

# **En uppföljning av analysresultat av EAV (serologi och virus) på seminhingstar i Sverige år 2002 och 2005.**

**Emelie Strand**

**Handledare: Anne-Marie Dalin  
Inst. för kliniska vetenskaper, avd för  
komparativ reproduktion, obstetrik och juverhälsa.  
och  
Louise Treiberg Berndtsson  
SVA- avd för virologi**

---

**Sveriges lantbruksuniversitet**

**Examensarbete 2006:29**

**Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap**

**ISSN 1652-8697**

**Uppsala 2006**

**Veterinärprogrammet**

## **INNEHÅLLSFÖRTECKNING**

<b><u>SAMMANFATTNING .....</u></b>	<b><u>2</u></b>
<b><u>INLEDNING.....</u></b>	<b><u>3</u></b>
NATIONELLA OCH INTERNATIONELLA FÖRESKRIFTER OM EVA .....	3
ETIOLOGI .....	4
EPIDEMIOLOGI .....	4
PATOGENES .....	6
KLINISK BILD.....	7
DIAGNOSTIK .....	8
BEHANDLING.....	9
BEKÄMPNING.....	9
<b><u>SYFTE MED STUDIEN.....</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>MATERIAL OCH METODER.....</u></b>	<b><u>11</u></b>
<b><u>RESULTAT .....</u></b>	<b><u>12</u></b>
SVENSKT HALVBLOD .....	12
VARMBLODIG TRAVARE .....	12
KALLBLODSTRAVARE.....	13
ENGELSKT FULLBLOD.....	13
SAMMANFATTANDE RESULTAT .....	14
<b><u>DISKUSSION .....</u></b>	<b><u>15</u></b>
<b><u>TACK .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>ABSTRACT .....</u></b>	<b><u>17</u></b>
<b><u>REFERENSER.....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>BILAGA 1 TERRESTRIAL ANIMAL HEALTH CODE – 2005 OIE .....</u></b>	<b><u>20</u></b>

## **SAMMANFATTNING**

EVA, ekvint virusarterit, diagnostiserades första gången i USA 1953. Sjukdomen uppmärksammades internationellt för första gången 1984, pga. flera utbrott av sjukdomen på fullblodsstuterier i USA. EAV, ekvint arterit virus, är ett RNA virus som ingår i familjen Arteriviridae. Det finns bara en serotyp av EAV men flera olika stammar. EAV smittar på två olika sätt: dels genom luftburen smitta (via smittförande aerosoler) och dels genom venerisk smitta (via sperma innehållande virus). Hingstar blir ofta kroniska smittbärare. För att diagnostisera EAV kan antingen antikroppar med hjälp av serologi påvisas eller virus med hjälp av t ex PCR teknik. Sedan 1996 finns sjukdomen med i den svenska hästseminföreskriften. Där föreskrivs att alla hingstar som verkar via semin ska provtas innan betäckningssäsongen. Provtagningen skall göras med hjälp av serologi och vid en positiv titer ska spermavprov lämnas för virusisolering. I Sverige tillåter vi att hingstar som utsöndrar virus att verka i avel.

Syftet med examensarbetet var att undersöka om föreskriven provtagning på seminhingstar efterföljs i Sverige, att undersöka prevalensen EAV hos seminhingstar för år 2002 och år 2005, samt att jämföra resultaten med tidigare resultat, från 1999. För uppgifter om antal hingstar med betäckningstillstånd inom semin insamlades data från avelsföreningarna, ASVH, STC och SGC för år 2002 och år 2005. Raserna som undersöktes var Svenskt Halvblod, Kallblodig och Varmblodig travare samt Engelskt Fullblod. Hingstarnas provtagningsresultat avseende EAV kontrollerades i SVA:s journalhanteringssystem och därefter bearbetades materialet.

Prevalensen för EAV varierade för de olika raserna och den ras som hade högst prevalens var de varmlodiga travarna. Prevalensen serologiskt positiva minskade från 43 % 1999 till 28 % år 2005. Provtagningsfrekvensen varierade hos rasen mellan åren, år 1999 provtogs 82 %, 2002 provtogs 92 % och 2005 provtogs 81 % av hingstarna som användes i semin. Hos de kallblodiga travarna och de svenska halvbloden var provtagningsfrekvenserna högre och prevalenserna serologiskt positiva lägre. För de engelska fullblodshingstarna startade provtagningen under år 2005, ett krav som deras avelsförening satt upp. De hingstar som var serologiskt positiva var alla vaccinerade i de land som de importerats ifrån. År 2005 fanns bara två hingstar (varmlodiga travare) som var viruspositiva i sperman. Resultaten visar att, trots att vi i Sverige tillåtit hingstar med EAV i sperman att verka i aveln, har inte andelen serologiskt positiva hingstar ökat. EAV har heller inte diagnostiserat vid abort. Den obligatoriska provtagningen av hingstar i semin har lett till en minskad prevalens av EAV både serologiskt och virus positiva hingstar

## INLEDNING

Ekvint virusarterit (EVA) är en sjukdom som drabbar alla typer av hästar och orsakar respiratoriska symtom samt abort. Sjukdomen orsakas av ekvint arterit virus (EAV). Det internationella intresset för sjukdomen ökade efter ett epizootiskt utbrott med aborter på fullblodsstuterier, där stona saknade skydd mot sjukdomen. Detta skedde år 1984 i Kentucky, USA. Flera tidigare serologiska studier hade visat att antikroppar var spridda i hästpopulationen, trots få utbrott av sjukdomen. EAV virus sprids med symtomlösa smittbärare, ex. från hingstar som har EAV i sperma.

Utbrott av sjukdomen har setts i USA, Schweiz, Österrike, Polen, Canada, Italien, Frankrike och Storbritannien. Serologiskt positiva hästar finns dock i alla länder där undersökningar har utförts. Vid utbrott av EVA har de flesta raser varit inblandade. I många länder är dock prevalensen seropositiva hästar betydligt högre bland varmblodiga travare än bland engelska fullblod. Antikroppar har även hittats hos åsna och zebra (Timoney et al, 1996).

I Sverige har sjukdomen diagnostiserats hos ett fåtal hästar, men aldrig vid abort (Treiberg - Berndtsson, 1998). En undersökning som gjordes år 1988 av Klingeborn et al visade en stor rasvariation vad det gäller antal hästar som varit utsatta för smitta. Högst prevalens seropositiva hästar (80 %) fanns bland varmblodiga travare, där 20 % av avelshingstarna testades. I samma studie redovisades resultat från obducerade aborterade foster avseende EAV. Alla foster var negativa. En ny sammanställning av provtagningsresultat hos varm- och kallblodig travare gjordes år 1999, prevalensen serologiskt positiva var då 42,7 % hos varmblodig travare och 11,1 % hos kallblodig travare (Treiberg- Berndtsson, 1999). I en studie som Albihn och medarbetare utförde (1998-1999 opublicerat) där abortorsaker hos 32 aborterade foster undersöktes, var inget prov positivt avseende EAV (testade med nested reverse-transcriptase PCR).

### ***Nationella och internationella föreskrifter om EVA***

I ett flertal länder, t.ex. Australien, Irland och Storbritannien, tillåts inte virusbärande hingstar att verka i avel (Treiberg -Berndtsson, 1998). I Sverige har vi haft föreskrifter om provtagning angående EAV sedan år 1996. Enligt Statens jordbruksverks föreskrifter om seminverksamhet med hästdjur (1999:113, M4) gäller följande:

”Hingst skall inom 60 dagar före det att spermasamlingsperioden påbörjas undersökas serologiskt avseende förekomst av Ekvint Virusarterit. Hingst som visar positiv antikroppstiter skall provtas avseende förekomst av EAV-virus i sperman. Om det i seminverksamhet används sperma med förekomst av EAV-virus skall anordnaren ange att sådan förekomst föreligger.

