .....	9
Konjugering av antigen till MagPlex-C magnetiska kulor.....	9
Suspension multiplex immunoassay (SMIA).....	9
Plaque reduction neutralization test (PRNT) .....	10
Resultat.....	11
SINV.....	12
Flavivirus.....	13
PRNT.....	18
Diskussion .....	18
Konklusion .....	21
Populärvetenskaplig sammanfattning .....	22
Acknowledgement.....	25
Referenslista .....	26

## FÖRKORTNINGAR

EEEV	Eastern equine encephalitis virus
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
MES	2-(N-morpholino) ethane sulfonic acid
MFI	Median Fluorescent Intensity
MSP	Monobasic sodium phosphate
PBS	Phosphate-buffered saline
PBST	Phosphate-buffered saline with Tween 20
PRNT	Plaque reduction neutralization test
RRV	Ross River virus
SA-PE	Streptavidin-phycoerythrin
SINV	Sindbisvirus
SMIA	Suspension multiplex immunoassay
SVA	Statens Veterinärmedicinska Anstalt
TBE	Tick-borne encephalitis
TBEV	Tick-borne encephalitis virus
UDS	Universitetsdjursjukhuset/ University animal hospital
USUV	Usutu virus
VEEV	Venezuelan equine encephalitis virus
WEEV	Western equine encephalitis virus
WNV	West Nile virus



## INLEDNING

Myggburna virus som orsakar sjukdom hos häst tillhör framför allt genus *Alfavirus* inom familjen *Togaviridae* samt genus *Flavivirus* inom familjen *Flaviviridae*. Dessa virus är spridda över stora delar av världen och många av dem orsakar encefalit och neurologiska symtom hos hästar såsom alfavirusen Eastern equine encephalitis virus (EEEV), Western equine encephalitis virus (WEEV) och Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) samt flaviviruset West Nile virus (WNV). Flera av dessa virus är även zoonoser och orsakar därmed sjukdom även hos människa (Go *et al.*, 2013; Chapman *et al.*, 2018).

I Sverige har inga myggburna virus inom genus *Flavivirus* rapporterats från människa, häst eller myggor. WNV och Usutuvirus (USUV) har dock spridit sig längre norrut i Europa under senare år och USUV påträffades hos en koltrast på Öland sommaren 2019 (Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA), 2019). I Sverige finns dessutom det fästingburna flavivirus som orsakar sjukdomen tick-borne encephalitis (TBE) eller fästingburen hjärninflammation som den kallas på svenska (Folkhälsomyndigheten, 2018). Även andra djur såsom hundar infekteras med tick-borne encephalitis virus (TBEV) men utvecklar sällan sjukdom. Det är därför mycket troligt att även hästar bär på antikroppar mot TBEV men seroprevalens och eventuell sjukdomsbild i Sverige är okänd. Inom genus *Alfavirus* finns i Sverige ett virus som heter Sindbisvirus (SINV) vilket är ett enkelsträngat RNA-virus. Viruset cirkulerar i sin enzootiska cykel mellan fåglar och myggor. SINV finns i många delar av världen och orsakar sjukdom hos människa i bland annat Sverige, Finland och Sydafrika med symtom som feber och ledvärk (Espmark & Niklasson, 1984; Niklasson *et al.*, 1984; Kurkela *et al.*, 2008; Lundström & Pfeffer, 2010; Storm *et al.*, 2014). Viruset har även kopplats samman med neurologiska symtom hos hästar i Sydafrika (van Niekerk *et al.*, 2015).

SINV och dess vektorer finns alltså i Sverige men virusets sjukdomsbild och eventuell förekomst hos hästar i Sverige är okänd. Huvudsyftet med studien var därför att genom serologisk analys av hästserum i ett Luminex-Magpixinstrument undersöka om hästar i Sverige bär på antikroppar mot SINV. För att konfirmera misstänkt positiva prover analyserades dessa med ett plaque reduction neutralization test (PRNT) för påvisande av eventuella neutraliserande antikroppar. Då det vektorburna flaviviruset TBEV finns i Sverige och flavivirusen WNV och USUV cirkulerar i Europa undersöktes även förekomst av antikroppar mot dessa virus.

# LITTERATURÖVERSIKT

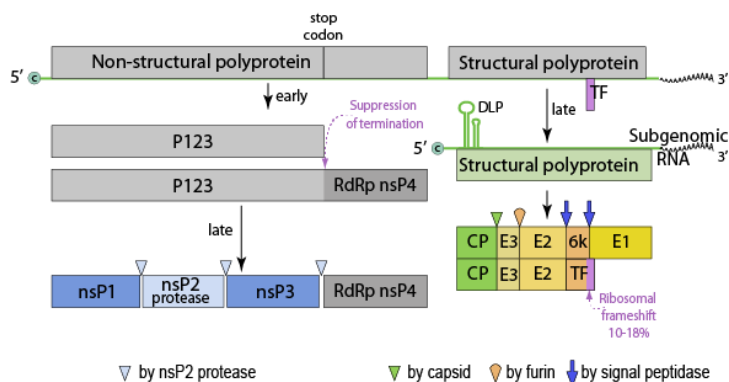
## Taxonomi

SINV tillhör riket *Riboviria*, vilket är den högsta nivån i virustaxonomi. *Riboviria* omfattar dubbelsträngade samt positivt och negativt enkelsträngade RNA virus som använder sig av RNA-beroende RNA polymeras för replikation (Walker *et al.*, 2019). SINV tillhör familjen *Togaviridae* och genus *Alfavirus*, som innehåller över 30 virustyper däribland EEEV, WEEV, VEEV, Ross River virus (RRV) och Getah virus (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2019).

Det finns många olika stammar av SINV som genetiskt kan delas in i fem olika genotyper, SIN I-V. Denna indelning baseras på en genetisk analys av 340 nukleotider av genen för det strukturella glykoproteinet E2. SIN-I innehåller virusstammar som ursprungligen kommer från Europa, mellanöstern och Afrika, SIN-II från Australien, SIN-III från Asien, SIN-IV från Azerbajjan och SIN-V från Nya Zeeland (Lundström & Pfeffer, 2010). Adouchief *et al.* (2016) har även beskrivit en sjätte genotyp vilken innehåller stammar från sydvästra Australien.

## Genom och virusstruktur

SINV, liksom andra virus i familjen *Togaviridae*, är positivt enkelsträngade RNA virus med ett genom bestående av 10–12 kilobaspar (Chen *et al.*, 2018). Genomet är indelat i två större regioner med två öppna läsramar. Vid translation av mRNA från läsramen i de två första tredjedelarna av genomet bildas ett polyprotein som sedan klyvs till de icke strukturella proteinerna nsP1, nsP2, nsP3 och nsP4. Translation av mRNA från läsramen i 3'-ändan ger ett polyprotein som klyvs till strukturella proteiner bestående av ett kapsidprotein, höljeproteinerna E1 och E2 samt två mindre polypeptider E3 och 6K (Figur 1) (Strauss & Strauss, 1994; Viralzone, 2019).



Figur 1. *Genom SINV* (ViralZone:www.expasy.org/viralzone, SIB Swiss Institute of Bioinformatics. Licensierad av [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NonDerivatives 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)).

Alfavirus är sfäriska och har en diameter på 65–70 nm (Chen *et al.*, 2018). Virusets nukleokapsid har en ikosahedral struktur ihopsatt av subenheter från det strukturella kapsidprotein och virusets arvs massa. Nukleokapsiden omges av ett dubbelskiktat lipidhölje som erhålls när viruset knoppas av från värdcellens plasmamembran (Bonsdorff & Harrison, 1975). Lipidhöljet

innehåller de två strukturella glykoproteinerna, E1 och E2, vilka formar trimerer utifrån heterodimerer på lipidhöljets yta (Phinney *et al.*, 2000). E1 innehåller områden som tros vara involverade då viruset fuserar med cellmembran medan E2 innehåller större delen av de epitoper dit neutraliserande antikroppar binder. E2 tros också vara involverad i receptorinteraktioner mellan virus och cell (Cheng *et al.*, 1995). Replikation sker i värdcellens cytoplasma och hos ryggradsdjur leder infektion till cytolys. Infektion av celler hos ryggradslösa djur, till exempel myggor, leder vanligtvis inte till cytolys och infektionen blir persistent (MacLachlan & Dubovi, 2011).

## Patogenes

Alfavirus finns i myggornas saliv och förs in extravaskulärt i kroppen via bitt från en mygga. Viruset replikerar initialt vid inokuleringsstället till exempel i skelettmuskulatur eller i lokala immunceller. Kort därefter infekterar viruset dendritiska eller langerhanska celler i huden. Dessa celler migrerar sedan till regionala lymfknutor där viruset infekterar andra immunceller och en primär viremi uppstår. Viruset sprids därefter till andra organ såsom lever och mjälte samt via blod eller lymfa till annan lymfoid vävnad. Viruset fortsätter där att replikera vilket resulterar i en sekundär viremi. Spridning sker sedan via blodet till sekundära platser för vidare replikering såsom muskulatur eller neuron i hjärna och ryggmärg (Taylor & Paessler, 2013). Merparten av kunskapen kring alfavirusens patogenes har uppnåtts genom studier på möss, ytterligare studier behövs för att studera om den ser likadan ut hos exempelvis människa.

Det finns inga studier på SINV hos häst gällande patogenes och vad som sker vid infektion. Det har dock gjorts experimentella studier där hästar infekterats med VEEV vilket tillhör samma genus som SINV. Där har det visats att viremi kan upptäckas redan 24 timmar efter infektion, att den når sin topp 2–3 dagar efter infektionens början och försvinner efter 5–6 dagar (Walton *et al.*, 1973).

Hos hästar orsakar infektion med VEEV framför allt skada i hjärna och ryggmärg och de makroskopiska fynd man sett är petekiella blödningar och stasade kärl. Mikroskopisk undersökning av hjärnvävnad har visat en peri-vaskulär ansamling av mononukleära inflammatoriska celler samt fokala områden av parenkymal inflammation och nekros (Taylor & Paessler, 2013). Liknande mikroskopiska fynd har även påvisats i hjärnor hos möss som infekterats med SINV (Hirsch & Griffin, 1979).

## Transmissionscykel

Alfavirus ingår i en grupp som kallas arbovirus. Arbovirus är virus som biologiskt överförs via s.k. vektorer vilket är bitande leddjur såsom myggor, knott, sandflugor och fästingar. Till arbovirus hör även virus inom exempelvis familjen *Flaviviridae*. Det sker en replikation av arbovirusen inuti insekten vilket skiljer dem från patogener som endast överförs mekaniskt via vektorer (Chapman *et al.*, 2018).

SINV upprätthålls i en enzootisk transmissionscykel mellan fåglar och myggor. Flera olika myggarter ingår i den enzootiska cykeln där vissa arter framför allt sprider viruset mellan fåglar medan andra arter fungerar som en överbryggande vektor som kan överföra viruset till människor och andra djur. Myggor som visat sig sprida SINV är framför allt arter inom släktena *Culex spp.* och *Culiseta spp.* och vilken art som dominerar skiljer sig mellan länder. Fåglar fungerar

som reservoar för SINV och hos dem sker även en uppförökning av viruset med en påföljande viremi vilket gör att viruset kan fortsätta cirkulera mellan myggor och reservoar. Fåglarna bär på viruset utan att utveckla sjukdom. Den huvudsakliga reservoaren för SINV är trastar och andra fåglar inom ordningen tättingar (Passeriformes), men viruset kan också infektera flera arter inom ordningarna hönsfåglar (Galliformes) och andfåglar (Anseriformes) (Adouchief *et al.*, 2014). Ibland sker en överföring av viruset från myggor till människor som då utvecklar sjukdom. Människor är dock så kallade ”dead-end hosts” vilket innebär att de inte producerar en tillräckligt höggradig viremi för att infektera myggor och sprider på så sätt inte viruset vidare. Detta gäller för många av alfavirusen som tas upp i detta arbete med undantag av VEEV och RRV som har gnagare respektive pungdjur som huvudsaklig reservoar. När hästar infekteras med epizootiska stammar av VEEV sker en uppförökning av viruset och infektion kan då spridas från hästar till människor men vid infektion med andra alfavirus anses hästar liksom människor vara ”dead-end hosts” (Go *et al.*, 2014; Chapman *et al.*, 2018).

