



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin  
och husdjursvetenskap**

Institutionen för Biomedicin och veterinär  
folkhälsvetenskap

# **Prevalensen av pneumovirus och mykoplasma hos svenska hundar med kennelhosta**

*Linnéa Streng Lindström*

*Uppsala  
2018*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2018:32*



# Prevalensen av pneumovirus och mykoplasma hos svenska hundar med kennelhosta

## The prevalence of mycoplasma and pneumovirus in samples from Swedish dogs with Canine infectious respiratory disease

*Linnéa Streng Lindström*

*Handledare: Maja Malmberg, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Biträdande handledare: Jonas Johansson Wensman, Institutionen för kliniska vetenskaper*

*Examinator: Mikael Berg, Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

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

**Kurskod:** EX0830

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2018

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2018:32

**ISSN:** 1652-8697

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

**Nyckelord:** Kennelhosta, hund, mykoplasma, pneumovirus, *M. cynos*, *M. canis*

**Key words:** Kennel cough, canine, infectious respiratory disease, mycoplasma, pneumovirus, *M. cynos*, *M. canis*

Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap



## SAMMANFATTNING

Kennelhosta är ett sjukdomskomplex som ger respiratoriska symtom i övre luftvägarna hos hund. Både virus och bakterier kan orsaka kennelhosta. Ofta är symtomen milda och övergående med akut insättande hostattacker, men det kan också ge mer allvarliga symtom med sekundärinfektioner. Kennelhosta finns över hela världen och har en hög prevalens då den lätt sprids vidare i hundtäta områden. Ofta ställs diagnosen på kliniska tecken och vid milda symtom är behandlingen vila och isolering från andra hundar. De virus och bakterier som länge varit erkända i komplexet är hundens adenovirus typ 2, hundens parainfluensavirus typ 2 samt bakterien *Bordetella bronchiseptica*. På senare tid har även andra patogener identifierats som en del av komplexet, dessa inkluderar *Mycoplasma cynos*, hundens respiratoriska coronavirus, *Streptococcus* spp. och hundens pneumovirus.

Tidigare studier vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) har gjorts för att identifiera vilka patogener svenska hundar med kennelhosta bär på. Det här arbetet undersöker om mykoplasma och pneumovirus kan vara en möjlig orsak till kennelhosta hos svenska hundar. PCR och Realtids-RT-PCR användes för att studera provmaterialet. Prevalensen av *M. canis* var 82,6 %. Andelen positiva för *M. canis* uppmättes till 59/72 (81,9 %) av de sjuka och 17/20 (85 %) av de friska individerna. *M. cynos* prevalens var 16,3 %. Andelen positiva för *M. cynos* var 12/72 (16,6 %) hos sjuka och 3/20 (15 %) hos friska individer. Ingen statistisk signifikans kunde ses mellan kennelhosta och de olika mykoplasma-arterna. Pneumovirus hittades hos två hundar med lindriga symtom på kennelhosta från samma upptagningsområde, vilket indikerar att pneumovirus kan finnas som patogen hos svenska hundar med kennelhosta. Det här är första gången pneumovirus beskrivs hos svenska hundar. Fler studier krävs för att vidare studera olika agens utbredning vid olika sjukdomsutbrott av kennelhosta.

## SUMMARY

Kennel cough, also known as canine infectious respiratory disease (CIRD) causes respiratory signs in the upper airways in dogs. CIRD can be caused by both viruses and bacteria. The signs are often mild and transient with acute onset of coughing, but it can also cause more serious signs with secondary infections. CIRD are found all over the world and have a high prevalence. It is easily spread in areas where many dog meet. The diagnosis is often made based on clinical signs. In cases with mild signs the treatment includes resting and isolation from other dogs. Pathogens commonly associated with CIRD include canine adenovirus type 2, canine parainfluenza virus (CPIV) and *Bordetella bronchiseptica*. Recently, other pathogens have also been identified as part of the complex, including *Mycoplasma cynos*, canine respiratory coronavirus, *Streptococcus spp.* and canine pneumovirus.

Previous studies at the Swedish University of Agricultural Sciences (SLU) have been made to identify which pathogens that cause CIRD in Swedish dogs. This work continues to investigate whether mycoplasma and pneumovirus can be a possible cause of kennel cough in Swedish dogs. In this work, PCR and real-time RT-PCR were used to study the test material. The prevalence of *M. canis* was 82.6 %. The proportion of *M. canis* positive was 81.9 % (59/72) in the sick/affected dogs and 85 % (17/20) of the healthy individuals. *M. cynos* prevalence was 16.3%. The proportion of *M. cynos* positive was 16.6 % (12/72) in the sick dogs and 15 % (3/20) in healthy individuals. No association between CIRD and the presence of mycoplasma could be found. Pneumovirus was found in two dogs with mild signs of CIRD from the same area, which indicate that pneumovirus can be found as a pathogen in Swedish dogs with CIRD. This is the first description of pneumovirus in Swedish dogs. More studies are required to further study the spread of different agents in various outbreaks of the disease.

## INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Sjukdomsbild.....	2
Etiologi och epidemiologi .....	2
Behandling/profylax.....	2
Agens.....	3
Traditionella agens .....	3
Nyare agens .....	4
Mykoplasma .....	4
Pneumovirus.....	5
Material och metoder.....	7
Material .....	7
Metod .....	7
Mykoplasmadiagnostik .....	7
DNA-extraktion av positiv kontroll.....	7
PCR .....	7
Gelelektrofores .....	8
DNA sekvensering .....	8
Pneumovirusdiagnostik .....	8
Realtids-RT-PCR.....	8
Resultat.....	10
Mykoplasma.....	10
Symtomgrad .....	10
Antal sjukdomsdagar.....	11
Saminfektioner .....	12
Saminfektioner och symtomgrad.....	13
Pneumovirus.....	13
Diskussion .....	14
Konklusion .....	17
Acknowledgment .....	17
Referenser.....	18





## INLEDNING

Kennelhosta är ett sjukdomskomplex hos hund som orsakar respiratoriska symtom i övre luftvägarna. Sjukdomen kan orsakas av olika patogener, både virus och bakterier, och gemensamt kallas det för kennelhostakomplexet. Kennelhosta ger ofta milda och övergående symtom. Det vanligaste sjukdomstecknet är akut insättande hostattacker med en torr, skrällande hosta som ofta är lätt att känna igen. Kennelhosta har en hög prevalens och sprids lätt i miljöer där flera hundar träffas i större grupper (Appel & Binn, 1997: se Buonavoglia & Martella, 2007 s. 356).

Diagnosen kennelhosta ställs vanligen på kliniska tecken, varför kunskap om bakomliggande agens är begränsad. Vissa infektionsämnen har länge varit erkända inom komplexet, dessa inkluderar *Bordetella bronchiseptica*, hundens adenovirus typ 2 och hundens parainfluenzavirus typ 2. På senare tid har flera andra bakterier och virus också visat sig vara sammankopplade med komplexet. Dit hör bland annat *Mycoplasma cynos*, hundens respiratoriska coronavirus, *Streptococcus* spp. och hundens pneumovirus (Chalker *et al.*, 2003a, 2004; Erles *et al.*, 2003; Renshaw *et al.*, 2010).

Kennelhosta är ofta övergående och i det akuta skedet är behandlingen vila samt isolering för att sjukdomen inte ska spridas vidare till andra hundar. I mer allvarliga fall kan hunden behöva veterinärvård för tillfrisknande (SVA, 2016). Idag finns vaccination mot hundens parainfluenzavirus typ 2, *B. bronchiseptica* och hundens adenovirus typ 2, trots det ses fortsatta sjukdomsutbrott av kennelhosta.

Tidigare studier vid Sveriges Lantbruksuniversitet (SLU) har gjorts för att identifiera vilka patogener svenska hundar med kennelhosta bär på. Förekomst av hundens respiratoriska coronavirus, hundens adenovirus typ 2, hundens herpesvirus, hundens parainfluenzavirus typ 2, ekvint influenzavirus samt bakterien *B. bronchiseptica* har undersökts. Detta arbete utgår från samma studiepopulation och syftar till att fortsätta arbetet att kartlägga och få en vidare uppfattning om vilka agens som ingår i kennelhostakomplexet. Detta utgör en viktig del i att på sikt utveckla nya vacciner och behandlingsrekommendationer för att bekämpa sjukdomsutbrott. Syftet med den här studien är att undersöka förekomsten av pneumovirus och mykoplasma hos svenska hundar samt om pneumovirus och mykoplasma kan vara en möjlig orsak till kennelhosta.