Sperma med negativt analysresultat avseende förekomst av EAV från serologiskt positiv hingst får inte betecknas som fri från EAV”.

I Sverige kontrolleras att föreskriften följs på olika sätt av avelsförbunden. Avelsföreningen för Svenska Varmblodiga Hästen, ASVH, kontrollerar provtagningen centralt innan betäckningslicens kan lösas (ASVH personligt meddelande, 2005). Inom Svenska Travsportens Centralförbund, STC, har man valt att lägga ansvaret för provtagningen på ansvarig stuteriveterinär och därför görs ingen uppföljning centralt (STC personligt meddelande, 2005)

För internationell handel med sperma eller häst finns särskilda regler, dessa regleras av OIE, "Office International des Epizooties". För de fullständiga reglerna se bilaga 1.

Vid import av avelshingst skall ett intyg medfölja. Intyget ska visa att:

- Hingsten inte uppvisat några kliniska symtom på EVA, att han har provtagits avseende EAV vid två tillfällen innan avresa eller är vaccinerad regelbundet. Vid positivt testresultat tillämpas testparning eller virusisolering från sperman.

Vid import av transport sperma eller fryst sperma krävs ett intyg, som ska visa att:

- Hingsten stått uppstallad i en anläggning där inga hästar visat symtom på EVA. Hingsten ska vara vaccinerad regelbundet eller vara blodprovtagen innan sperma samling. Hingsten får inte samtidigt användas till naturlig betäckning. Vid positivt testresultat tillämpas testparning eller virusisolering från sperman.

### ***Etiologi***

Historiska dokument tyder på att sjukdomen vi nu kallar EVA har funnits sedan 1800-talet. Första gången viruset isolerades var år 1953. Viruset fanns i lungvävnad hos ett aborterat foster. Detta skedde under ett utbrott med aborter på ett stuteri i Bucyrus, Ohio. Hästarna hade då även respiratoriska symtom (Murphy et al, 1999).

EAV tillhör familjen Arteriviridae, vilket även Porcine Respiratory and Reproductive Syndrome (PRRS) gör. PRRS är en allvarlig sjukdom som orsakar epidemiska aborter och respiratoriska symtom hos gris. Det finns ytterliggare två virus i samma familj. Ett som drabbar möss (Lactate Dehydrogenase-Elevating Virus) och ett som drabbar apor (Simian Hemorrhagic Fever Virus). Vironerna är sfäriska (50-70 nm i diameter) positiva RNA-virus, som replikeras i cytoplasma, oftast i makrofager. Alla arterivirus kan ge asymtomatiska smittbärare hos sitt naturliga värdjur, men kan orsaka allvarlig sjukdom under speciella förhållanden (Murphy et al, 1999).

EAV har endast en serotyp men flera olika stammar. Stammarna har olika virulens. För att avgöra stammarnas olika virulens gjorde Moore et al (2003) en studie. Stammarna odlades på två olika celltyper, EEC resp. RK-13. Studien visade att virulensen var lättare att bestämma på den ena celltypen (EEC). Det säkraste sättet att avgöra virulens är dock fortfarande att inokulera virus på levande hästar.

### ***Epidemiologi***

De två viktigaste smittvägarna för EVA-virus är:

- från luftvägarna hos en akut infekterad häst, genom överföring av sekret med infekterade aerosoler.
- venerisk smitta, där smittan sker med sperma innehållande virus från en akut eller kroniskt smittad hingst.

Den största smittspridningen sker via aerosoler, dvs. som luftburen smitta. Detta har visats vid både naturlig och experimentell infektion och är den troligaste smittvägen vid utbrott på trav och galoppbanor. Under den akuta fasen av sjukdomen är spridningsvägar via sekret från vagina, urin och faeces av mindre betydelse. Virus finns i sekret från luftvägarna i mellan 7 - 14 dagar. En annan potentiell smittkälla är virus från aborterade foster, fostervatten, fosterhinnor och placenta. Det krävs dock direktkontakt för smittöverföring (Timoney och McCollum, 1993). EAV kan också spridas indirekt via utrustning. Ju mindre fysisk kontakt

det finns mellan hästar, desto mindre risk för smitta via den respiratoriska vägen (Timoney et al 1996).

Inkubationstiden varierar beroende på smittväg och är mellan 3 och 13 dagar. Vid respiratorisk smitta är inkubationstiden kortare, mellan 48 och 72 timmar. Om smittvägen är venerisk kan inkubationstiden vara upp till 13 - 14 dagar med ett medel på 7 dagar. En högre smittdos ger en kortare inkubationstid (Timoney et al, 1996).

En stor smittkälla är troligen hingstar som är virusbärare (Timoney et al 1996). En hög andel, ca 30 till 60 % av de hingstar som smittas blir virusbärare. Virus överlever i de accessoriska könskörtlarna, primärt i ampullae ductus deferens, samt sekundärt i sädesblåsorna och i nedre urinvägarna. De hingstar som kroniskt urskiljer virus i sperman, smittar endast veneriskt, dvs. via virus i sperman och inte via luftvägar (Timoney och McCollum, 1993), men lateral smitta kan förekomma, se nedan.

Man kan dela upp de hingstar som sprider virus i tre kategorier:

- "Korttidsurskiljare" - de hingstar som urskiljer virus i sperma i två till fem veckor efter akut infektion.
- "Intermediärtidsurskiljare"- de hingstar som urskiljer virus i 3,5 till sju eller åtta månader efter en akut infektion.
- "Långtidsurskiljare" - de hingstar som urskiljer virus i flera år. Studier har visat att hingstar kan urskilja virus i åtminstone i elva år (Timoney et al, 1996).

Alla hingstar som urskiljer virus är serologiskt positiva, men kan dock ha låga titrar (Timoney et al, 1996). Ett avvikande fall har dock påträffats i Sverige. En hingst var serologiskt negativ vid flera testtillfällen. I december 2001 undersöktes av misstag ett sperma prov från denna hingst som gav positivt utslag med PCR. Hingsten hade virus i sperma vid ytterliggare två tillfällen under år 2002, för att sedan bli negativ vid ytterliggare flera testtillfällen. (Treiberg Berndtsson et al, 2004). Ston, valacker eller prepubertala hingstar blir inte kroniska bärare av EAV eftersom bärarstadiet är androgen beroende (Timoney et al, 1996)