Studier har visat att den geografiska spridningen av olika SINV genotyper stämmer överens med flyttfåglars migrationsmönster vilket skulle kunna tyda på att flyttfåglar kan transportera viruset mellan länder och kontinenter. Starkt släktskap har till exempel visats mellan stammar av SIN-I i norra Europa och i södra Afrika (Lundström & Pfeffer, 2010). I en studie av Ling *et al.* (2019) visade det sig dock att SIN-I troligen spridits till Sverige från centrala Afrika vid ett tillfälle och sedan lyckats etablera sig i landet. Viruset har sedan förmodligen spridits från Sverige till Finland, Tyskland och Ryssland. Författarna menar att spridning av viruset med nordligt migrerande flyttfåglar troligtvis är en sällsynt företeelse.

## **Epidemiologi av alfavirus**

Alfavirus är spridda över stora delar av världen och brukar delas in i nya eller gamla världens alfavirus. Till nya världens alfavirus hör till exempel EEEV, WEEV och VEEV vilka är spridda i Amerika och orsakar neurologiska symtom såsom encefalit hos människor och djur. Gamla världens alfavirus, såsom SINV och RRV, finns i Europa, Asien, Australien och delar av Afrika och orsakar feber, hudutslag och artrit hos människor (Strauss & Strauss, 1994; Go *et al.*, 2013).

### ***Sindbisvirus i världen***

SINV har en stor geografisk utbredning och har påvisats i flera länder i Europa, Afrika och Asien samt i Australien och Nya Zeeland (Lundström & Pfeffer, 2010). Utbrott av sjukdom hos människa orsakas av SIN-I och har rapporterats från Sydafrika, Sverige, Finland och Ryssland. Sjukdomen ger symtom som feber, hudutslag, trötthet samt värk i muskler och leder (Niklasson *et al.*, 1984; Kurkela *et al.*, 2008; Storm *et al.*, 2014). I Finland går sjukdomen under namnet Pogostasjuka och seroprevalensen för SINV ligger runt 5 % hos människor i landet. Dock kan seroprevalensen uppgå till 15 % i vissa områden. Utbrott har skett med sju års intervall där hundratals och i vissa fall över tusen fall rapporterats men medelvärde i landet ligger på 57 fall per år (Laine *et al.*, 2003; Kurkela *et al.*, 2008; Sane *et al.*, 2010). Studier i Sydafrika har visat att sporadiska fall av SINV infektion hos människor sker under sommaren framför allt i de centrala delarna av landet. Mellan åren 2006–2010 visades seroprevalensen för IgM ligga på 18 % i dessa delar. Större utbrott skedde 1974 och 1984 där tusentals respektive hundratals människor drabbades (Storm *et al.*, 2014).

Sjukdom hos häst orsakat av SINV har rapporterats endast från Sydafrika. Hästarna hade feber eller neurologiska symtom såsom ataxi och muskelsvaghet. De drabbade hästarna kom från olika delar av landet och var av olika ålder, kön och ras men ingen tydlig koppling kunde ses mellan sjuka hästar och dessa faktorer. Antalet fall ökade under regnperioden (januari-maj) även om sporadiska fall upptäcktes under andra delar av året (van Niekerk *et al.*, 2015).

### **Sindbisvirus i Sverige**

I Sverige går sjukdom hos människa orsakat av SINV under namnet Ockelbosjuka. Sjukdomen observerades för första gången i Sverige på 1960-talet (Niklasson *et al.*, 1984; Niklasson & Vene, 1996). Typiska symtom vid Ockelbosjuka är ledvärk, muskelvärk och icke kliande hudutslag, ibland tillsammans med feber. Sjukdomen är självläkande och oftast snabbt övergående men vissa har kvarstående ledvärk under flera månader till år (Espmark & Niklasson, 1984; Vene *et al.*, 1994; Gylfe *et al.*, 2018). Ockelbosjuka är endemisk i de centrala delarna av Sverige och förekommer framför allt i Dalarnas, Västernorrlands samt Gävleborgs län där seroprevalensen ligger på 3,6 %. Fall av Ockelbosjuka har dock konstaterats både norr och söder om detta område vilket tyder på att Ockelbosjuka förekommer i låg frekvens även i andra delar av landet (Espmark & Niklasson, 1984; Lundström *et al.*, 1991). I augusti 2013 skedde ett utbrott av Ockelbosjuka i Västerbotten vilket ligger norr om det endemiska området (Gylfe *et al.*, 2018). Fall av Ockelbosjuka förekommer under en kort period varje år. Perioden infaller mellan mitten av juli till början av oktober med en topp under andra halvan av augusti (Lundström *et al.*, 1991).

I områden där Ockelbosjuka är endemisk har SINV isolerats från de fågelbitande myggorna *Culex pipiens*, *Culex torrentium*, *Culiseta morsitans* samt från den överbryggande vektorn *Aedes cinereus* (Hesson *et al.*, 2015). SINV har även isolerats från *Culiseta morsitans* utanför det endemiska området, i samband med utbrottet i Västerbotten 2013 (Bergqvist *et al.*, 2015). *Culex torrentium* är dock den myggart som räknas som den främsta enzootiska vektorn för SINV i Sverige då studier visat att en större andel *Culex torrentium* än *Culex pipiens* infekteras med SINV (Hesson *et al.*, 2015). *Culex torrentium* är också den myggart som dominerar i Sverige liksom i norra Europa (Hesson *et al.*, 2011; 2014). Studier har visat att tättingar (Passeriformes) bär på den högsta andelen antikroppar mot SINV i områden där Ockelbosjuka är endemisk. Flera arter inom ordningen tättingar såsom björktrastar, taltrastar och rödvingetrastar har visats bära på antikroppar vilket gör att dessa fåglar förefaller vara den huvudsakliga reservoaren för SINV i Sverige (Lundström *et al.*, 1992; Lundström *et al.*, 2001). Dessa arter har också visats ge en viremi av tillräckligt hög titer för att kunna infektera *Culex torrentium* (Lundström *et al.*, 1993). Antikroppar har även hittats hos andfåglar (Anseriformes) och hönsfåglar (Galliformes), dock inte i lika stor utsträckning (Lundström *et al.*, 1992). And- och hönsfåglar har också visats uppnå en tillräckligt höggradig viremi för att infektera myggor men dessa fåglar ses trots detta som tillfälliga värdar i transmissionen (Lundström *et al.*, 1993).

### **Ross river virus**

Sjukdom orsakat av RRV är den myggburna sjukdomen som har störst utbredning i Australien. Tusentals människor drabbas varje år och de symtom som uppstår är ledvärk eller ledinflammation, feber och hudutslag (Harley *et al.*, 2001; Australian Government Department of Health, 2019).

Antikroppar mot viruset har påvisats hos hästar i Australien där seroprevalensen för RRV hos hästar i Queensland har visat sig ligga på 91 % (Gummow *et al.*, 2018). Även själva viruset har isolerats från hästar och misstänks orsaka sjukdom men detta har inte kunnat bevisats. De symtom som associeras med RRV infektion hos häst är feber, ataxi, stelhet, hälla, svullna leder, ovilja att röra sig, trötthet, svullna submandibular lymfknotor och sänkt prestation. Virus och antikroppar har påvisats hos hästar med dessa symtom men rapporterade fall är få (Azuolas *et al.*, 2003; El-Hage *et al.*, 2008). I en studie av Azuolas *et al.* (2003) isolerades RRV endast från hästar med IgM antikroppar det vill säga ej från hästar som hade utvecklat IgG vilket tyder på att viruset endast kan isoleras från infekterade hästar under en kort period då kliniska symtom, positiv IgM serologi och viremi överlappar varandra. Inget samband har setts mellan ålder, kön eller ras hos seropositiva hästar. Ett samband har dock kunnat ses mellan seropositivitet och områden där det fanns ett högt antal myggor (Gummow *et al.*, 2018).

### **Getah virus**

Getah virus har en stor geografisk spridning och har isolerats från myggor i Asien, Australien och Europa. I dessa områden har även antikroppar mot viruset påvisats hos bland annat människor, hästar, apor och grisar (Fukunaga *et al.*, 2000). I studier från Japan har antikroppar mot Getah virus hittats hos 3–50 % av hästarna i landet men vissa studier har visat en seroprevalens så hög som 93 %. (The center for Food Security and Public health, 2017). Sjukdom hos häst orsakat av viruset har rapporterats i Japan, Kina och Indien (Brown & Timoney, 1998; Nemoto *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2019). Infektionen är ofta mild och självläkande och de symtom som har satts i samband med sjukdom är framför allt feber, benödem som framför allt drabbar bakbenen, samt stel gång. Svullnad i submandibular lymfknotor har också rapporterats och vissa hästar utvecklar hudutslag. Alla hästar uppvisar inte alla symtom utan kan ha endast feber eller feber tillsammans med hudutslag eller benödem (Kamada *et al.*, 1991; Brown & Timoney, 1998; Fukunaga *et al.*, 2000; Nemoto *et al.*, 2015; Lu *et al.*, 2019). Nosflöde har setts hos hästar som experimentellt inokulerats med viruset men ej hos dem med naturlig infektion (Kamada *et al.*, 1991).

### **Eastern, Western och Venezuelan equine encephalitis virus**

EEEV, WEEV och VEEV orsakar neurologisk sjukdom och encefalit hos häst. De olika virusen ger upphov till liknande symtom och sjukdomens svårighetsgrad beror på vilket virus det är och dess virulens. Infektionen kan vara subklinisk medan den i vissa fall kan ha en dödlig utgång. Symtom som kan ses är feber, slöhet, anorexi, apati, ataxi, cirklande gång, head pressing, hängande huvud och öron, paralytisk av tungan, ansiktsförflamning, oförmåga att resa sig, darrningar, svårigheter med urinering och defekation, blindhet, kramper och koma (MacLachlan & Dubovi, 2011; Barba *et al.*, 2019).

EEEV är endemisk i Nordamerika och förekommer främst i de sydöstra delarna av landet (Brault *et al.*, 1999). Viruset har dock spridit sig norrut och 2012 rapporterades en seroprevalens på 8,7 % bland hästar i södra Quebec (Rocheleau *et al.*, 2013). EEEV förekommer även i Syd- och Centralamerika där utbrott med hög dödlighet rapporterats från Brasilien åren 2008–2009 (Silva *et al.*, 2011). Seroprevelensen i Brasilien låg på 9,9 % hos hästar år 2010 (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2015).

WEEV finns framför allt i västra delen av USA, i staterna väster om Mississipi floden. Viruset finns också i de norra delarna av Sydamerika, Mexiko och Kanada. De största utbrotten finns registrerade från USA och Kanada på 1930 och 1940-talet då hundratals hästar drabbades. Sedan 70-talet har antalet fall minskat kraftigt och inga fall av WEEV har rapporterats i USA eller Kanada sedan 1998 (Kumar *et al.*, 2018). I Pantanal i Brasilien låg seroprevalensen för WEEV hos hästar på 36,4 % 2010 och på 0,4 % 2015 (Pauvolid-Corrêa *et al.*, 2010; 2015).

VEEV isolerades först i Sydamerika och har sedan spridit sig genom Centralamerika och Mexiko upp till södra USA. Viruset kan snabbt sprida sig i stora populationer och orsaka utbrott där tusentals hästar drabbas. Det är framför allt de två epizootiska stammarna I-AB och I-C av VEEV som orsakar encefalit hos hästar och dödligheten är hög (Kumar *et al.*, 2018). Även VEEV I-E har orsakat sporadiska utbrott av sjukdom hos hästar i Mexiko och en seroprevalens som låg mellan 17–72 % i olika områden i landet har visats under åren 2003–2004 (Adams *et al.*, 2012).

## **Detektion/diagnos**

Då många av de alfa- och flavivirus som orsakar sjukdom hos häst ger liknande symtom och förekommer i samma geografiska områden kan en korrekt klinisk diagnos vara svår att ställa. Laboratoriediagnostik är därför också nödvändig (Chapman *et al.*, 2018).