## LITTERATURÖVERSIKT

### Sjukdomsbild

Kennelhosta är en komplex sjukdom med en multifaktoriell etiologi där både bakterier och virus ingår. Gemensamt för sjukdomen är att insjuknade hundar får respiratoriska symtom, men graden av sjukdom kan variera från milda symtom med lindrig hosta till mer allvarliga symtom med bronkopneumoni. Det vanligaste är akut insättande hostattacker med skrällig och ihållande hosta. Ofta kan djurägaren tro att hunden satt något i halsen. Ibland kan hunden få kväljningar och hosta upp vitt slem. Kennelhosta kan även ge en kortvarig febertopp vid sjukdomens utbrott, men ofta är hundens allmäntillstånd opåverkat. Hunden insjuknar ofta inom en vecka efter att den blivit smittad och sjukdomstecken brukar avklinga inom 7-10 dagar, men en del hundar kan ha hosta upp till tre veckor. I vissa fall kan en sekundär bakteriell infektion uppstå vilket kan ge ett mer påverkat allmäntillstånd. Sekundärinfektionen kan även nå lungorna och orsaka pneumoni. Hunden får då feber, nedsatt allmäntillstånd och nosflöde, och det kan i allvarliga fall ge fatala konsekvenser. Detta är framför allt en risk för valpar och immunsupprimerade individer (Ford, 2012).

### Etiologi och epidemiologi

Kennelhostakomplexet har hög morbiditet men låg mortalitet och bryter ofta ut i miljöer där flera hundar med olika bakgrund möts, som på kennlar, hunddagis och i djursjukhusmiljö. Sjukdomen har en hög prevalens och förekommer endemiskt i hela världen. Hundar i alla åldrar kan drabbas. Sjukdomsutbrott är vanligare och allvarligare hos hundar som vistas nära inpå varandra och där kontinuerlig introduktion av nya patogener som orsakar kennelhosta sker (Buonavoglia & Martella, 2007).

Kennelhosta är en smittsam sjukdom och smittspridning kan ske både via direkt och indirekt kontakt mellan hundarna. Smitta kan också överföras via aerosol över korta avstånd om hunden nyser eller hostar (SVA, 2016).

### Behandling/profylax

Kennelhosta är i de flesta fall en övergående sjukdom och de flesta hundar tillfrisknar utan medicinsk behandling. De rekommendationer som finns vid misstanke om kennelhosta är att låta hunden vila samt isolera hunden för att inte sprida smitta vidare till andra hundar (SVA, 2016). I mer allvarliga fall av sjukdomen kan hunden behöva veterinärvård för tillfrisknande. Behandling inkluderar framför allt hostdämpande medicin för att lindra symtomen. Vid sekundärinfektioner där hunden blir allmänpåverkad med feber bör vidare utredning av sjukdom genomföras (SVA, 2016).

Idag finns möjligheten att vaccinera hundar mot delar av kennelhostakomplexet. Det finns två olika varianter av vaccin på marknaden. En variant är ett avdödat vaccin som ges subkutant och ger skydd mot en stam av hundens parainfluensa typ 2. En nyare variant, som är ett levande attenuerat vaccin, ges intranasalt och kom ut på marknaden år 2005. Detta är ett vaccin mot både *B. bronchiseptica* och hundens parainfluensa typ 2 (Fass, 2015; Day *et al.*, 2016). Den rådande vaccinationsrutinen mot kennelhosta är att årligen vaccinera hunden. Hundens adenovirus typ 2 som också kan vara en orsak till kennelhosta finns i det basvaccin som används i Sverige (t ex DHP). Basvaccin ges, efter grundvaccination, som revaccination var tredje år enligt rådande rekommendation (Day *et al.*, 2016). Rekommendationen idag är

att hundar som är aktiva och träffar många andra hundar, till exempel genom träning/tävling eller vistelse på hunddagis, vaccineras mot ”kennelhosta” (SVA, 2016).

## Agens

Begreppet kennelhosta inbegriper, som tidigare nämnt, både virus och bakterier, och brukar gemensamt kallas för kennelhostakomplexet. *B. bronchiseptica*, hundens adenovirus typ 2 och hundens parainfluenzavirus typ 2 räknas till de traditionella agens som länge varit kända i kennelhostakomplexet. Nyare studier har visat att fler patogener är associerade med kennelhosta, dessa inkluderar hundens respiratoriska coronavirus, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Mycoplasma cynos* och pneumovirus (Chalker *et al.*, 2003a, 2004; Erles *et al.*, 2003; Renshaw *et al.*, 2010).

Studier har visat att vissa smittämnen ensamma kan orsaka kennelhosta medan andra främst förekommer som saminfektioner. Saminfektioner innebär att flera patogener är involverade och kan potentiella varandra och tillsammans orsaka allvarligare sjukdom (Decaro *et al.*, 2016; Joffe *et al.*, 2016; Mitchell *et al.*, 2013; Schulz *et al.*, 2014). Tidigare studier har också föreslagit att agens kan agera synergistiskt och potentiella sjukdom (Buonavoglia & Martella, 2007; Randolph *et al.*, 1993). Andra studier har visat att vissa smittämnen kan predisponera för sekundärinfektioner (Erles *et al.*, 2004; Joffe *et al.*, 2016).