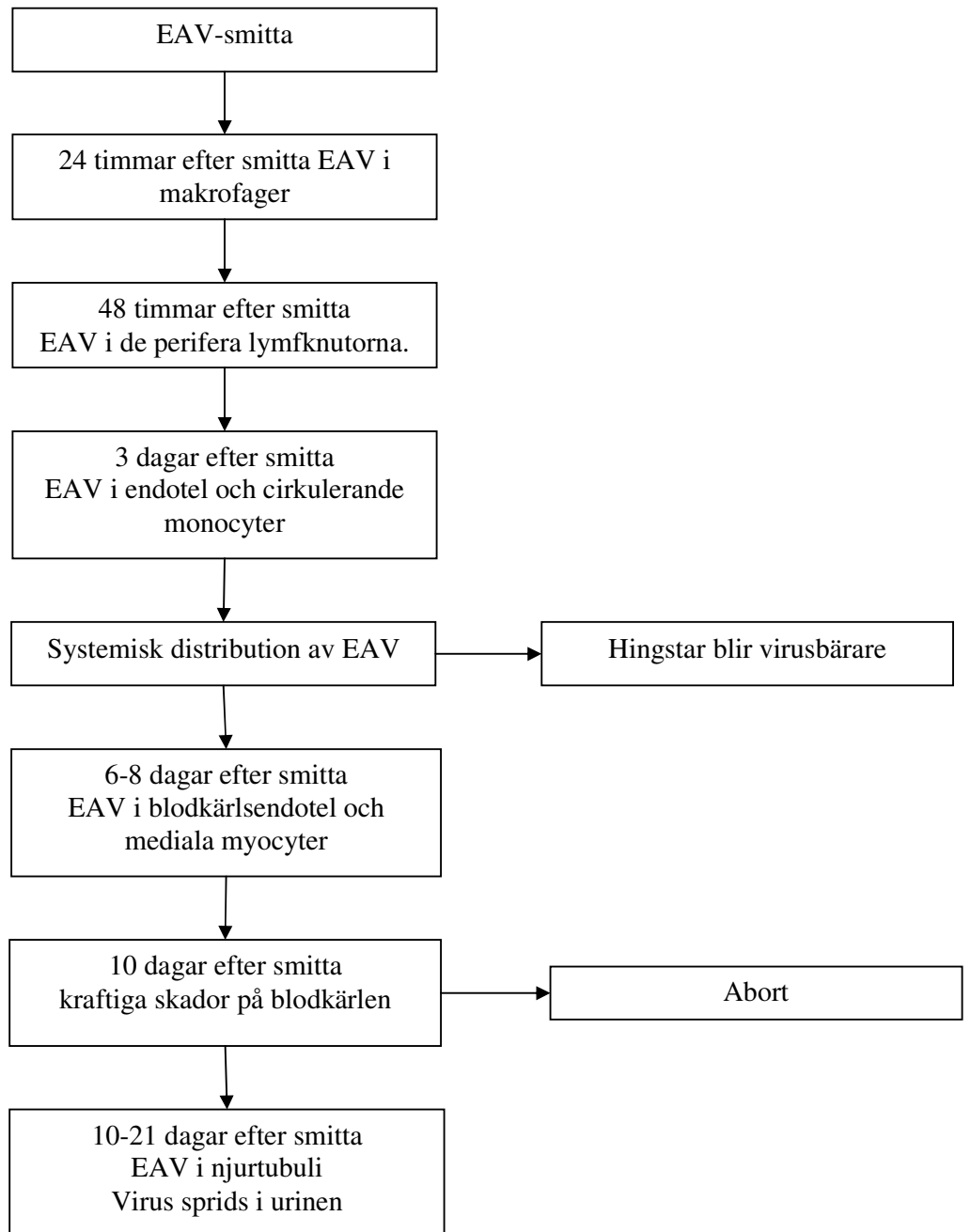
En studie som Timoney och McCollum (2000) gjorde på hingstar i USA och Kanada visade att av de hingstar som hade virus i sperma var mer än 70 % varmblodiga travare. Studien visade också att ingen av de hingstar som blivit vaccinerade hade virus i sperma. Man fann inga fall där virus urskiljdes intermittent, inte heller någon årstidsvariation kunde visas.

På Lippizaner Center i Sydafrika har man för första gången kunnat visa att EAV kan smitta lateralt, dvs. från hingstar som är kroniska bärare till andra hingstar. Här hade en hingst som utsöndrat virus i sperma under många år, smittat 6 andra hingstar, detta trots totalt avelsförbud. Genom fylogentiska studier av virus från de smittade hingstarna kunde lateral smitta mellan hingstarna konfirmeras. Den stam av EAV som orsakat detta var troligen unik. Smittan har troligen skett indirekt via utrustning eller strömedel (Guthrie et al, 2003).

Följden av veneriska smittan undersöktes av Cole et al (1986). I denna undersökning hade man fyra seronegativa ston som betäcktes med hingstar som var bärare av virus. Dessa fyra ston introducerades sedan till 14 andra seronegativa ston som var dräktiga, mellan fyra och sju dräktighetsmånader. De dräktiga stona fick feber, men tiden från smittillfället varierade, från 3 till 28 dagar. Alla ston serokonverterade mellan 17 och 28 dagar efter smittillfället. Tio av de fjorton stona (71 %) aborterade mellan 23 och 57 dagar efter smittillfället. Studien visade därför att en venerisk smitta via betäckta ston kan respiratoriskt spridas vidare.

## Patogenes

Den luftburna smittan har följande patogenes:

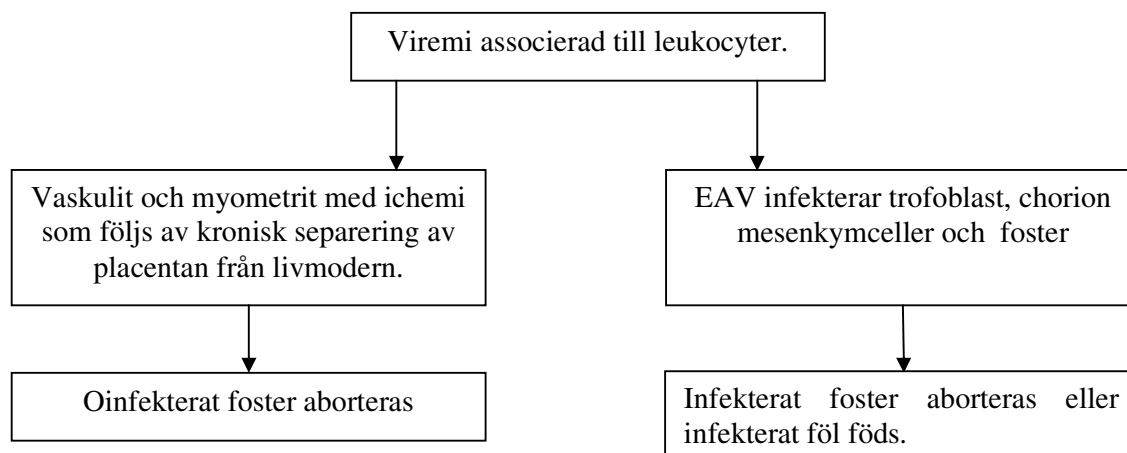


(Del Piero, 2000).

Skadorna på blodkärlen som viruset orsakar beror troligen på en kombination av olika faktorer. Virusets lokalisation till blodkärlen främst via endotelceller och myocyter medför en direkt cytopatisk effekt. Skadorna på endotelcellerna kan i sin tur ge anoxi och tromboser (Del Piero, 2000).

Vid ett försök infekterades sex ston experimentellt med EAV intravenöst. Fyra av stona dog eller avlivades av infektionen. Dessa ston hade generaliserade skador på blodkärlen i form av nekros och degeneration. Placentan satt fortfarande vid livmoderväggen. Två av dem hade inga förändringar i livmodern. De andra hade hyperemiska livmödrar. I endometriet sågs vakuoler i epitelet och i submukosan sågs en infiltration av neutrofiler och makrofager. De två överlevande stona fick endast en kortare feberperiod, ett av stona aborterade. Författarna ansåg att stoet aborterade pga. en myometrit, i kombination med minskat blodflöde till placentan och fostret, pga. stas i blodkärlen. En möjlig bidragande orsak kan ha varit en minskning i progesteronproduktionen från den skadade placentan samt en lokal frisättning av prostaglandiner (Coignoul och Cheville, 1984).