För flera av alfavirusen kan diagnos ställas genom virusdetektion. Detta sker antingen genom virusisolering i cellkultur eller med PCR. Prover som kan användas är bland annat blod, hjärnvävnad och ledvätska (Studdert *et al.*, 2003; van Niekerk *et al.*, 2015; OIE-World organisation for animal health, 2019). För blod är dock detta endast effektivt under den viremiska fasen av infektionen (Taylor & Paessler, 2013). För de alfavirus där hästar är ”dead-end hosts” kan det dock vara svårt att hitta virus med hjälp av PCR då de inte kommer upp i tillräckligt höggradig eller långvarig viremi för att ge ett positivt utslag. Det kan då ge falskt negativa resultat (Chapman *et al.*, 2018). Diagnos kan även ställas genom serologiska tester såsom enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) för påvisande av specifika IgM eller IgG antikroppar i serum. Påvisande av IgM visar nyligen genomgången infektion medan IgG kan kvarstå länge efter den akuta fasen av infektionen. ELISA finns tillgänglig för flera av alfavirusen som orsakar sjukdom hos häst (Azuolas *et al.*, 2003; Chapman *et al.*, 2018; OIE-World organisation for animal health, 2019). För att diagnosticera kliniska fall med hjälp av serologi bör parade prover tas med 10–14 dagars mellanrum för att påvisa en stegring av antikropps titern (OIE-World organisation for animal health, 2019). En positiv diagnos med ELISA kan konfirmeras genom neutralisationstest för att påvisa neutraliserande antikroppar mot viruset (Chapman *et al.*, 2018). Det finns även serologiska multiplex analyser där antikroppar mot flera olika antigen kan analyseras samtidigt (Rizwan *et al.*, 2016).

## Antikroppskinetik

I en studie där uppföljande blodprover togs från hästar med RRV infektion kunde IgM specifika antikroppar påvisas i serum när hästarna uppvisade symtom. IgG specifika antikroppar påvisades i serum från 2 veckor efter det att symtom uppstått och nivåerna var fortsatt höga 5 veckor efter symtomdebut (Azuolas *et al.*, 2003). I en studie där hästar infekterades med Getah virus kunde neutraliserande antikroppar detekteras 8 dagar efter infektion och en topp sågs efter 21 dagar. Kvarstående höga nivåer kunde ses 6 månader efter infektion (Kamada *et al.*, 1991). I en studie där hästar infekterades experimentellt med WNV kunde IgM specifika antikroppar mot WNV upptäckas i serum 8 dagar efter infektion och de hade sin topp 8-12 dagar efter infektion. Nivåerna började sedan avta och dag 27 efter infektion låg de under tröskelvärdet för positiv detektion. Även neutraliserande antikroppar kunde påvisas 8 dagar efter infektion men dessa låg kvar på en hög nivå vid studiens slut vilket var 27 dagar efter infektion (Castillo-Olivares *et al.*, 2010).

Studier som visar hur länge specifika IgG antikroppar kvarstår hos hästar infekterade med alfavirus har inte hittats. På humansidan har det dock visats att SINV infekterade patienter haft kvarstående IgG antikroppar upp till 2,5 år efter insjuknande (Vene *et al.*, 1994).

## MATERIAL OCH METODER

Provmaterialet består av hästserum som är insamlat från kliniska kemiska laboratoriet på universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges Lantbruksuniversitet under perioden april-augusti. Proverna kommer från patienter på hästkliniken på UDS samt är serumprover som är inskickade från veterinärer runtom i landet. Information om geografiskt område samt datum när provet togs har inhämtats för varje prov. Proverna förvarades i frys med en temperatur på  $-70^{\circ}\text{C}$  fram tills analys påbörjades. Proverna analyserades med ett Luminex-Magpixinstrument och miss-tänkt positiva prover analyserades vidare med ett plaque reduction neutralization test (PRNT). Båda analyserna utfördes på Zoonosis Science Centre på Uppsala biomedicinska centrum, Uppsala universitet. PRNT utfördes av Jenny Hesson, biträdande handledare.

Antigen som användes vid analys av SINV:

- SINV E1
- SINV E2

Antigen som användes vid analys av flavivirus:

- TBEV strain Moscow B-4 (hela viruset)
- TBEV strain Neudoerfl (icke-strukturellt protein 1)
- WNV New York strain 99 (hela viruset)
- WNV New York strain 99 (icke-strukturellt protein 1)
- USUV strain Vienna 2001 (icke-strukturellt protein 1)



Som positiv kontroll vid analys av SINV användes ett humant serum från en SINV infekterad patient. Som negativ kontroll användes serum från 8 hästar som inte givit någon signal i SMIA för de virus som analyserades.

Som positiva kontroller vid analys av flavivirus användes humana serum positiva för TBEV, WNV och USUV. Samma negativa kontroller som vid analys av SINV användes.

## **Analysmetoder**

### ***Konjugering av antigen till MagPlex-C magnetiska kulor***

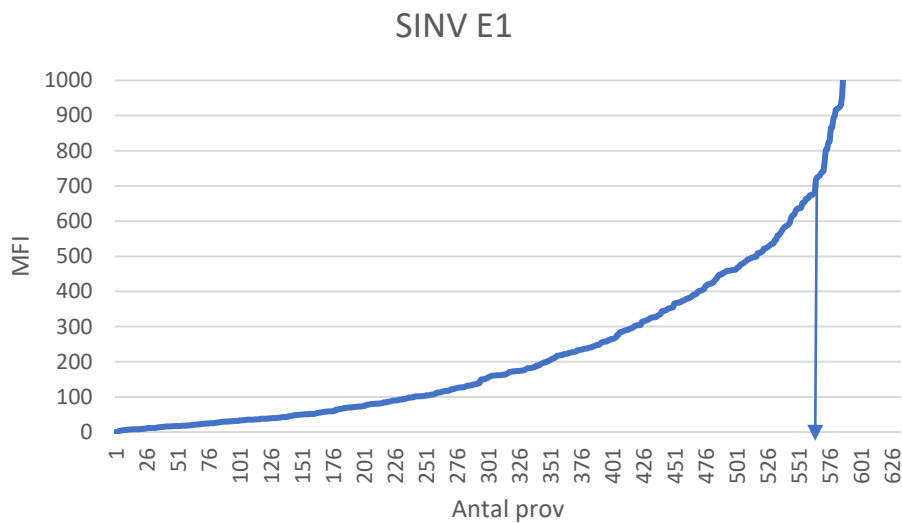
Vid konjugeringen av antigen användes Luminex MagPlex-C magnetiska kulor. Kulmixen blandades genom vortex och sonikering i 20 sekunder. Därefter överfördes 100 µl av kulmixen innehållande  $1,25 \times 10^7$  kulor/ml till ett 2-ml rör. Kulorna tvättades med 200 µl 100 mM monobasic sodium phosphate (MSP), pH 6,2, med hjälp av en magnetseparator. Sedan tillsattes 80 µl MSP följt av 10 µl sulfo-N-hydroxy-succinimide (50 mg/ml H<sub>2</sub>O) samt 10 µl 1-ethyl-3-(3-dimethyl-aminopropyl) carbodiimide (50 mg/ml H<sub>2</sub>O). Lösningen inkuberades sedan i 20 min i rumstemperatur och mörker på en ”rocking mixer”. Efter inkuberingen tvättades kulorna med 250 µl 50 mM 2-(N-morpholino) -ethanesulfonic acid (MES) sodium salt, pH 5, i magnetseparatorn. Därefter tillsattes 100 µl MES varefter 10 µg protein tillsattes. MES tillfördes sedan upp till 500 µl. Lösningen inkuberades sedan i 2 timmar i rumstemperatur och mörker på en ”rocking mixer”. Kulorna tvättades sedan i 0,5 ml phosphate buffered saline (PBS), pH 7,4, innehållande 0,5 ml/l Tween 20 och 50 mM Tris (PBST) för att blockera karboxylgrupper som ej reagerat. Kulorna tvättades därefter i 0,5 ml StabilGuard. Till den slutgiltiga lösningen tillsattes 200 µl StabilGuard vilket gav en kulmix bestående av 6250 kulor/µl. Kulorna förvarades i mörker i 4°C.

### ***Suspension multiplex immunoassay (SMIA)***

SMIA analysen utfördes i en 96-brunns mikrotiterplatta där 49 µl PBST tillfördes till varje brunn. Därefter tillsattes 1 µl prov samt positiva och negativa kontroller i respektive brunnar. Kulmixen vortexades och sonikerades i 20 sekunder och sedan tillsattes 24 µl av varje kulmix till ett rör med 6 ml PBST vilket gav 25 kulor/µl PBST. Lösningen vortexades och sedan tillfördes 50 µl av denna till varje brunn. Plattan täcktes och inkuberades sedan i 1 h i mörker och rumstemperatur på en plattskak i 450 rpm. Under inkuberingen tillsattes 48 µl biotinylerat protein G (0,5 mg/ml) till 12 ml PBST vilket gav en slutgiltig protein G koncentration på 2 µl/ml. Efter inkuberingen tvättades kulorna en gång med 100 µl PBS med hjälp av en magnetplatta. Sedan tillsattes 100 µl av den spädda protein G lösningen till varje brunn. Plattan inkuberades sedan i 30 min i mörker och rumstemperatur på en plattskak i 450 rpm. Under denna inkubering tillsattes 6 µl streptavidin-phycoerythrin (SA-PE) (4 mg/ml) till 12 ml PBST vilket gav en slutgiltig SA-PE koncentration på 2 µl/ml. När inkuberingen var klar tvättades kulorna en gång i 100 µl PBS med hjälp av en magnetplatta. Sedan tillsattes 100 µl av SA-PE lösningen till varje brunn. Plattan inkuberades en sista gång i 15 min i mörker och rumstemperatur på en plattskak i 450 rpm. Därefter tvättades kulorna en gång med 100 µl PBS med hjälp av en magnetplatta. En slutgiltig volym av 100 µl PBS tillfördes till varje brunn och blandades sedan kort på en plattskak i 450 rpm. Sedan analyserades 75 µl från varje brunn i Luminex-Magpixinstrumentet enligt instruktioner från tillverkaren. En kula utan antigen, det vill säga en blank kula, användes

som kontroll för att upptäcka ospecifik antikropps-bindning till själva kulorna. För att säkerställa att antigenet, innehållande en His-tag, hade kopplats till de magnetiska kulorna, användes biotinylerade anti-His-tag antikroppar (1,0 mg/ml) i första körningen efter konjugering.

Vid beräkning av cut-off värden för misstänkt positiva SMIA resultat för de olika antigenen valdes ett antal prover med låga resultat ut, det vill säga låga värden för Median Fluorescent Intensity (MFI). Hur många prover som valdes ut för respektive antigen beräknades genom att titta på diagram över fördelningen av SMIA resultaten. Värdet på x-axeln, motsvarande antal prov, lästes av där en tydlig stigning av kurvan startade (Figur 2). För de prover som var lägre och lika med detta värde beräknades sedan medelvärdet och standardavvikelsen. Standardavvikelsen multiplicerades med tre och sedan adderades medelvärdet varpå cut-off värdet erhöles.



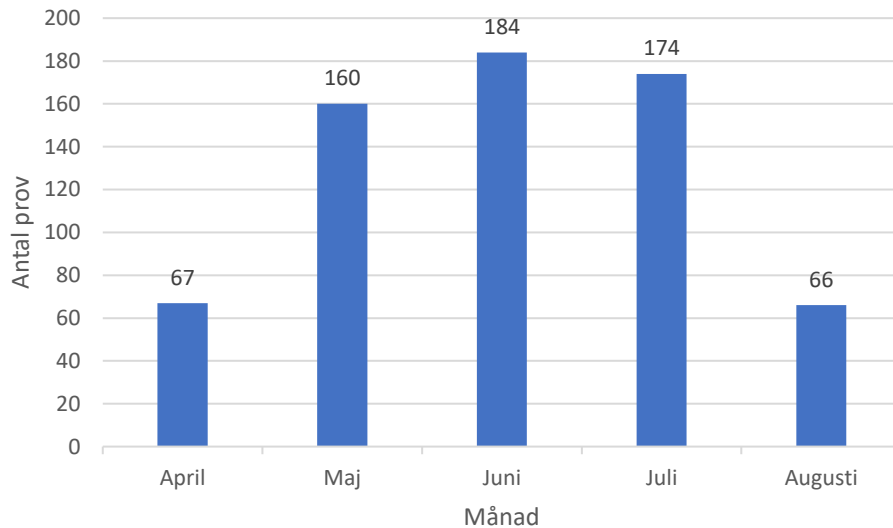
Figur 2. Ett exempel på hur antal prov valdes ut för beräkning av cut-off värden.