## Traditionella agens

Hundens parainfluenzavirus typ 2 (CPIV-2) är ett enkelsträngat RNA-virus som tillhör familjen *Paramyxoviridae*. Viruset finns över hela världen och orsakar respiratorisk sjukdom. Karakteristiskt för CPIV-2 som ensam patogen är en akut insättande och torr hosta som är mycket smittsam. I enstaka fall kan sjukdomen även ge seröst näsflöde, tonsillit och faryngit. Ofta är sjukdomen övergående efter 6-14 dagar om inga sekundärinfektioner uppstår. Efter sjukdom kan ett antikroppssvar ses upp till 3 år, men detta innebär inte att individen får ett skydd mot sjukdomen (Ford, 2012).

*Bordetella bronchiseptica* är en gramnegativ, aerob bakterie som varit en känd patogen inom kennelhostakomplexet sedan tidigt 1970-tal. *B. bronchiseptica* kan finnas både som kommensal och patogen hos hund. Idag finns 9 arter av *B. bronchiseptica* som är kända för att orsaka respiratorisk sjukdom hos hund (Ford, 2012).

Trots tillgängligt vaccin är CPIV-2 och *B. bronchiseptica* de vanligaste patogenerna vid utbrott av kennelhosta (Decaro *et al.*, 2016; Englund *et al.*, 2003; Erles *et al.*, 2004). Detta beror på att de vaccin som finns tillgängliga mot CPIV-2 och *B. bronchiseptica* inte har fullgott skydd för att förhindra sjukdom (Day *et al.*, 2016). Både CPIV-2 och *B. bronchiseptica* ger typiska symtom på kennelhosta. CPIV-2 har visats ge mildare symtom men är ofta med i saminfektioner vilket kan ge ett allvarligare sjukdomsförlopp (Englund *et al.*, 2003; Erles *et al.*, 2004). Studier har också visat att infektion med CPIV-2 spelar en stor roll i utvecklingen av kennelhosta och kan predisponera för sekundärinfektioner (Erles *et al.*, 2004; Joffe *et al.*, 2016). *B. bronchiseptica* är den vanligaste bakterien inom komplexet och kan ge allvarligare symtom än CPIV-2. Vanliga symtom vid sjukdom med *B. bronchiseptica* är hosta och näsflöde, men allvarliga fall kan inkludera pneumoni och dödsfall (Ford 2012). *B. bronchiseptica* kan även ses hos kliniskt friska djur vilket beror på bakteriens förmåga att

reglera sin virulens (Ford, 2012). I en studie som undersökte *B. bronchisepticas* roll i ett utbrott av kennelhosta sågs att högre andel av hundar med kraftiga symtom var positiva för *B. bronchiseptica* än hundar med mildare sjukdomstecken (Chalker *et al.*, 2003b).

Hundens adenovirus typ 2 (CAV-2) är ett DNA-virus som tillhör familjen *Adenoviridae*. CAV-2 har tidigare räknats till ett av de vanligaste traditionella agens i komplexet men numera isoleras patogenen alltmer sällan i studier gjorda på kennelhosta. Detta beror troligen på att det idag finns bra vacciner att tillgå (Erles *et al.*, 2004; Erles & Brownlie, 2008; Joffe *et al.*, 2016). Symtomen kan vara milda i okomplicerade fall och ger då typiska kennelhostasymtom med akut insättande hosta. Viruset kan även orsaka sjukdomar i nedre luftvägarna, som bronkit och interstitiell pneumoni, och symtomen är då kraftigare (Almes *et al.*, 2010; Ford, 2012).

### **Nyare agens**

Hundens respiratoriska coronavirus (CRCoV) är ett av de agens som numera räknas till kennelhostakomplexet. I en studie från 2003 upptäcktes ett starkt samband mellan CRCoV och kennelhosta (Erles *et al.*, 2003) och viruset har sedan dess hittats i flera kennlar med kennelhostautbrott (Decaro *et al.*, 2016; Erles *et al.*, 2004; Joffe *et al.*, 2016). I studier som letat efter flertalet agens har CRCoV visat sig vara en av de tre vanligaste patogenerna vid kennelhostautbrott (Decaro *et al.*, 2016; Erles *et al.*, 2004; Joffe *et al.*, 2016).