Vid abort kan fostret antingen vara negativt eller positivt vad gäller virusförekomst. Enligt Del Piero (2000) kan patogenesen vara följande:



### **Klinisk bild**

Sjukdomen kan förlöpa subklinisk eller ge en eller flera av följande symtom:

- Feber
- Nedsatt AT
- Anorexi
- Leukopeni
- Lymfangit
- Stel gång
- Tårflöde och konjunktivit.
- Rhinit
- Ödem runt ögonen eller ventralt, kring scrotum eller preputiet hos hingst och runt juvret hos ston.
- Urtikaria
- Abort

(Del Piero, 2000).



De flesta hästar blir friska efter genomgången viremi, men dödsfall har rapporterats hos ff. a föl och åringar. Döden orsakas av en snabbt spridd bronkointerstitiell pneumoni och nekros i interstitiet (Murphy et al, 1999).

Det vanligaste symtomet hos ston som smittas veneriskt eller aerogent är en feberperiod. Denna inträder snabbare hos de ston som smittas veneriskt (Cole et al. 1986). Vid naturlig aerogen smitta aborterar mellan 10 % och upp till 60 % av dräktiga ston (Timoney och McCollum, 1993). Deras symtom under den febrila fasen kan vara så lindriga att de missas och abort blir det enda som noteras (Cole et al. 1986).

Fertilitetsproblem efter genomgången infektion har inte observerats hos sto, medan hingstar kan drabbas av en tillfällig infertilitet. Den minskade spermiekvaliteten och kvantiteten beror troligen på hypertermi i scrotum som orsakas av febern. Inga långtidseffekter på spermiekvaliteten har observerats hos naturligt infekterade kroniska bärare (Murphy et al, 1999).

### **Diagnostik**

EVA kan inte diagnostiseras enbart på kliniska symtom, eftersom ett antal andra infektiösa sjukdomar som drabbar häst kan likna EVA i symtombild, t.ex. infektion med herpesvirus 1 eller 4, hästinfluensa, infektiös anemi eller afrikansk hästpest. Därför måste diagnosen konfirmeras med diagnostiska metoder (Timoney och McCollum, 1993).

### **Patologi**

Makroskopiskt ses vid obduktion vaskulära förändringar, vanligen ödem och blödningar i subkutan vävnad, lymfknotor och i vicera. Även vätska i kroppshåligheterna förekommer. På ston som har aborterat ses ett diffust ödem och blödningar i livmoderslemhinnan. Eftersom blodkärlen är virusets primära angreppspunkt, ses mikroskopiska förändringar i många organ. Milda förändringar innebär ödem i och runt kärl. Kraftiga förändringar innebär en vaskulit med fibrinoid nekros av tunica media, infiltration av ff. a. lymfocyter, men även granulocyter (Del Piero, 2000).

I en undersökning av Szeredi et al (2005) där åtta aborterade foster obducerades såg man att hälften av fostren var utan makroskopiska förändringar. Övriga foster hade en eller flera av följande förändringar: ödem i subcutis, petekiella blödningar i pleura och epicardium, kollapsade och missfärgade lungor respektive ökad mängd vätska med fibrin i pleura. Undersökningen visar också att aborterade foster ofta har serokonverterat. En del föl kan ha antikroppar mot EAV före de fått råmjölk, detta talar också för in utero infektion (Del Piero, 2000).

I motsats till ovan angav Timoney och McCollum (1993) att vid abort pga. EVA-infektion var ofta foster som aborterats autolyserade samt utan patognomona förändringar.

### **Virologi**

För att påvisa virus kan olika metoder användas, exempelvis PCR, virusisolering, immunohistokemi eller andra molekylärbioologiska metoder (Del Piero, 2000). Den snabba utvecklingen inom PCR har lett till att "real time" PCR nu är den snabbaste och känsligaste analysmetoden (Belák och Thorén, 2001).

För att diagnostisera EAV hos aborterade foster är immunohistokemi och PCR att föredra framför virusisolering. Detta visade en undersökning där man provtagit 96 aborterade foster i Ungern mellan 1998 och 2000. I undersökningen var alla aborterna sporadiska, utom på en gård där aborterna blev epidemiska. Detta berodde troligen på att populationen på denna gård aldrig tidigare hade kommit i kontakt med viruset, dvs. var seronegativ (Szerdi et al, 2005).

Påvisande av antikroppar mot EAV görs med serologiska metoder. Den metod som OIE rekommenderar är SN, serum-neutralisationstest (Hyllstedt och Pettersson, 1970). Neutralisation av EAV, som är ett höljeförsett virus, sker med hjälp av komplement bindning. Sedan testas serum mot minskande mängder virus för att få fram en titer. Makrosystem, med rör med cellkulturer, eller ett mikrosystem, med plattor innehållande 96 brunnar med cellkulturer kan användas. Cellkulturerna som används är RK-13, rabbit kidney cells (Moreno- Lopez, 1990). Flera kommersiella ELISA metoder är under utveckling (Personligt meddelande av Treiberg- Berndtsson, 2005).

### **Behandling**

Det finns ingen specifik behandling av EVA. Akut sjuka hästar återhämtar sig vanligen utan problem. Vid svårare fall så syftar behandlingen till att lindra symtomen. Speciellt viktigt är detta för avelshingstar som under den febrila fasen kan utveckla ödem i scrotum, annars finns risk för testikeldegeneration. Försök att vaccinera hingstar som är virusbärare, för att på detta sätt få dem att sluta urskilja virus i sperma, har gjorts utan att lyckas. Det enda sättet att bli av med bärarstadiet hos hingst är att kirurgiskt kastrera hingsten (Timoney och McCollum, 1993). Lyckade försök har även gjorts med kemisk kastration, d. v. s. vaccinering mot GnRH, av hingstar som var virusbärare (Stout och Colenbrander, 2004)

### **Bekämpning**

#### *Vaccination*

För att minimera spridning av EAV används profylaktisk vaccination i många länder. Både levande och avdödat vaccin finns på marknaden. Problemet med vaccinering är att man inte kan skilja antikroppar uppkomna efter vaccination från antikroppar efter naturlig infektion. Flera försök har dock gjorts att utveckla vacciner där man kan särskilja antikropparna (Minke et al, 2004).

Ett av vaccinerna på marknaden är ett modifierat levande vaccin, utvecklat efter Bucyrus stammen. Det används till hingstar och icke dräktiga ston. Vaccination kan ge en febertopp och rekommenderas därför inte till dräktiga ston, framförallt inte de två sista månaderna i dräktigheten, inte heller till föl under 6 veckor. Vaccinet skyddar från klinisk sjukdom inklusive abort hos ston och det virusbärande stadiet hos hingst, men hästen kan dock få en reinfektion och begränsad replikation av virus. Revaccination ger ett tydligt högre serologiskt svar som kvarstår åtminstone flera avelssäsonger (Timoney och McCollum, 1993). Vaccinet är endast tillgängligt i USA (Minke et al, 2004).

Avdödat vaccin är också utvecklat efter Bucyrus stammen. För att skydda mot klinisk sjukdom krävs ett immunsvaret som ger en högre antikropstiter, än vid vaccination med levande vaccin. Vaccinet skyddar ston mot abort och hingstar från att bli bärare av virus efter respiratorisk smitta (Minke et al, 2004). Detta vaccin finns i två varianter, ett med adjuvans som är utvecklat för Storbritannien och ett inaktiverat med formalin som är utvecklat i Japan. Det senare är bättre för att skydda hingstar så att de inte blir virusbärare, dvs. kroniska smittbärare (Balasuriya och MacLachlan, 2004).