### **Plaque reduction neutralization test (PRNT)**

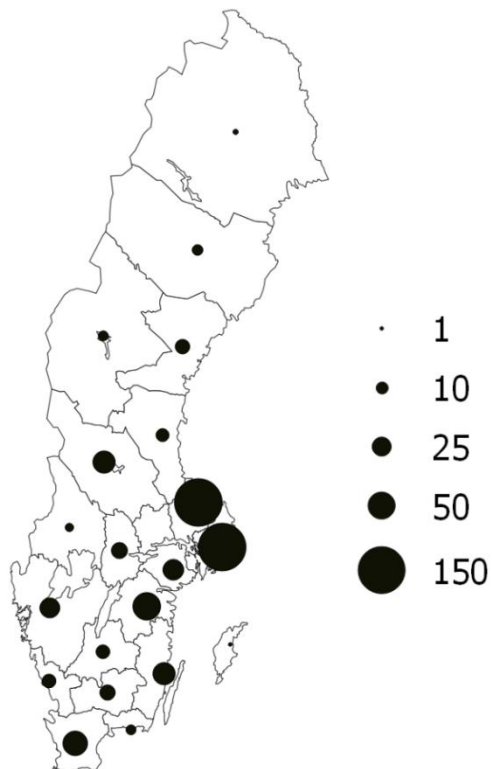
De misstänkt positiva serumproverna analyserades ytterligare med en SINV-PRNT. För denna användes konfluenta Veroceller och SINV isolatet 09-M-358. Som positiv kontroll användes ett humant serum från en SINV infekterad patient och som negativ kontroll användes serumprover från häst som inte givit signal i SMIA. Serumproverna späddes 1:10 för att ge en slutgiltig spädning på 1:20 när det blandades med en lika stor volym av utspätt virus. Viruset späddes för att bilda 80–120 plackbildande enheter per brunn i en cellkulturplatta med 24-brunnar. Spädningarna mellan serum och virus tilläts reagera under en timmes tid innan de sattes på cellerna, varje prov kördes i duplikat. I varje brunn tillsattes sedan 0,5 ml av en blandning innehållande 1,5 % agar Noble löst i vatten, Minimum Essential Medium samt 1 % DEAE-Dextran. Plattan inkuberades sedan i 37° över natten. Dagen efter tillsattes ytterligare ett lager av samma blandning där neutralrött tillsattes för att synliggöra placken. Plattan inkuberades över natten ytterligare en gång och därefter räknades placken som bildats av icke-neutraliserat virus. Ett prov räknades som positivt för SINV neutraliserande antikroppar när antalet plack reducerats med mer än 80 % jämfört med en kontroll endast innehållande virus.

## RESULTAT

Totalt samlades 651 hästserumprover in från början av april till mitten av augusti (Figur 3). Proverna grupperades efter län och hade en spridning från Norrbottens län i norr till Skåne län i söder (Figur 4). Prover från patienter på hästkliniken på UDS samt prover insamlade av veterinärer från ambulatoriska kliniken på UDS räknades tillhöra Uppsala län.



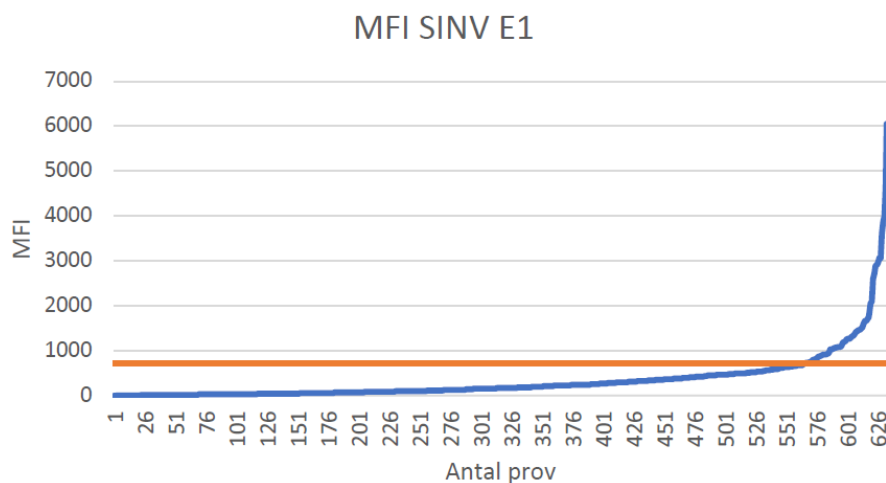
Figur 3. Antal prover insamlade per månad.



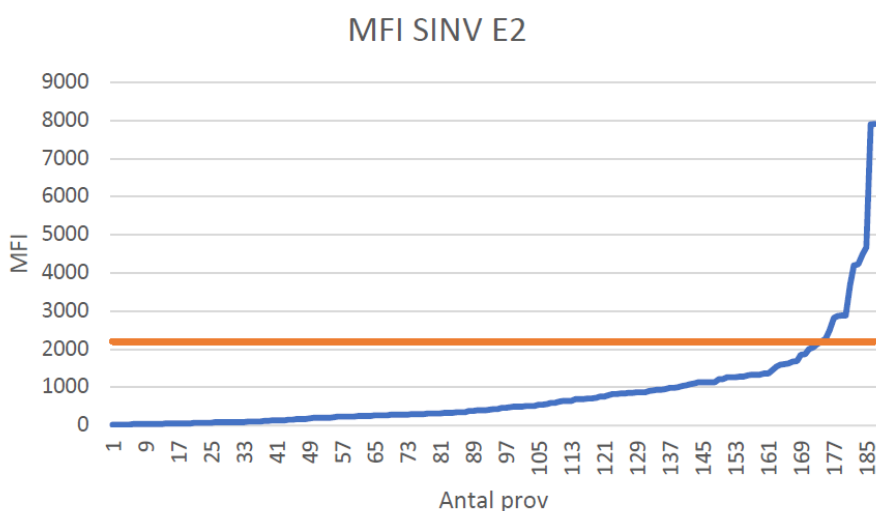
Figur 4. Antal prov från respektive län. Storleken på cirklarna representerar antalet prov i detta län.

## SINV

Av de 651 insamlade proverna analyserades 633 för SINV E1 och 187 av dessa analyserades även för SINV E2. Värdet på MFI varierade för SINV E1 från 0–6050 (Figur 5) och för SINV E2 från 16–7913 (Figur 6). Vid beräkning av cut-off värdet för SINV E1 valdes resultatet från de 560 lägsta proverna ut vilket gav ett cut-off värde på 717 MFI. Antalet misstänkt SMIA positiva prover för SINV E1 blev då 68 vilket motsvarar 11 % av alla analyserade prover (Tabell 1). För SINV E2 valdes de 175 lägsta proverna ut vilket gav ett cut-off värde på 2200 MFI. Antalet misstänkt SMIA positiva prover blev då 14 vilket motsvarar 7,5 % av de analyserade proverna för SINV E2 (Tabell 1). Av dessa 14 var 4 också E1 positiva. Då vissa av proverna var positiva både för SINV E1 och SINV E2 blev det totala antalet misstänkt SMIA positiva prover 78 vilket motsvarar 12 % av de analyserade proverna. Dessa prover kom från 17 olika län (Figur 7) och positiva prover fanns representerade för alla månader som prover samlats in (Figur 14).



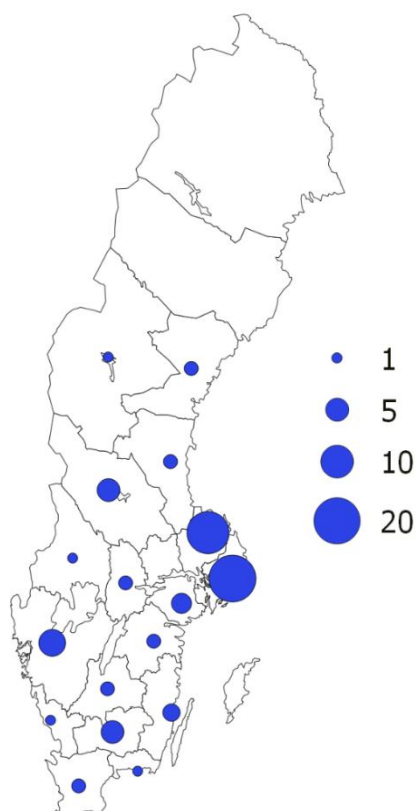
Figur 5. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för SINV E1. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.



Figur 6. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för SINV E2. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.

Tabell 1. Antal prover, cut-off värden och SMIA resultat för SINV

Antigen	Antal prover	Cut-off (MFI)	SMIA positiva prover (antal)	SMIA positiva prover (%)
SINV E1	633	720	68	11
SINV E2	187	2200	14	7,5



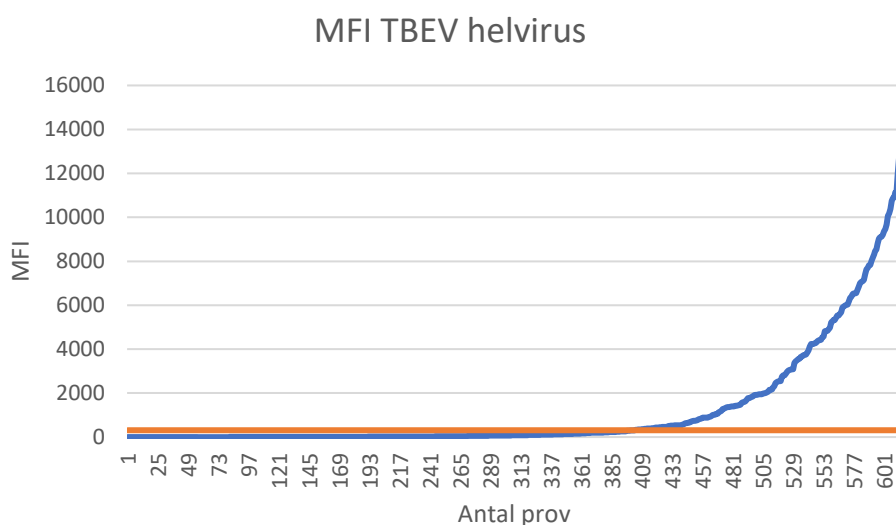
Figur 7. Antal SINV SMIA positiva prover indelade efter län. Storleken på cirkeln representerar antal positiva prover från detta län.

## Flavivirus

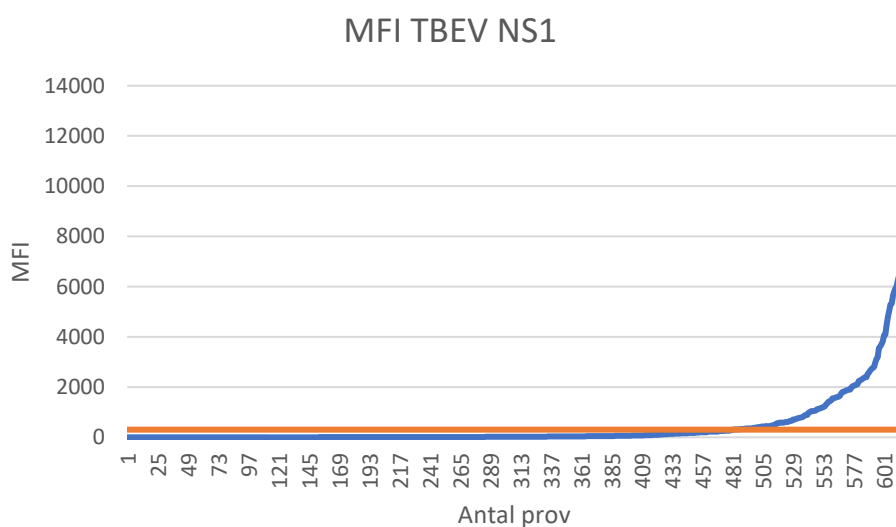
Av 651 insamlade prover analyserades 614 för flavivirusen TBEV, WNV och USUV. För TBEV helvirus och TBEV NS1 varierade värdet på MFI från 0–13692 (figur 8) respektive 0–12301 (figur 9). För WNV helvirus och WNV NS1 varierade MFI värdena från 0–1599 (figur 10) respektive 0–2038 (figur 11). För USUV NS1 varierade värdet på MFI från 0–1713 (figur 12). Vid beräkning av cut-off för TBEV helvirus valdes resultat från de 400 lägsta proverna vilket gav ett cut-off värde på 310 MFI. Antalet misstänkt SMIA positiva prover blev då 211 vilket motsvarar 34 % av de analyserade proverna. För TBEV NS1 valdes resultatet från de 500 lägsta proverna ut vilket gav ett cut-off värde på 305. Detta gav 133 misstänkt SMIA positiva prover vilket motsvarar 22 % av de analyserade proverna. För WNV helvirus, WNV NS1 samt USUV valdes de lägsta 500, 580 respektive 575 lägsta proverna ut. Det gav cut-off värden på 38, 3,1 respektive 71 MFI vilket enligt praxis är för lågt, varför dessa cut-off värden sattes till

200 MFI. För WNV helvirus blev då antalet misstänkt SMIA positiva prover 71 vilket motsvarar 12 % av de analyserade proverna jämfört med WNV NS1 där 6 prover var misstänkt SMIA positiva vilket motsvarar 1 % av de analyserade proverna. För USUV NS1 var 24 prover misstänkt SMIA positiva vilket motsvarar 4 % av de analyserade proverna (Tabell 2). För TBEV, WNV och USUV var totalt 216, 73 respektive 24 prover SMIA positiva vilket motsvarar 35 %, 12 % respektive 4 % av de analyserade proverna. Dessa prover var insamlade från 17, 11 respektive 10 olika län (figur 13) och även här fanns det positiva prover från alla månader då prover samlats in (figur 14).