Irland var fritt från EVA fram till år 2003, trots att man har haft införsel av ston från utlandet för betäckning. Efter betäckningssäsongen år 2003 hade en hingst, som verkat i avel för första säsongen, serokonverterat. Orsaken till att EAV kom in i den irländska hästuppopulationen var bristande tillgång på vaccin inför betäckningssäsongen 2003. Hingstar som betäckte för första säsongen blev därför inte vaccinerade. Ytterligare underökningar visade att hingsten inte hade virus i sperma och att den respiratoriska smittan var begränsad. Man rekommenderar nu årlig vaccination av avelshingstar och ett blodprov både före och 2- 3 veckor efter vaccination. För ökad säkerhet rekommenderas även att stona provtas innan betäckning (Cullinane, 2003).

### *Sjukdomskontroll*

Vid konstaterade utbrott av EVA hindras smittspridning bäst genom:

1. Restriktioner för förflyttning av hästar.
2. Isolering av infekterade hästar, följt av en period i karantän efter tillfrisknande.
3. God hygien, inkluderat restriktioner för personal som arbetar med infekterade hästar.
4. Uppföljning med utökad provtagning och laboratediagnos (Murphy et al, 1999).

## **SYFTE MED STUDIEN**

I Sverige har vi ett krav sedan år 1996 avseende EAV provtagning på hingstar som används i seminverksamhet. Föreskriften innebär att sperma, trots innehåll av virus, tillåts att användas om stoägaren informeras. Internationellt sett avviker detta från många andra länders hantering, där har man ofta valt att förbjuda virusbärande hingstar eller införa vaccinationstvång på alla hingstar ämnade för avel från 6 månaders ålder. Trots denna hantering i Sverige har vi inte haft några konstaterade aborter orsakade av EAV. Ingen sammanställning är gjord sedan år 1999 avseende resultaten av EVA provtagningarna på seminhingstar.

Målsättningen med detta examensarbete är att:

- studera prevalensen av EAV på svenska avelshingstar som använts i semin under år 2002 och 2005
- undersöka om kravet på obligatorisk provtagning uppfyllts
- jämföra nuvarande prevalens med tidigare studier, dvs. följa utvecklingen av EAV.

## **MATERIAL OCH METODER**

Som underlag för denna studie har alla hingstar med betäckningstillstånd och som verkat i avel med färsk eller transporterad sperma år 2002 och 2005 medräknats. Raser som undersökts var Svenskt Halvblod, Varmblodig travare och Kallblodstravare. Engelskt fullblod har undersökts för år 2005. Det finns dock inget krav i föreskriften om provtagning vid naturlig betäckning utan det är ett påbud som avelsföreningen satt upp för engelska fullblods hingstar.

Informationen om antal hingstar med betäckningstillstånd har hämtats från resp. avelsförening, ASVH, STC och SGC, antingen genom telefonkontakt, mail eller från resp. hemsidor.

Alla analyser av EAV har utförts vid SVA i Uppsala. Den stam av virus vi har i Sverige är "Bucyrus like". I serum har antikroppar mot EAV analyserats. Antikroppar analyseras med en serum neutralisationstest. Ett mikrosystem med RK-13 celler har använts. Som serologiskt positiv räknades > 1:4. Ingen spädnings över 1:256 utfördes.

Sperman har analyserats för att påvisa virus. Metoden som används är en "real time" PCR. Proven processas i Genovision GenoM-48, en robot som extraherar nukleinsyra. PCR reaktionerna pipetteras med Tecan Miniprep 75 pipetteringsrobot och reaktionerna sker i en Corbett Research Rotor Gene under 2000 realltidscyklar (Belák och Thoren, 2001).

Resultat av serum och spermavprov analyser avseende EAV finns lagrade i databasen på SVA. Från journalhanteringssystemet i SVA:s databas har uppgifter hämtats om hingstarnas identitet och provsvar. Analysresultat har sedan delats upp efter ras och bearbetats. Antal hingstar ålagda provtagning för EAV har jämförts med det faktiska antalet som var provtagna. Hingstar vars sperma var fryst och/eller importerad togs inte med i studien. Prevalensen serologiskt positiva hingstar samt viruspositiva hingstar har summerats för de två åren. En jämförelse har sedan gjorts med sammanställningen från år 1999 som gäller varmblodiga och kallblodiga travare (Treiberg – Berndtsson, 1999).

## RESULTAT

### *Svenskt Halvblod*

Tabell 1: EAV provtagningsresultat på Svenskt Halvblod år 2002 och 2005.

	2002	2005
Totalt antal hingstar med betäckningstillstånd	215	206
Antal hingstar som används till färsk och transport sperma	88	92
Antal provtagna hingstar, blod och/eller sperma	86	92
% hingstar som var provtagna	97,7	100
Antal blodprov, serologiskt analyserade	79	82
% hingstar som var serologiskt positiva	7,6	9,8
Antal spermprov, analyserade med PCR	16	18
% hingstar med PCR positiva spermprov	6,3	0
% hingstar PCR positiva av alla provtagna	1,2	0

Provtagningen av halvbloden efterföljs bra, år 2002 har alla utom två hingstar provtagits, år 2005 var alla hingstar provtagna. Andelen med en positiv serologisk titer var låg, 7,6 % år 2002 och 9,8 % år 2005. Endast ett spermprov var viruspositivt, detta var år 2002. Från hingsten som var viruspositiv i sperma, hade inget serumprov lämnats för serologisk analys.

### *Varmblodig travare*

Tabell 2: EAV provtagningsresultat på Varmblodig travare år 1999, 2002 och 2005.

	1999	2002	2005
Antal hingstar som används till färsk och transport sperma	108	99	79
Antal provtagna hingstar, blod och/eller sperma	89	91	61
% hingstar som var provtagna	82,4	91,9	81
Antal blodprov, serologiskt analyserade	89	83	53
% hingstar som var serologiskt positiva	42,7	41	28,3
Antal spermprov, analyserade med PCR	34	42	26
% hingstar med PCR positiva spermprov	20,6	23,8	7,7
% hingstar PCR positiva av alla provtagna	7,9	11	3,3

Provtagningen av varmlodiga travaringstar har inte efterföljts lika bra som hos halvbloden. Endast 81 % av hingstarna provtogs år 2005. Prevalensen av hingstar med positiv serologisk titer, minskade från 42,7 % år 1999, till 41 % år 2002 och 28,3 % år 2005. Antalet hingstar som skiljde ut virus i sperma har varierat under tidsperioden, sju stycken år 1999, tio stycken år 2002 och två år 2005. Detta ger en prevalens av hingstar som skiljde ut virus på 7,9 % år 1999, 11 % år 2002 och 3,3 % år 2005.

### **Kallblodstravare**

Tabell 3: EAV provtagningsresultat på Kallblodig travare år 1999, 2002 och 2005.

	1999	2002	2005
Antal hingstar som används till färsk och transport sperma	13	12	17
Antal provtagna hingstar, blod och/eller sperma	9	12	14
% hingstar som var provtagna	69,2	100	82,4
Antal blodprov, serologiskt analyserade	8	12	14
% hingstar som är serologiskt positiva	11,1	0	0
Antal spermaprov, analyserade med PCR	0	0	0
% hingstar med PCR positiva spermaprov	0	0	0
% hingstar PCR positiva av alla provtagna	0	0	0

Inom kallblodsaveln har föreskriften om provtagningen efterföljts relativt bra, år 1999 provtogs inte fyra hingstar, år 2002 provtogs alla och år 2005 provtogs inte tre hingstar verksamma inom semin. Ingen av de provtagna hingstarna med var serologisk positiv vid provtagning år 2002 och år 2005, år 1999 hade en hingst en positiv serologisk titer. Inga spermaprov var tagna.