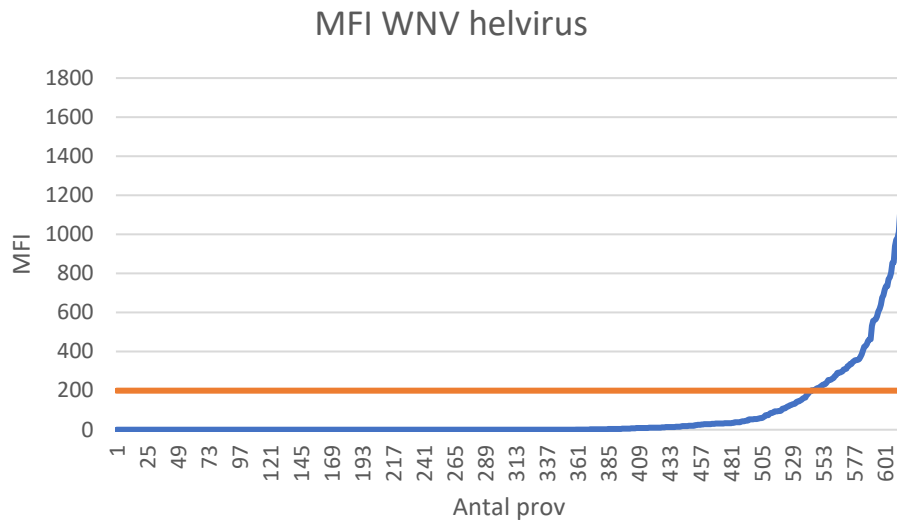
Antal prover från respektive län samt misstänkt positiva SMIA prover från varje län för respektive virus finns presenterade i tabell 3.



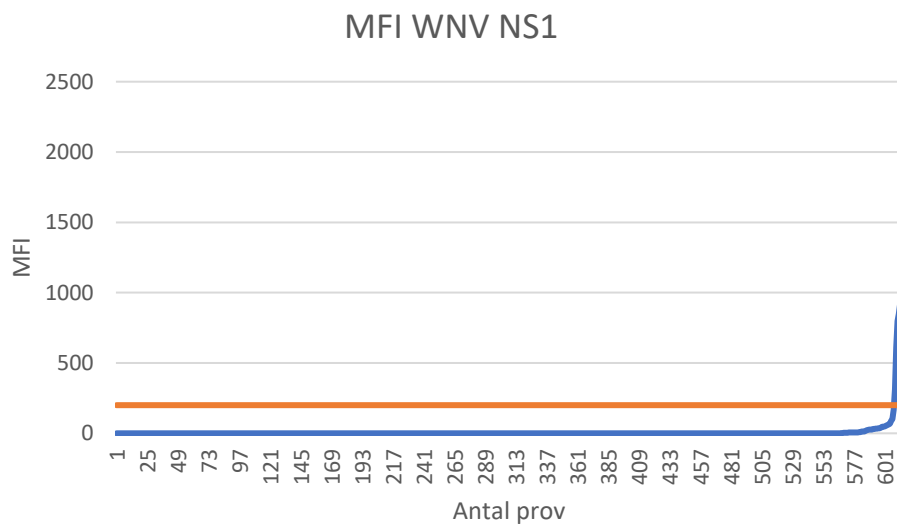
Figur 8. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för TBEV helvirus. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.



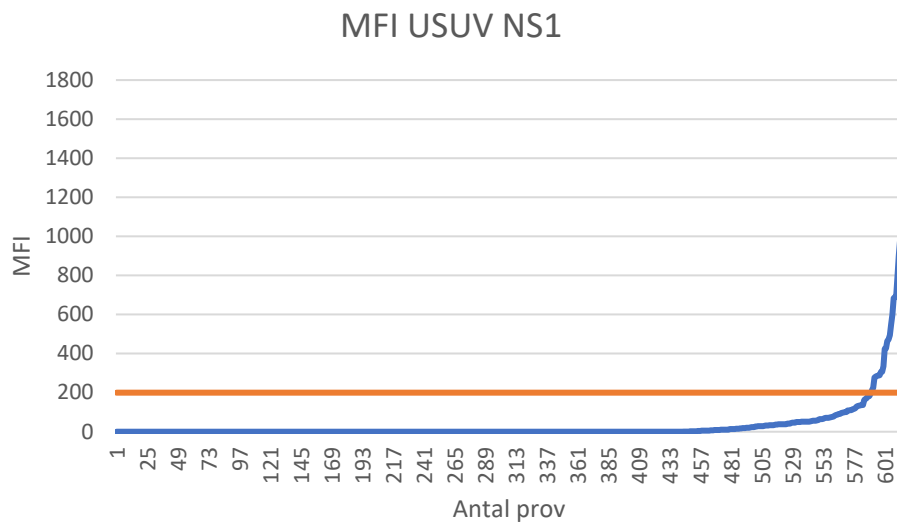
Figur 9. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för TBEV NS1. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.



Figur 10. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för WNV helvirus. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.



Figur 11. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för WNV NS1. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.

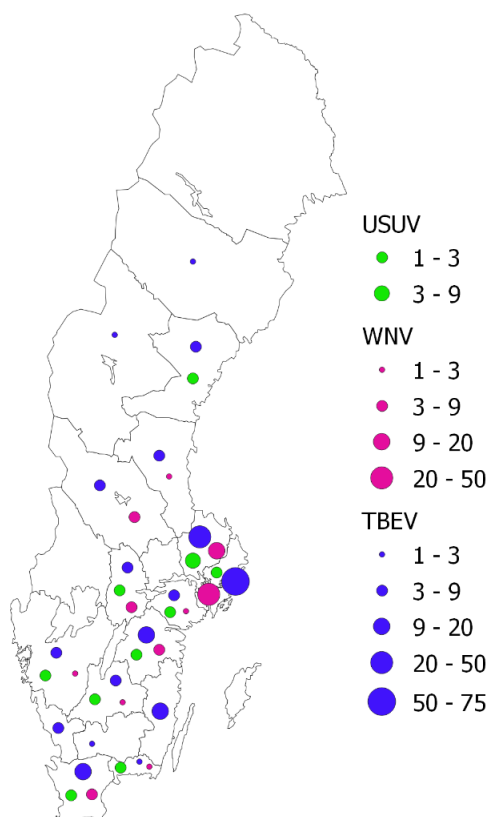


Figur 12. Kurvan visar MFI värden i stigande ordning för USUV NS1. Den horisontella linjen visar cut-off värdet för SMIA positiva prover.

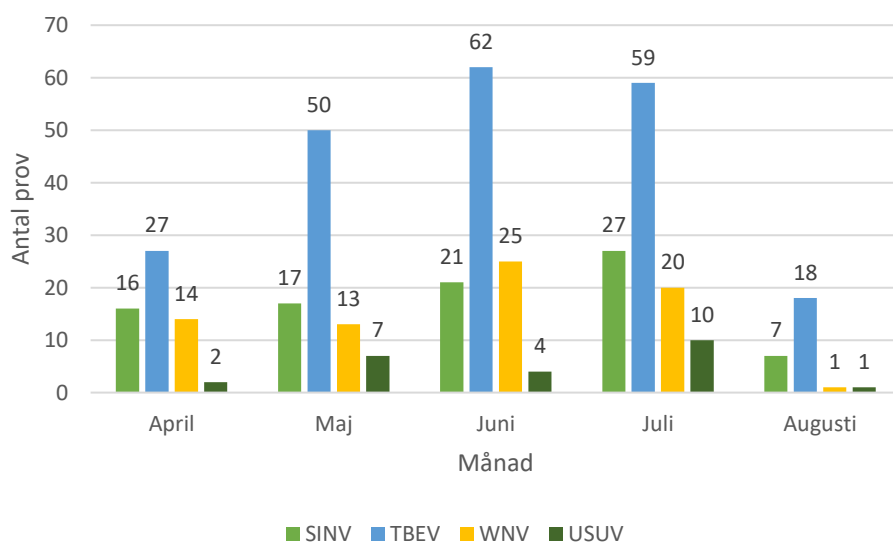
Tabell 2. Antal prover, cut-off värden och SMIA resultat för respektive flavivirus

Antigen	Antal prover	Cut-off (MFI)	SMIA positiva prover (antal)	SMIA positiva prover (%)
<b>TBEV helvirus</b>	614	310	211	34
<b>TBEV NS1</b>	614	305	133	22
<b>WNV helvirus</b>	614	200	71	12
<b>WNV NS1</b>	614	200	6	1
<b>USUV NS1</b>	614	200	24	4





Figur 13. Antal TBEV, WNV och USUV SMIA positiva prover indelade efter län. Storleken på cirkeln representerar antal positiva prover av respektive virus för detta län.



Figur 14. Antal SMIA positiva prover per månad för respektive virus.

Tabell 3. Antal prover per län samt antal misstänkt SMIA positiva prover per län för respektive virus

Län	Antal prover	SINV positiva	TBEV positiva	WNV positiva	USUV positiva
Blekinge län	7	1	3	2	1
Dalarnas län	35	5	8	6	0
Gotlands län	1	0	0	0	0
Gävleborgs län	12	2	5	1	0
Hallands län	13	1	4	0	0
Jämtlands län	7	1	1	0	0
Jönköpings län	13	2	5	1	1
Kalmar län	34	3	11	0	0
Kronobergs län	16	5	1	0	0
Norrbottnens län	2	0	0	0	0
Skåne län	42	2	12	4	3
Stockholms län	154	21	72	33	2
Södermanlands län	31	4	8	2	1
Uppsala län	156	17	48	12	9
Värmlands län	5	1	0	0	0
Västerbottens län	8	0	3	0	0
Västernorrlands län	15	2	4	0	1
Västmanlands län	0	0	0	0	0
Västra götlands län	28	7	7	3	2
Örebro län	19	2	8	5	2
Östergötlands län	53	2	16	4	2

## PRNT

Några av proverna analyserades med SINV PRNT och resultatet indikerade att det fanns neutraliserande antikroppar mot SINV. I nuläget är dock inte PRNT analyserna slutförda varför resultatet inte presenteras i detta arbete.

## DISKUSSION

SINV cirkulerar i den svenska myggpopulationen i de centrala delarna av Sverige och orsakar varje år sjukdomsfall hos människor. Den här studien indikerar att hästar från många delar av Sverige utsatts för en SINV infektion vilket är av intresse då detta tidigare bara visats hos hästar i Sydafrika (van Niekerk *et al.*, 2015). Övervakning är ett effektivt sätt att tidigt upptäcka förekomst av virus som tidigare inte funnits i landet varför det även är av intresse att undersöka förekomsten av antikroppar mot WNV och USUV. TBEV är etablerat i Sverige men någon seroprevalens hos hästar finns inte beskrivet. Resultatet i denna studie visar att hästar i Sverige eventuellt utsatts för en infektion även för dessa tre virus.