### **Engelskt fullblod**

Tabell 4: EAV provtagningsresultat på Engelskt fullblod år 2005.

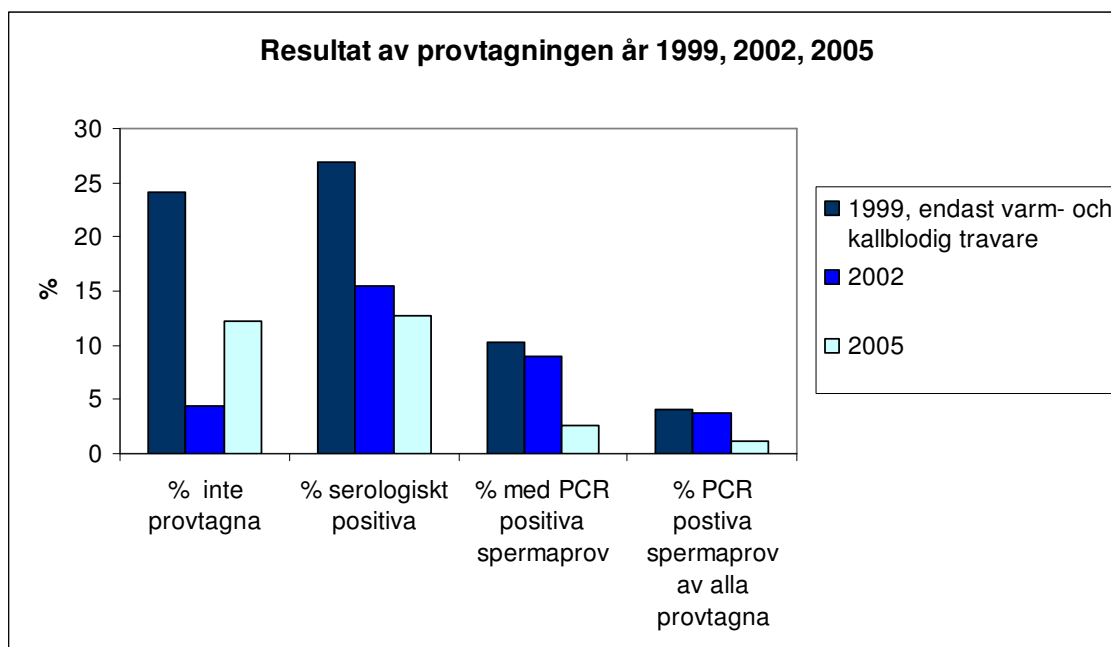
	2005
Totalt antal hingstar med betäckningstillstånd	23
Antal provtagna hingstar, blod prov	23
% hingstar som var provtagna	100
Antal blodprov, serologiskt analyserade	23
% hingstar som är serologiskt positiva	26,1

Enligt föreskriften behöver hästar som betäcker naturligt inte provtas för EAV. Detta beror på att de inte omfattas av seminförfattningen där provtagningen är reglerad. Avelsföreningen, SGC har dock från och med i år ett eget krav avseende provtagning av EAV.

Alla hingstar har provtagits. De sex hingstarna med en positiv serologisk titer var alla importerade och vaccinerade i sitt hemland. Från dessa hingstar har därför inte spermaprov för virusisolering analyserats pga. att de var vaccinerade.

## Sammanfattande resultat

Tabell 5: EAV provtagningsresultat på alla raser (Engelskt fullblod exkluderat) år 1999, år 2002 och år 2005.



Antalet hingstar med betäckningslicens har under tidsperioden minskat något hos alla raser (fullblod exkluderat). Hos varmblodig travare och hos de svenska halvbloden har antalet hästar som verkar på färsk och transporterad sperma och alltså ska provtas varit relativt konstant under tidsperioden.

Prevalensen hingstar med positivt testresultat har minskat för de tre åren som sammanställts. Andelen hingstar som har provtagits har varierat under åren. År 1999 ingick bara varmblodig och kallblodig travare och år 2005 är engelskt fullblod exkluderat.

Tabell 6: Uppföljning år 2005 av hingstar (41 st) som var virus positiva och/eller serologiskt positiva 2002, alla raser inkluderade.

Resultat 2005 för hingstar med positivt provtagningsresultat 2002	Antal	%
Hingstar som var provtagna, både år 2002 och 2005 *	15	36,6
Hingstar som inte var i avel år 2005	16	39,0
Hingstar som användes till naturlig betäckning år 2005	5	12,2
Hingstar som inte var provtagna år 2005 eller efter säsong	4	9,8
Hingst som exporterats och sperma sedan importerats	1	2,4
Summa:	41	100

\*De som är provtagna både år 2002 och 2005 har alla samma eller lägre titer 2005. Av de 11 st som var viruspositiva år 2002 är endast 1 positiv även år 2005.

År 2002 var 41 hingstar positiva, serologiskt och/eller viruspositiva på PCR, alla raser inkluderade. Dessa hingstar har sedan följts upp år 2005. Resultaten visar att endast 36,6 % av de hingstar med positivt testresultat år 2002 var provtagna år 2005, titern för år 2005 var samma eller lägre än år 2002. Resten var inte i avel, användes till naturlig betäckning, provtogs inte eller fanns endast som import sperma.

År 2005 var 23 hingstar positiva, serologiskt och/eller positiva på PCR, alla raser inkluderade (fullbloden exkluderade). Uppföljning av testresultat bakåt till år 2002 visar att endast en hingst har gått ifrån att vara serologiskt negativ år 2002 till att år 2005 ha en positiv serologisk titer och urskilja virus i sperma.

Tabell 7: Uppföljning av serologisk titer hos hingstar viruspositiva år 2002 och år 2005

Serologisk titer	Antal hingstar	Hingstar i %
okänd	2	17
Låg titer (1:8- 1:128)	4	33
Hög titer (1:178- 1:256)	6	50
Summa	12	100

Den serologiska titern varierade för de hingstar som under de två åren har haft ett positivt PCR resultat. Uppföljningen blir svårtolkad då flera av dem som hade ett positivt PCR resultat valt att bara skicka in spermaprov och deras serologiska status var då okänt.

## DISKUSSION

Sedan 1996 har det i Sverige funnits ett krav på provtagning av EAV i föreskrifterna om hästsemin. Provtagningen har följts upp på olika sätt av de olika avelsföreningarna. Man kan också se att andelen hingstägare som följer kravet på provtagningen varierar för de olika raserna. Ägare till engelska fullblod har provtagit alla de hingstar inom avel och som deras avelsförening krävde. 2005 var dock första året som provtagning utfördes. När det gäller varmblodig travare har kravet på provtagning följts i varierande grad, mellan 82 % (2005) och 92 % (2002) av hingstarna har provtagits. Därför kan vi inte till fullo förlita oss till att prevalensen speglar verkligheten. Varför provtagningen sköts sämre hos de varmblodiga travarna kan bero på de rutiner som finns för att följa upp provtagningen (STC personligt meddelande, 2005).