Viktigt att poängtera är att positiva SMIA prover i denna studie inte automatiskt innebär att individen genomgått infektion med viruset och därmed bär på antikroppar. Positiva prover i den här studien utgår från de cut-off värden som beräknats utifrån MFI-värdena för de olika virusen (Tabell 1, Tabell 2). Då inga serologiska studier för dessa virus tidigare gjorts i Sverige på häst, där serum analyserats i ett Magpix-Luminex instrument, finns inga referenser för cut-off värdena. För prover som analyseras med Magpix-Luminex på humansidan är cut-off värdet för SINV E1 471, för TBEV helvirus 250, för TBEV NS1 200, för WNV helvirus och WNV NS1 200 och för USUV NS1 200 (Rönberg, B., Akademiska Sjukhuset, pers. medd., 2019-11-25). Dessa värden ligger rätt nära de cut-off värden som beräknats i denna studie vilket kan tyda på att våra värden ligger nära ett rimligt värde. Dock finns inga studier som jämfört cut-off värden för människa och häst. De misstänkt SMIA positiva proverna för de olika virusen måste därför konfirmeras med ett PRNT test för att påvisa neutraliserande antikroppar mot respektive virus. Detta konfirmerar att individen genomgått infektion med viruset. Utifrån dessa resultat kan sedan cut-off värdena komma att justeras och antalet SMIA positiva prov kommer då förändras.

I SMIA analysen användes både helvirus och NS1 som antigen för TBEV och WNV. NS1 är mer specifikt för ett visst virus än vad helvirus är då alla virusets proteiner finns kvar i helviruset. Det gör att det finns fler epitoper som kan överensstämma med de som finns hos andra antigen vilket ökar risken för att andra antikroppar än de man letar efter binder in. Det var även en skillnad mellan dessa i resultatet då 211 prover var positiva för TBEV helvirus medan 133 var positiva för TBEV NS1. För WNV var skillnaden ännu större då 71 prover var positiva för helviruset men endast 6 var positiva för NS1.

För de antigen som använts i studien finns ingen information om vilka stammar som använts för SINV E1 och SINV E2. Detta skulle kunna ha varit av intresse för att se om de är samma som de stammar som cirkulerar i Sverige. De TBEV som cirkulerar i Sverige har konstaterats tillhöra den europeiska västra subtypen dit även stammen Neudoerfl, som använts i denna studie, tillhör (Haglund *et al.*, 2003). Då WNV och USUV inte finns i Sverige har de stammar som fanns tillgängliga använts. Gällande de stammar för de olika flavivirusen som använts i denna studie finns det en korsreaktivitet mellan stammar inom respektive virus. Det innebär att det inte spelar någon större roll vilka stammar som används för respektive virus utan antikropparna kommer binda in till dessa ändå oavsett vilken stam individen tidigare träffat på (Lundkvist, Å., Uppsala universitet, pers. medd., 2019-12-04).

Proverna som analyserats i detta arbete är insamlade från början av april till mitten av augusti (Figur 3). I en studie där myggor samlades in från det endemiska området kring Dalälven i de centrala delarna av Sverige under perioden maj till september kunde isolat av SIN-I påvisas i mygg insamlade mellan juli och september. Transmissionssäsongen för SINV anses därför vara från mitten av juli till slutet av september (Lundström *et al.*, 2019). Det överensstämmer även med den period då flest antal sjukdomsfall hos människor kan ses (Lundström *et al.*, 1991). Om förekomst av IgM antikroppar hade undersökts, det vill säga fall av nyinfektion, borde misstänkt positiva fall framför allt ha observerats bland proverna insamlade från juli och augusti. I detta arbete undersöktes dock endast förekomst av IgG antikroppar vilka kan kvarstå under en lång tid. I det här fallet visar då misstänkt positiva prover endast att individen någon gång utsatts

för smittämnet och detta behöver inte överensstämna med vilket datum provet togs. Resultatet i den här studien visar att det fanns misstänkt positiva prov från alla månader då prover samlades in, även de månader som ligger utanför transmissionssäsongen (Figur 14). Inga studier har hittats på hur länge IgG antikroppar kvarstår hos hästar infekterade med alfavirus. Hos mänskliga med SINV infektion har man dock sett kvarstående IgG antikroppar upp till 2,5 år efter symtomdebut (Vene *et al.*, 1994). Man kan då anta att dessa hästar förmodligen har infekterats under någon av de närmast föregående transmissionssäsongerna. Hos hästar med RRV infektion har IgG antikroppar kunnat påvisas 2 veckor efter symtomdebut (Azuolas *et al.*, 2003). Om samma antikroppssvar gäller för hästar med SINV infektion skulle de misstänkt positiva hästarna provtagna i augusti (Figur 14) i teorin kunnat ha hunnit utveckla IgG antikroppar om de infekterats under andra halvan av juli, men infektion kan lika gärna ha skett året innan. Uppföljande blodprov från dessa individer för att påvisa en stegring av antikroppstitern eller analys av dessa prover för att undersöka förekomst av IgM antikroppar hade dock behövts för att bekräfta att dessa hästar nyligen genomgått infektion.

De misstänkt SINV positiva SMIA proverna i detta arbete kommer från hästar utspridda i 17 av Sveriges 21 län med högst antal misstänkta fall från Uppsala och Stockholms län (Figur 7). Dock fanns det även flest prover insamlade från dessa två län, 156 respektive 154 (Tabell 3). I Sverige är Ockelbosjuka orsakat av SINV endemiskt i Dalarnas, Västernorrlands samt Gävleborgs län (Lundström *et al.*, 1991) varför man skulle kunnat misstänka att flest SMIA positiva prover skulle komma från dessa län. Procentuellt sett fanns det fler SMIA positiva prover från dessa tre län än från Uppsala län. Dalarnas och Gävleborgs län hade procentuellt sett även fler SMIA positiva prover än Stockholms län. Kronobergs län var det län där det procentuellt sett fanns flest SMIA positiva prover (Tabell 3). Dock hade en jämnare fördelning av antal prover från respektive län varit önskvärd för att kunna dra någon slutsats av detta då positiva prover från ett län med ett väldigt lågt eller väldigt högt antal prover kan ge ett missvisande resultat.

Proverna från hästkliniken på UDS räknades tillhöra Uppsala län men ingen information har kunnat samlats in om varifrån dessa hästar kommer. Även om det förmodligen främst är hästar från Uppsala län som kommer till hästkliniken tar de även emot patienter från andra delar av Sverige. Det kan därför inte uteslutas att några av de misstänkt positiva hästarna i Uppsala län kommer från andra län i Sverige. Den slutsatsen kan dras för alla positiva hästar även från övriga län, då det ofta sker en förflyttning av hästar runtom i landet till exempel vid köp av hästar eller då de reser runt på olika tävlingar i landet. Det går därför inte säkert att säga att dessa hästar infekterats i det län där de för närvarande bor. Även här skulle det krävas en analys av IgM antikroppar tillsammans med information om hästen nyligen befunnit sig i ett annat län för att säkerställa att infektion skett i det län där den bor. Det finns även en möjlighet att någon häst infekterats utomlands, till exempel om någon häst importerats till Sverige eller tävlat utomlands.

Gällande flavivirusen så har fall av TBE på humansidan framför allt rapporterats från Uppsala, Stockholms, Södermanlands och Västra Götalands län. TBE finns även delvis spritt i övriga delar av mellersta och södra Sverige med fall rapporterade från Skåne upp till Gävleborgs län. Under 2018 rapporterades ovanligt många fall från Västmanlands, Örebro och Värmlands län vilket visar att TBE sprider sig västerut (Folkhälsomyndigheten, 2018). Detta stämmer rätt väl

överens med de områden där de SMIA positiva TBEV proverna kommer ifrån (Figur 13). Studier i Tyskland och Österrike har påvisat en hög seroprevalens mot TBEV hos hästar (Klaus *et al.*, 2013; Rushton *et al.*, 2013). I den här studien var 216 hästar misstänkt SMIA positiva vilket indikerar en hög seroprevalens för TBEV även hos hästar i Sverige. Dessa måste dock konfirmeras med PRNT för att få en sann seroprevalens. WNV har ännu inte rapporterats från Sverige men viruset sprider sig norrut i Europa och två fall hos häst har konstaterats i Tyskland där viruset även har påträffats hos vilda fåglar (Ziegler *et al.*, 2019). *Culex modestus* som räknas som en de viktigaste överbryggande vektorerna för WNV mellan fåglar och däggdjur upptäcktes i Sverige för första gången i Skåne 2016 (Lindström & Lilja, 2018). USUV har också påträffats hos vilda fåglar i Tyskland (Michel *et al.*, 2018) och antikroppar mot USUV har hittats hos hästar i bland annat Polen och Kroatien (Barbic *et al.*, 2013; Bazanów *et al.*, 2018). I somras upptäcktes det första fallet i Sverige då viruset hittades hos en död koltrast på Öland (SVA, 2019). Positiva fall av WNV och USUV skulle därför i första hand kunna misstänkas dyka upp i de södra delarna av Sverige. I denna studie fanns misstänkt positiva SMIA prover för WNV och USUV så långt norrut som Gävleborgs respektive Västergötlands län (Figur 13). Det som är viktigt att tänka på vid tolkning av resultatet är dock att det finns en signifikant korsreaktivitet mellan olika flavivirus varför det finns stor risk för falskt positiva resultat. Flera av proverna som var positiva för WNV och USUV var även positiva för TBEV varför det även här är av stor vikt att dessa prover analyseras med PRNT för att skilja på sant positiva fall och fall av korsreaktivitet.

WNV är känt att orsaka sjukdom hos häst och detta har i Sydafrika nu även visats för infektion med SINV (van Niekerk *et al.*, 2015). Av de hästar som bar på antikroppar mot TBEV i Tyskland var majoriteten symtomfria men en häst visade symtom som kopplades ihop med TBEV infektionen. Hästen hade nedsatt allmäntillstånd, minskad aptit, magrade av, var nervös, orolig och stegrade sig. Hästen återhämtade sig men var fortsatt orolig och nyckfull (Klaus *et al.*, 2013). De hästar som var seropositiva för USUV i Kroatien och Polen kunde inte kopplas till några kliniska symtom vid provtagningstillfället men då tidpunkten för infektion var okänd kunde klinisk sjukdom vid tidigare tillfälle inte uteslutas (Barbic *et al.*, 2013; Bazanów *et al.*, 2018). De prover som analyserats i den här studien kommer från hästar som sökt veterinärvård av olika anledningar. I nuläget finns dock ingen information insamlad om varför de sökt vård eller vilka symtom de uppvisat. Skulle de misstänkt positiva SMIA proverna visa sig vara positiva även i PRNT vore det av stort intresse att samla in denna information för att ta reda på om och vilka symtom hästarna uppvisat för de olika virusen.

## KONKLUSION

Studien har utförts med huvudsyftet att undersöka förekomst av antikroppar mot SINV hos hästar i Sverige då detta tidigare inte gjorts. Även förekomst av antikroppar mot flavivirusen TBEV, WNV och USUV har undersökts. Resultatet i denna studie visar att det finns misstänkt SMIA positiva prover för alla virus som analyserats. Dessa måste dock analyseras med ett PRNT test för påvisande av neutraliserande antikroppar mot respektive virus för att konfirmera att dessa är sant positiva fall. Om proverna är positiva i PRNT är det även av intresse att samla in information om de eventuella symtom som hästarna uppvisat för de olika virusen.

## POPULÄRVETENSKAPLIG SAMMANFATTNING

### Bakgrund

Det finns flera myggburna virus som orsakar sjukdom hos häst. Med myggburna virus menar man virus som sprids via bitt från myggor. Dessa virus tillhör framför allt genus *Alfavirus* inom familjen *Togaviridae* samt genus *Flavivirus* inom familjen *Flaviviridae*. Flera av dessa virus är zoonoser vilket innebär att de även kan orsaka sjukdom hos människa.

I Sverige finns ett virus som heter Sindbisvirus (SINV) som cirkulerar mellan fåglar och myggor. Detta innebär att fåglar och myggor sprider viruset mellan varandra genom att det hos fåglarna sker en uppförökning av viruset med en påföljande viremi (virus i blodet). Myggorna tar då upp viruset när de suger blod från fåglarna och sprider det sedan vidare när de biter en annan fågel. Fåglarna blir dock inte sjuka av viruset men på detta sätt kan viruset upprätthållas i ett visst område. SINV finns i många delar av världen och orsakar sjukdom hos människa i bland annat Sverige, Finland och Sydafrika och ger symtom som feber och ledvärk. I Sydafrika har viruset även kopplats samman med neurologiska symtom hos hästar. I Sverige går infektion med SINV hos människa under namnet Ockelbosjuka och är endemisk i de centrala delarna av Sverige. Att en sjukdom är endemisk innebär att den är begränsad till ett visst geografiskt område och fall i Sverige ses framför allt i Dalarnas, Gävleborgs och Västernorrlands län. SINV finns alltså i Sverige och orsakar sjukdom hos människor men huruvida viruset infekterar hästar i Sverige och om de i sådana fall utvecklar sjukdomssymtom är okänt. Huvudsyftet med studien var därför att undersöka förekomsten av antikroppar mot SINV hos hästar i Sverige. En antikropp är ett protein som bildas av kroppens immunförsvar för att upptäcka och känna igen främmande ämnen som kommer in i kroppen, till exempel ett virus. Har individen infekterats med viruset bör det därför ha antikroppar mot detta i blodet.