Prevalensen serologiskt positiva hingstar i denna studie varierade beroende av ras och var genomgående högst hos de varmblodiga travarna. Samma resultat har framkommit från Kanada och USA där prevalensen hos de varmblodiga travarna även här var högst (över 70 %) (Timoney och McCollum, 2000). I Sverige har tidigare studier visat att även här har prevalensen serologiskt positiva varit mycket hög. År 1988 när 20 % av avelshingstarna testades var prevalensen 80 % hos varmblodiga travare (Klingeborn et al, 1992). Positivt är dock att prevalensen serologiskt positiva varmblodiga travare har minskat under de år som nu undersökts, från 43 % år 1999 till 28 % år 2005. På Nya Zeeland har prevalensen antikroppspositiva också sjunkit, från 54 % positiva 1989 till mindre än 20 % år 2002 (Horner, 2004). Prevalensen seropositiva varmblodiga travar hingstar i Sverige har minskat betydligt sedan krav på provtagning infördes i föreskriften, trots att viruspositiva hingstar har fått användas i aveln.



Hos kallblodig travare har prevalensen sjunkit från 11 % år 1999, en hingst, till 0 % både år 2002 och år 2005. Det är dock få hingstar som används i avel med semin. Hos halvbloden har prevalensen serologiskt positiva varit låg, under 10 %. I flera länder vaccinerar man avelshingstar och behöver därigenom inte utföra provtagning utan bara kontroll av vaccination.

Uppföljningen av de hingstar som var serologiskt och/eller viruspositiva försvåras av att endast 37 % av de hingstar som provtogs med positivt resultat år 2002 är provtagna år 2005. Övriga 63 % har tagits ur avel, använts till naturlig betäckning, inte provtagits eller exporterats vilket lett till den ofullständiga uppföljningen. Ingen av de hingstar som provtogs vid båda tillfällena hade en högre titer vid andra provtagningstillfället. Eftersom virus överlever i de accessoriska könskörtlarna (Timoney och McCollum, 1993), så borde alla viruspositiva hingstar som övergår till naturlig betäckning provtas, eftersom smittspridningsrisken är samma som för de hingstar som används i semin.

Denna studie visade att andelen hingstar som utsöndrade virus i sperma har minskat totalt sett. Exempelvis var det en minskning bland de varmblodiga travarna från tio stycken år 2002 till två stycken år 2005. Av alla undersökta hingstar var det endast en som är viruspositiv båda åren. Dock finns studier som visar att hingstar kan utsöndra virus i sperma betydligt längre än så, åtminstone i elva år enligt Timoney et al (1996). Det hade varit intressant att serologiskt följa upp de ston som seminerats med de viruspositiva hingstarna.

Trots att vi tillåter viruspositiva hingstar i avel har vi till dags dato fortfarande inte diagnostiserat EVA som orsak till abort. Troligen beror detta på att vi har en stam av EAV som är mindre virulent. Vad som bör uppmärksammas är att vi i Sverige vid handel över gränserna av hästar och sperma riskerar att få in en annan stam av EAV. Då skulle vi kunna få samma scenario som man fick i Ungern. Där diagnostiserade man 96 fall av abort pga. EAV under en tidsperiod på två år (Szerdi et al, 2005).

En svensk hingst som var viruspositiv i sperma trots att han var seronegativ (Treiberg Berndtsson et al, 2004), kan leda till en omvärdering av testrutinerna. Om en hingst kan utsöndra virus i sperma utan att ha antikroppar, så är inte dagens rutiner tillförlitliga. Då måste sperma alltid provtas innan man kan konstatera status hos hingsten, jämfört med idag då ett serologiskt negativt provsvar leder till att hingsten friförklaras.

Om man inseminerar ett seronegativt sto med en viruspositiv hingst blir stoet smittat och serokonverterar. Symtomen som stoet får av smittan kan variera. Rekommendationen till stoägare är att om de vill betäcka stoet med en virusutsöndrande hingst, att kontrollera stoets serologiska status innan betäckning. Ett seronegativt sto som insemineras med sperma innehållande virus skall alltid isoleras från andra dräktiga ston, annars smittas dessa i sin tur och riskerar att abortera.

Sammanfattningsvis visar denna studie att trots att vi tillåtit hingstar att verka i aveln med EAV i sperman har inte andelen smittade hingstar ökat. Provtagningen av hingstar i semin har lett till ökad medvetenhet av EVA och därmed en minskad prevalens av både serologiskt positiva och virus positiva hingstar.

## **TACK**

Till SVA som gjort journal databasen tillgänglig och all personal på SVA som hjälpt mig att ta fram de uppgifter jag behövt för att genomföra detta examensarbete. Jag vill också tacka båda mina handledare, Anne-Marie Dalin och Louise Treiberg Berndtsson, för all hjälp och stöd jag fått med arbetet, det har varit ovärderligt.

## **ABSTRACT**

EVA, Equine Viral Arteritis, was diagnosed for the first time in 1953 in USA. The disease gained international interest in 1984, when there were several outbreaks of abortion at Thoroughbred studs in USA. EAV, Equine Arteritis Virus, is an RNA virus in the Arteriviridae family. There is only one serotype of EAV but several strains and the strains have different virulence. EAV is transmitted in two different ways: by aerosols, or by venereal transmission. Stallions often become chronic shedders. For diagnose of EAV, serology or a method to detect virus, for example PCR, can be used. Since 1996 EVA is included in the Swedish act about artificial insemination in horses. All stallions used with AI should be tested serologically for EAV, if tested positive the semen has to be analysed for virus. In Sweden stallions with viruspositive semen are allowed to be used for breeding.

The aim of this study was to investigate if the Swedish rule about EAV in stallions used for AI was followed and to investigate the prevalence of EAV in stallions used for AI. The breeds included in the study were Swedish Warm Blood, Standardbred trotter, North Swedish trotter and English Thoroughbred. Data about the number of stallions with breeding permission was collected from the breeding associations. Data about the results of EAV analyses (serology and PCR) were collected from SVA: s data reading system.

The results varied among the different breeds. In the Standard bred stallions the rate of sampling varied between the years, from 81 % (2005) up to 92 % (2002). The prevalence of serological positive Standard bred stallions decreased from 43 % in 1999 to 41 % in 2002 and to 28 % in 2005. In the North Swedish Trotter and the Swedish Warm Blood the rates of sampling were higher and the prevalence's were lower. In the English Thoroughbreds the sampling started in 2005, a demand from their breeding association. The stallions that were serological positive were all vaccinated abroad. Year 2005 there were only two stallions (Standardbred trotters) with virus in their semen. No EAV in aborted fetuses has yet being diagnosed. Conclusion: Despite the fact that stallions positive for EAV in semen were allowed for breeding, the prevalence of positive stallions has not increased.