I studien undersöktes även förekomsten av antikroppar hos hästar i Sverige för tre andra virus. Dessa var Tick borne encephalitis virus (TBEV), West Nile virus (WNV) och Usutuvirus (USUV) som tillhör genus *Flavivirus*. TBEV, som sprids med fästingar, finns i Sverige och orsakar Tick borne encephalitis (TBE), även kallat fästingburen hjärninflammation, hos människor. Antalet hästar med antikroppar mot TBEV (seroprevalens) i Sverige och en eventuell sjukdomsbild är dock okänd. I Sverige har ännu inte några fall av WNV och USUV rapporterats från människor, myggor eller hästar. Dessa virus har dock under senare år spridit sig längre norrut i Europa och WNV kan orsaka allvarlig sjukdom hos både människor och hästar. Det var därför även av intresse att analysera dessa virus då övervakning är ett effektivt sätt att tidigt upptäcka nya virus i ett område eller land.

### Material och metoder

Provmaterialet som användes i studien var serumprover från hästar. Dessa samlades in från kliniska kemiska laboratoriet på universitetsdjursjukhuset (UDS) vid Sveriges Lantbruksuniversitet under perioden april-augusti. Proverna kom från patienter på hästkliniken på UDS samt var serumprover inskickade från veterinärer runtom i landet. Totalt 651 prover samlades in och information om datum då provet togs samt geografiskt område samlades in för varje prov. Proverna analyserades med en metod som kallas suspension multiplex immunoassay (SMIA) där

antigen (kroppsfrämmande ämne) kopplas till magnetiska kulor. Olika antigen och kulor används för varje virus och eventuella antikroppar i proverna binder sedan till antigenet på kulorna. Resultatet från SMIA erhålls sedan genom analys i ett Luminex-Magpix instrument. Instrumentet mäter en signal på hur mycket som bundit in till kulorna och resultatet ges som ett värde på Median Fluorescent Intensity (MFI). Separata värden på MFI för de olika virusen erhålls. Ett gränsvärde för misstänkt positiva SMIA resultat beräknades sedan för varje virus utifrån resultatet av värdena på MFI.

## Resultat och diskussion

Utifrån de gränsvärden som beräknades var i den här studien totalt 78 prover SMIA positiva för SINV, 216 prover SMIA positiva för TBEV samt 73 respektive 24 prover SMIA positiva för WNV och USUV. SMIA positiva prover erhålls alltså från alla virus som analyserades.

Något som dock är viktigt att poängtera är att positiva SMIA prover i denna studie inte innebär att de säkert är positiva för antikroppar mot viruset. Positiva prover i den här studien utgår från de gränsvärden som beräknats utifrån MFI-värdena för de olika virusen. Då inga liknande studier tidigare gjorts på häst i Sverige finns inga referensvärden. De misstänkt SMIA positiva proverna för de olika virusen måste därför konfirmeras. Utifrån dessa resultat kan sedan gränsvärdena komma att justeras och antalet SMIA positiva prov kommer då förändras.

Proverna grupperades efter län och hade en spridning från Norrbottens län i norr till Skåne län i söder. SMIA positiva prover för SINV kom från 17 olika län. Då Ockelbosjuka orsakat av SINV är endemiskt i Dalarnas, Västernorrlands samt Gävleborgs län skulle man kunnat misstänka att flest SMIA positiva prover skulle komma från dessa län. Högst antal misstänkta fall kom dock från Uppsala och Stockholms län men det fanns även flest insamlade prover från dessa län. Procentuellt sett fanns det fler SMIA positiva prover från Dalarnas, Västernorrlands och Gävleborgs län än från Uppsala län och Dalarnas och Gävleborgs län hade procentuellt sett även fler SMIA positiva prover än Stockholms län. Dock hade en jämnare fördelning av antal prover från respektive län varit önskvärd för att kunna dra någon slutsats av detta då positiva prover från ett län med ett väldigt lågt eller väldigt högt antal prover kan ge ett missvisande resultat.

SMIA positiva prover för TBEV kom från 17 olika län och för WNV och USUV kom proverna från 11 respektive 10 olika län. Fall av TBE hos människa har framför allt rapporterats i Uppsala, Stockholms, Södermanlands och Västra Götalands län men fall har rapporterats från Skåne upp till Gävleborgs län. Detta stämmer rätt väl överens med de områden där de SMIA positiva TBEV proverna kommer ifrån. Positiva fall av WNV och USUV skulle i första hand kunna misstänkas dyka upp i de södra delarna av Sverige då virusen sprider sig norrut i Europa och har påträffats hos hästar och fåglar i bland annat Tyskland. I somras upptäcktes det första fallet av Usutu i Sverige då viruset hittades hos en död koltrast på Öland. I denna studie fanns misstänkt positiva SMIA prover för WNV och USUV så långt norrut som Gävleborgs respektive Västergötlands län. Det som är viktigt att tänka på vid tolkning av resultatet är dock att det finns en signifikant korsreaktivitet mellan olika flavivirus varför det finns stor risk för falskt positiva resultat. Med korsreaktivitet menas att en antikropp som ursprungligen bildats mot ett antigen reagerar mot ett annat antigen som liknar det ursprungliga. Även här är det då av stor vikt att

dessa prover analyseras med ytterligare tester för att skilja på sant positiva fall och fall av korsreaktivitet. En annan aspekt av detta är också att det generellt sker en förflyttning av hästar i landet till exempel vid köp eller vid resa till olika tävlingar. Det går därför inte säkert att säga att dessa hästar infekterats i det län där de för närvarande bor. Denna slutsats kan man dra för alla virus som analyserats.

Sammanfattningsvis kan det sägas att resultatet i denna studie visar att hästar från många delar av Sverige eventuellt utsatts för en SINV infektion vilket är av intresse då detta tidigare bara visats hos hästar i Sydafrika. Resultatet i denna studie visar också att hästar i Sverige eventuellt utsatts för en infektion av TBEV, WNV och USUV. De misstänkt positiva proverna måste dock konfirmeras med ett ytterligare test. TBEV är känt att orsaka sjukdom hos människa men någon seroprevalens hos hästar finns inte beskrivet. Då WNV och USUV hittills inte rapporterats från Sverige skulle positiva resultat vara av stort intresse. Detta gäller framför allt WNV då detta virus kan orsaka allvarlig sjukdom hos både människor och hästar. Om proverna skulle visa sig vara positiva även i ett ytterligare test skulle det även vara av intresse att samla in information om de eventuella sjukdomssymtom som dessa hästar för respektive virus. WNV är känt att orsaka sjukdom hos häst och några fall finns rapporterade för SINV. Huruvida hästar med TBEV eller USUV infektion blir sjuka är dock inte helt klarlagt.



## **ACKNOWLEDGEMENT**

Jag vill tacka min handledare Anne-Lie Blomström samt min biträdande handledare Jenny Hesson för deras engagemang och synpunkter under arbetets gång. Ett stort tack även till Bengt Rönnerberg som lärde mig analysmetoden jag använt mig av samt för hjälp med beräkningar i arbetet.

## REFERENSLISTA

- Adams, A.P., Navarro-Lopez, R., Ramirez-Aguilar, F.J., Lopez-Gonzalez, I., Leal, G., Flores-Mayorga, J.M., Travassos da Rosa, A.P.A., Saxton-Shaw, K.D., Singh, A.J., Borland, E.M., Powers, A.M., Tesh, R.B., Weaver, S.C. & Estrada-Franco, J.G. (2012). Venezuelan equine encephalitis virus activity in the Gulf Coast region of Mexico, 2003–2010. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 6:e1875.
- Adouchief, S., Smura, Teemu., Sane, Jussi., Vapalahti, Olli. & Kurkela, Satu. (2016). Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Reviews in Medical Virology*, 26:221-241.
- Australian Government Department of Health (2019). *National Notifiable Diseases Surveillance System*. <http://www9.health.gov.au/cda/source/cda-index.cfm> [2019-10-30]
- Azuolas, J.K., Wishart, E., Bibby, S. & Ainsworth, C. (2003). Isolation of Ross River virus from mosquitoes and from horses with signs of musculo-skeletal disease. *Australian Veterinary Journal*, 81:344-347.
- Barba, M., Fairbanks, E.L. & Daly, J.M. (2019). Equine viral encephalitis: prevalence, impact, and management strategies. *Veterinary Medicine*, 10:99-110.
- Barbic, L., Vilibic-Cavlec, T., Listes, E., Stevanovic, V., Gjenero-Margan, I., Ljubin-Sternak, S., Pem-Novosel, I., Listes, I., Mlinaric-Galinovic, G., Di Gennaro, A. & Savini, G. (2013). Demonstration of Usutu virus antibodies in horses, Croatia. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13:772-774.
- Bażanów, B., Jansen van Vuren, P., Szymański, P., Stygar, D., Frącka, A., Twardoń, J., Kozdrowski, R. & Pawęska, J.T. (2018). A survey on West Nile and Usutu viruses in horses and birds in Poland. *Viruses*, doi:10.3390/v10020087. [2019-12-03]
- Bergqvist, J., Forsman, O., Larsson, P., Näslund, J., Lilja, T., Engdahl, C., Lindström, A., Gylfe, Å., Ahlm, C., Evander, M. & Bucht, G. (2015). Detection and isolation of Sindbis virus from mosquitoes captured during an outbreak in Sweden, 2013. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 15:133-140.
- Bonsdorff, C.H. & Harrison, S.C. (1975). Sindbis virus glycoproteins form a regular icosahedral surface lattice. *Journal of Virology*, 16:141-145.
- Brault, A.C., Powers, A.M., Chavez, C.L., Lopez, R.N., Cachón, M.F., Gutierrez, L.F., Kang, W., Tesh, R.B., Shope, R.E. & Weaver, S.C. (1999). Genetic and antigenic diversity among eastern equine encephalitis viruses from North, Central, and South America. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 61:579-586.
- Brown, C.M. & Timoney, P.J. (1998). Getah virus infection of Indian horses. *Tropical Animal Health and Production*, 30:241-252.
- Castillo-Olivares, J., Mansfield, K.L., Phipps, L.P., Johnson, N., Tearle, J. & Fooks, A.R. (2011). Antibody response in horses following experimental infection with West Nile virus lineages 1 and 2. *Transboundary and Emerging Diseases*, 58:206-212.
- Chapman, G.E., Baylis, M., Archer, D. & Daly, J.M. (2018). The challenges posed by equine arboviruses. *Equine Veterinary Journal*, 50:436-445.
- Cheng Holland, R., Kuhn, R.J., Olson, N.H., Rossmann, M.G., Choi, H.K., Smith, T.J. & Baker, T.S. (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*, 80:621-630.
- Chen, R., Mukhopadhyay, S., Merits, A., Bolling, B., Nasar, F., Coffey, L.L., Powers, A., Wever, S.C. & ICTV Report Consortium. (2018). ICTV virus taxonomy profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, 99:761-762.
- El-Hage, C.M., McCluskey, M.J. & Azuolas, J.K. (2008). Disease suspected to be caused by Ross River virus infection of horses. *Australian Veterinary Journal*, 86:367-370.