## REFERENSER

- Balasuriya, U. B. R. och N. J MacLachlan. 2004. The immune response to equine arteritis virus; potential lessons for other arteriviruses. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 102, 107-129.
- Belák, S och P. Thorén. 2001. Molecular diagnosis of animal diseases. *Expert Review of Molecular Diagnosis*, 1, 434-443.
- Coignoul, F. L. och N. F. Cheville. 1984. Pathology of maternal genital tract, placenta and fetus in equine viral arteritis. *Vet. Pathol.* 21, 333-340.
- Cole, J. R, R. F. Hall, H. S. Gosser, J. B. Hendricks, A. R. Pursell, D. A. Senne, J. E. Pearson och C. A. Gipson. 1986. Transmissibility and abortogenic effect of equine viral arteritis in mares, *JAVMA*, 189, 769-771.
- Cullinane. A, 2003. Equine arteritis virus in Irish thoroughbreds. *Vet. Rec.* 153(18), 570.
- Del Piero. F. 2000. Equine Viral Arteritis. *Vet. Pathol.* 37, 287-296.
- Guthrie. A. J, P. G. Hovell, J. F. Hedges, A. M. Bosman, U. B. R. Balasuriya, W. H. McCollum, P. J. Timoney och N. J. MacLachlan. 2003. Lateral transmission of equine arteritis virus among Lippizzaner stallions in South Africa. *Equine. Vet. J.* 35, 596-600.
- Horner. G. W, 2004. Equine viral arteritis control scheme: a brief review with emphasis on laboratory aspects of the scheme in New Zealand. *N. Z. Vet. J.* 52, 82- 84.
- Klingeborn, B. H. Wahlström, M. Wierup, A. Ballagi-Pordány och S. Belák. 1992. Prevalence of antibodies to equine arteritis virus in Sweden, shedding of the virus in semen from Swedish breeding stallions and evaluation of its possible influence on fertility. *Proc. VI Int. Conf .Equine Infect. Dis.* 319-320.
- Minke J. M, J- C Audonnet och L. Fischer. 2004. Equine viral vaccines: the past, present and future. *Vet. Res.* 35, 425-443.
- Moore B. D, U. B. R. Balasuriya, J. P. Nurton, W. H. McCollum, P. J. Timoney, A. J. Guthrie och N. J. MacLachlan. 2003. Differentiation of strains of equine arteritis virus of differing virulence to horses by growth in equine endothelial cells. *Am. J. Vet. Res.* 64, 779-783.
- Moreno- Lopez, J. 1990. *Diagnostic virology guidebook to procedures*, sidnr 19-25.
- Murphy F. A, E. P. J. Gibbs, M, C. Horzinek och M. J. Studdert. 1999. *Veterinary Virology*. Third edition. San Diego. Academic press. Sidnr 509-513.
- OIE: *Terrestrial Animal Health Code 2005*. Chapter 2.5.10. Equine Viral Arteritis  
SJVFS 1999:113 Saknr M4, utkom från trycket den 15 november 1999.

Stout, T. A. E. och B. Colenbrander. 2004. Suppressing reproductive activity in horses using GnRH vaccines, antagonists or agonists. *Anim. Reprod. Sci.* 82- 83, 633- 643.

Szeredi L, Á. Hornyák, V. Pálfi, T. Molnár, R. Glávits och B. Dénes. 2005. Study on the epidemiology of equine arteritis virus infection with different diagnostic techniques by investigating 96 cases of equine abortion in Hungary. *Vet. Microbiol.* 108, 235-242.

Timoney P. J. och W. H. McCollum. 1993. Equine viral arteritis. *Vet. Clin. North. Am. Equine. Pract.* 9, 295-309.

Timoney P. J, B. Klingenborn, M. H. Lucas. 1996. A perspective on equine viral arteritis (infectious arteritis of horses). *Scientific and Technical Review*, 15, 1203-1208.

Timoney P. J och W. H. McCollum. 2000. Equine viral arteritis: further characterization of the carrier state in stallions. *J. Reprod. Fertil. Supplement*, 56, 3-11.

Treiberg- Berndtsson, L. 1998. Hur ska vi skydda dräktiga ston mot EAV. *Allm. Vet. möte. Uppsala*, sidnr 101-103.

Treiberg- Berndtsson, L. 1999. Senaste nytt om ekvin virusarterit. *Allm. Vet. möte. Uppsala*, 39-41.

Treiberg- Berndtsson, L. P. Thoren, B. Klingenborn och S. Belák. 2004. A Stallion without detectable humoral antibodies excreting equine arteritis virus in semen. *Proceedings. International Workshop on the Diagnosis of Equine Arteritis Virus Infection, Lexington, Kentucky*, sid 33.

# BILAGA 1 TERRESTRIAL ANIMAL HEALTH CODE – 2005 OIE

## CHAPTER 2.5.10.

### EQUINE VIRAL ARTERITIS

---

#### Article 2.5.10.1.

The *infective period* for equine viral arteritis (EVA) shall be 28 days for mares and geldings. The health status of seropositive stallions should be checked to ensure that they do not shed equine arteritis virus in their semen.

Standards for diagnostic tests and vaccines are described in the *Terrestrial Manual*.

#### Article 2.5.10.2.

Veterinary Administrations of importing countries should require:

for uncastrated male equines imported on a temporary basis for breeding or on a permanent basis

the presentation of an *international veterinary certificate* attesting that the animals:

1. showed no clinical sign of EVA on the day of shipment and during the 28 days prior to shipment;
2. were subjected to two diagnostic tests for EVA on blood samples at least 14 days apart with negative results during the 28 days prior to shipment; or
3. were subjected between 6 and 12 months of age to a diagnostic test for EVA on a blood sample with negative results, immediately vaccinated for EVA and regularly revaccinated; or
4. have been subjected to a diagnostic test for EVA with positive results and then:
  - a. either were subsequently test mated to two mares which were subjected to two diagnostic tests with negative results on blood samples collected at the time of test mating and again 28 days after the mating;
  - b. or were subjected to a virus isolation test with negative results (under study), carried out on semen collected during the 28 days prior to shipment.

#### Article 2.5.10.3.

Veterinary Administrations of importing countries should require:

for uncastrated male equines imported on a temporary basis other than for breeding, and for equines other than uncastrated males

the presentation of an *international veterinary certificate* attesting that the animals:

1. showed no clinical sign of EVA on the day of shipment and during the 28 days prior to shipment;
2. were subjected during the 28 days prior to shipment to two diagnostic tests on blood samples collected not less than 14 days apart which demonstrated negative results or stable or declining antibody titres;

3. were subjected between 6 and 12 months of age to a diagnostic test for EVA on a blood sample with negative results, immediately vaccinated for EVA and regularly revaccinated.

Article 2.5.10.4.

Veterinary Administrations of importing countries should require:

for fresh semen

the presentation of an international veterinary certificate attesting that the animal donors:

1. were kept for the 30 days prior to semen collection in an establishment where no equine has shown any clinical sign of EVA during that period;
2. showed no clinical sign of EVA on the day of semen collection;
3. were subjected between 6 and 12 months of age to a diagnostic test for EVA on a blood sample with negative results, immediately vaccinated for EVA and regularly revaccinated; or
4. were subjected to a diagnostic test for EVA on a blood sample with negative results within 14 days prior to semen collection, and had not been used for natural breeding from the time of the taking of the blood sample to the time of semen collection; or
5. have been subjected to a diagnostic test for EVA with positive results and then:
  - a. either were test mated within one year prior to semen collection to two mares which showed negative results to two diagnostic tests on blood samples collected at the time of test mating and again 28 days after the test mating,
  - b. or were subjected to a virus isolation test with negative results (under study), carried out on semen collected within one year prior to collection of the semen to be exported.

Article 2.5.10.5.

Veterinary Administrations of importing countries should require:

for frozen semen

the presentation of an international veterinary certificate attesting that the animal donors:

1. showed no clinical sign of EVA on the day of semen collection;
2. were subjected to a diagnostic test for EVA on a blood sample with negative results not less than 14 days after semen collection; or
3. were subjected between 6 and 12 months of age to a diagnostic test for EVA on a blood sample with negative results, immediately vaccinated for EVA and regularly revaccinated; or
4. have been subjected to a diagnostic test for EVA with positive results and then:
  - a. either were test mated within one year prior to, or as soon as possible after, semen collection to two mares which showed negative results to two diagnostic tests on blood samples collected at the time of test mating and again 28 days after the test mating;
  - b. or were subjected to a virus isolation test with negative results (under study), carried out on semen collected within one year prior to collection of the semen to be exported, or on the semen to be exported.