- Espmark, A. & Niklasson, B. (1984). Ockelbo disease in Sweden: epidemiological, clinical, and virological data from the 1982 outbreak. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33:1203-1211.
- Folkhälsomyndigheten (2018-04-11). *Sjukdomsinformation om TBE*. <https://www.folkhalsomyndigheten.se/smittskydd-beredskap/smittsamma-sjukdomar/tick-borne-encephalitis-tbe/> [2019-11-06]
- Fukunaga, Y., Kumanomido, T. & Kamada, M. (2000). Getah virus as an equine pathogen. *The Veterinary Clinics of North America. Equine Practice*, 16:605-617.
- Go, Y.Y., Balasuriya, U.B.E. & Lee, C.K. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, 3:58-77.
- Gummow, B., Tan, Rhh., Joice, R.K., Burgess, G. & Picard, J. (2018). Seroprevalence and associated risk factors of mosquito-borne alphaviruses in horses in northern Queensland. *Australian Veterinary Journal*, 96:243-251.
- Gylfe, Å., Ribers, Å., Forsman, O., Bucht, G., Alenius, G-M., Wållberg-Jonsson, S., Ahlm, C. & Evander, M. (2018). Mosquitoborne Sindbis virus infection and long-term illness. *Emerging Infectious Diseases*, 24:1141-1142.
- Haglund, M., Vene, S., Forsgren, M., Günther, G., Johansson, B., Niedrig, M., Plyusnin, A., Lindquist, L. & Lundkvist, Å. (2003). Characterisation of human tick-borne encephalitis virus from Sweden. *Journal of Medical Virology*, 71:610-621.
- Harley, D., Sleigh, A. & Ritchie, S. (2001). Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clinical Microbiology Reviews*, 14:909-932.
- Hesson, J.C., Rettich, F., Merdić, E., Vignjević, G., Östman, Ö., Schäfer, M., Schaffner, F., Fous-sadier, R., Besnard, G., Medlock, J., Scholte, E.J. & Lundström, J.O. (2014). The arbovirus vector *Culex torrentium* is more prevalent than *Culex pipiens* in northern and central Europe. *Medical and Veterinary Entomology*, 28:179-186.
- Hesson, J.C., Verner-Carlsson, J., Larsson, A., Ahmed, R., Lundkvist, Å. & Lundström, J.O. (2015). *Culex torrentium* mosquito role as major enzootic vector defined by rate of Sindbis virus infection, Sweden, 2009. *Emerging Infectious Diseases*, 21:875-878.
- Hesson, J.C., Östman, Ö., Schäfer, M. & Lundström, J.O. (2011). Geographic distribution and relative abundance of the sibling vector species *Culex torrentium* and *Culex pipiens* in Sweden. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11:1383-1389.
- Hirsch, R.L. & Griffin, D.E. (1979). The pathogenesis of Sindbis virus infection in athymic nude mice. *The Journal of Immunology*, 123:1215-1218.
- International Committee on Taxonomy of Viruses (2019). *Taxonomy*. <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> [2019-09-12]
- Kamada, M., Kumanomido, T., Wada, R., Fukunaga, Y., Imagawa, H. & Sugiura, T. (1991). Intranasal infection of Getah virus in experimental horses. *Journal of Veterinary Medical Science*, 53:855-858.
- Kamada, M., Wada, R., Kumanomido, T., Imagawa, H., Sugiura, T. & Fukunaga, Y. (1991). Effect of viral inoculum size on appearance of clinical signs in equine Getah virus infection. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 53:803-806.
- Klaus, C., Hörügel, U., Hoffman, B. & Beer, M. (2013). Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in horses: clinical and laboratory findings and epidemiological investigations. *Veterinary Microbiology*, 163:368-372.
- Kumar, B., Manuja, A., Gulati, B.R., Virmani, N. & Tripathi, B.N. (2018). Zoonotic viral diseases of equines and their impact on human and animal health. *The Open Virology Journal*, 12:80-98.

- Kurkela, S., Rätti, O., Huhtamo, E., Uzcátegui, N.Y., Nuorti, J.P., Laakkonen, J., Manni, T., Hella, P., Vaheri, A. & Vapalahti, O. (2008). Sindbis virus infection in resident birds, migratory birds, and humans, Finland. *Emerging Infectious Diseases*, 14:41-47.
- Laine, M., Vainionpää, R., Oksi, J., Luukkainen, R. & Toivanen, A. (2003). The prevalence of antibodies against Sindbis-related (Pogosta) virus in different parts of Finland. *Rheumatology*, 42:632-636.
- Lindström, A. & Lilja, T. (2018). First finding of the West Nile virus vector *Culex modestus* Ficalbi 1889 (Diptera; Culicidae) in Sweden. *Journal of the European Mosquito Control Association*, 36:1-2.
- Ling, J., Smura, T., Lundström, J.O., Pettersson, JH-O., Sironen, T., Vapalahti, O., Lundkvist, Å. & Hesson, J.C. (2019). Introduction and dispersal of Sindbis virus from central Africa to Europe. *Journal of Virology*, 93:e00620-19.
- Lu, G., Ou, J., Ji, J., Ren, Z., Hu, X., Wang, C. & Li, S. (2019). Emergence of Getah virus infection in horse with fever in China, 2018. *Frontiers in Microbiology*, 10:1416.
- Lundström, J.O., Hesson, J.C., Schäfer, M.L., Östman, Ö., Semmler, T., Bekaert, M., Weidmann, M., Lundkvist, Å. & Pfeffer, M. (2019). Sindbis virus polyarthritis outbreak signalled by virus prevalence in the mosquito vectors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 13: e0007702.
- Lundström, J.O., Lindström, K.M., Olsen, B., Dufva, R. & Krakower, D.S. (2001). Prevalence of Sindbis virus neutralizing antibodies among Swedish passerines indicates that thrushes are the main amplifying hosts. *Journal of Medical Entomology*, 38:289-297.
- Lundström, J.O. & Pfeffer, M. (2010). Phylogeographic structure and evolutionary history of Sindbis virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 10:889-907.
- Lundström, J.O., Turell, M. J. & Niklasson, B. (1992). Antibodies to Ockelbo virus in three orders of birds (Anseriformes, Galliformes and Passeriformes) in Sweden. *Journal of Wildlife Diseases*, 28:144-147.
- Lundström, J.O., Turell, M. J. & Niklasson, B. (1993). Viremia in three orders of birds (Anseriformes, Galliformes and Passeriformes) inoculated with Ockelbo virus. *Journal of Wildlife Diseases*, 29:189-195.
- Lundström, J.O., Vene, S., Espmark, A., Engvall, M. & Niklasson, B. (1991). Geographical and temporal distribution of Ockelbo disease in Sweden. *Epidemiology and Infection*, 106:567-574.
- MacLachlan, J.N. & Dubovi, E.J. (2011). *Fenner's Veterinary Virology*. 4. ed. San Diego: Academic Press.
- Michel, F., Fischer, D., Eiden, M., Fast, C., Reuschel, M., Müller, K., Rinder, M., Urbaniak, S., Brandes, F., Schwehn, R., Lühken, R., Groschup, M.H. & Ziegler, U. (2018). West Nile virus and Usutu virus monitoring of wild birds in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, doi: 10.3390/ijerph15010171. [2019-12-02]
- Nemoto, M., Bannai, H., Tsujimura, K., Kobayashi, M., Kikuchū, T., Yamanaka, T. & Kondo, T. (2015). Getah virus infection among racehorses, Japan, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21:883-885.
- Niklasson, B., Espmark, Å., LeDuc, J.W., Gargan, T.P., Ennis, W.A., Tesh, R.B. & Main Jr, A.J. (1984). Association of a Sindbis-like virus with Ockelbo disease in Sweden. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33:1212-1217.
- Niklasson, B. & Vene, S. (1996). Vector-borne viral diseases in Sweden-a short review. *Archives of Virology*, 11:49-55.
- OIE-World organisation for animal health (2019). *Terrestrial manual*. <https://www.oie.int/standardsetting/terrestrial-manual/access-online/> [2019-10-04]

- Pauvolid-Corrêa, A., Juliano, R.S., Campos, Z., Velez, J., Nogueira, R.M. & Komar, N. (2015). Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 110:125-133.
- Pauvolid-Corrêa, A., Tavares, F.N., da Costa, E.V., Burlandy, F.M., Murta, M., Pellegrin, A.O., Nogueira, M.F. & da Silva, E.E. (2010). Serologic evidence of the recent circulation of Saint Louis encephalitis virus and high prevalence of equine encephalitis viruses in horses in the Nhecolândia sub-region in South Pantanal, Central-West Brazil. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 105:829-833.
- Phinney, B.S., Blackburn, K. & Brown, D.T. (2000). The surface conformation of Sindbis virus glycoproteins E1 and E2 at neutral and low pH, as determined by mass spectrometry-based mapping. *Journal of Virology*, 74:5667-5678.
- Rizwan, M., Rönnerberg, B., Cistjakovs, M., Lundkvist, Å., Pipkorn, R. & Blomberg, J. (2016). Serology in the digital age: using long synthetic peptides created from nucleic acid sequences as antigens in microarrays. *Microarrays*, doi 10.3390/microarrays5030022. [2019-10-13]
- Rocheleau, J-P., Arsenault, J., Lindsay, R.L., DiBernardo, A., Kulkarni, M.A., Côté, N. & Michel, P. (2013). Eastern equine encephalitis virus: high seroprevalence in horses from Southern Quebec, Canada, 2012. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, 13:712-718.
- Rushton, J.O., Lecollinet, S., Hubálek, Z., Svobodová, P., Lussy, H. & Nowotny, N. (2013). Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011. *Emerging Infectious Diseases*, 19:635-637.
- Sane, J., Guedes, S., Kurkela, S., Lyytikäinen, O. & Vapalahti, O. (2010). Epidemiological analysis of mosquito-borne Pogosta disease in Finland, 2009. *Eurosurveillance*, 14:15(2).
- Silva, M.L.C.R., Galiza, G.J.N., Dantas, A.F.M., Oliveira, R.N., Iamamoto, K., Achkar, S.M. & Riet-Correa, F. (2011). Outbreaks of Eastern equine encephalitis in northeastern Brazil. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 23:570-575.
- Spickler, A.R. (2017). *Getah virus infection*. <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/factsheets.php> [2019-10-30]
- Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). (2019-02-19). *West Nile Virus (WNV) hos häst*. <https://www.sva.se/djurhalsa/hast/infektionssjukdomar-hast/west-nile-virus-hast> [2019-11-06]
- Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA). (2019-08-22). *Fågelprojekt upptäckte virus*. <https://www.sva.se/om-sva/pressrum/nyheter-fran-sva/fagelprojekt-upptackte-virus> [2019-11-22]
- Storm, N., Weyer, J., Markotter, W., Kemp, A., Leman, P.A., Dermaux-Msimang, V., Nel, L.H. & Paweska, J.T. (2014). Human cases of Sindbis fever in South Africa, 2006–2010. *Epidemiology & Infection*, 142:234-238.
- Strauss, J.H. & Strauss, E.G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, 58:491-562.
- Studdert, M.J., Aзуolas, J.K., Vasey, J.R., Hall, R.A., Ficorilli, N. & Huang, J-A. (2003). Polymerase chain reaction tests for the identification of Ross River, Kunjin and Murray Valley encephalitis virus infections in horses. *Australian Veterinary Journal*, 81:76-80.
- Taylor, K.G. & Paessler, S. (2013). Pathogenesis of Venezuelan equine encephalitis. *Veterinary Microbiology*, 167:145-150.
- van Niekerk, S., Human, S., Williams, J., van Wilpe, E., Pretorius, M., Swanepoel, R. & Venter, M. (2015). Sindbis and Middelburg old world alphaviruses associated with neurologic disease in horses, South Africa. *Emerging Infectious Diseases*, 21:2225-2229.
- Vene, S., Franzén, C. & Niklasson, B. (1994). Development of specific antibody patterns and clinical symptoms following Ockelbo virus infection. *Archives of Virology*, 134:61-71.
- Viralzone (2019). *Alphavirus*. [https://viralzone.expasy.org/625?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species) [2019-10-25]

- Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Hendrickson, C.R., Junglen, S., Knowles, N.J., Kropinski, A.M., Krupovic, M., Kuhn, J.H., Nibert, M., Rubino, L., Sabanadzovic, S., Simmonds, P., Varsani, A., Zerbini, F.M. & Davidson, A.J. (2019). Changes to virus taxonomy and the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology*, 164:2417-2429.
- Walton, T.E., Alvarez, O., Buckwalter, R.M. & Johnson, K.M. (1973). Experimental infection of horses with enzootic and epizootic strains of Venezuelan equine encephalomyelitis. *The Journal of Infectious Diseases*, 128:271-282.
- Ziegler, U., Lühken, R., Keller, M., Cadar, D., van der Grinten, E., Michel, F., Albrecht, K., Eiden, M., Rinder, M., Lachmann, L., Höper, D., Vina-Rodriguez, A., Gaede, W., Pohl, A., Schmidt-Chanasit, J. & Groschup, M.H. (2019). West Nile virus epizootic in Germany, 2018. *Antiviral Research*, 162:39-43.