CRCoV ger milda respiratoriska symtom med typiska kliniska tecken som torr hosta och näsflöde (Erles *et al.*, 2003, 2004). Studier har visat att saminfektioner med CRCoV och andra agens är vanligt förekommande (Erles & Brownlie, 2008). CRCoV är en vanlig patogen tillsammans med CPIV-2 i början av sjukdomsförloppet men sedan minskar prevalensen och ersätts av andra agens, till exempel *B. bronchiseptica* (Erles *et al.*, 2004).

I början av 2000-talet undersöktes även *Streptococcus canis* och *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* roll i kennelhostakomplexet (Chalker *et al.*, 2003a). I studien sågs att *S. equi* subsp. *zooepidemicus* var associerat med kennelhosta och kunde agera som primärpatogen. *S. equi* subsp. *zooepidemicus* orsakar akut insättande hosta, näsflöde, feber, dyspné, anorexi och letargi. Symtomen är ofta av högre allvarlighetsgrad som kan ge bronkopneumonier och sjukdom med dödlig utgång. Studier som isolerat *S. equi* subsp. *zooepidemicus* hos sjuka hundar har letat efter saminfektioner med CPIV-2, CAV-2, CRCoV och *B. bronchiseptica* utan resultat (Byun *et al.*, 2009; Chalker *et al.*, 2003b). *Streptococcus canis* har däremot inte visat sig ha ett samband med kennelhosta (Chalker *et al.*, 2003a).

### **Mykoplasma**

*Mycoplasma* spp. är ett släkte av gramnegativa, fakultativt aeroba bakterier som skiljer sig från andra bakterier genom att de saknar cellvägg (Bemis, 1992). Mykoplasmas roll i kennelhostakomplexet är inte helt utrett, men det har länge varit ett känt agens i hundens övre luftvägar. Tidigare har mykoplasma ansetts vara en del av normalfloran då bakterien isolerats från kliniskt friska individer (Rosendal, 1978; Randolph *et al.*, 1993, Englund *et al.*, 2003). Bakterien har också tidigt isolerats som enda bakterie hos sjuka hundar med symtom på kennelhosta (Chandler & Lappin, 2002).

Huruvida mykoplasma, och särskilt *Mycoplasma cynos*, är en del av kennelhostakomplexet är väldiskuterat (Rosendal, 1978). På tidigt 2000-tal undersökte Chalker *et al.* (2004) olika arter

av mykoplasma hos hundar med och utan kennelhosta. Prover togs från tonsiller, trachea och lungor (BAL) och arterna av mykoplasma identifierades med hjälp av PCR och sekvensering. Studien fann att endast *M. cynos* var signifikant associerad med respiratorisk sjukdom (Chalker *et al.*, 2004). Även Decaro *et al.* (2016) har konstaterat att *M. canis* roll i kennelhostakomplexet verkar vara minimal (Decaro *et al.*, 2016). Flera studier har bekräftat *M. cynos* roll i kennelhosta genom att isolera bakterien från hundar med kennelhosta (Chvala *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2016; Rycroft *et al.*, 2007; Zeugswetter *et al.*, 2007). *M. cynos* är vanligast hos hundar med måttliga symtom på sjukdom, vilket inkluderar hosta, näsflöde, nedsatt allmäntillstånd och inappetens (Chalker *et al.*, 2004; Chvala *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2016). En studie har visat att *M. cynos* var vanligare hos yngre hundar än hos äldre (Chalker *et al.*, 2004). *M. cynos* har hittats i saminfektion med andra bakterier och virus hos hundar med kennelhosta (Chalker *et al.*, 2004; Chvala *et al.*, 2007; Decaro *et al.*, 2016; Rosendal, 1978). Bakterien har också hittats som enda agens i ett fall med kraftig bronkopneumoni i en kull av unga valpar vilket resulterade i att några av valparna avled (Zeugswetter *et al.*, 2007).

Samma studiepopulation som Chalker *et al.* (2004) hittade *M. cynos* i, undersöktes också för förekomst av andra patogener och de fann att CRCoV, *B. bronchiseptica* och *S. equi* subsp. *zooeconomicus* var associerade med kennelhosta (Chalker *et al.*, 2003b, 2003a; Erles *et al.*, 2003). CRCoV var dominerande hos hundar med milda kliniska symtom, *B. bronchiseptica* hos måttliga symtom och *S. equi* subsp. *zooeconomicus* hos hundar med kraftiga kliniska symtom. Chalker *et al.* (2003b) visade att ett större antal bakterier kunde hittas hos hundar med kraftigare symtom på sjukdom och Chalker *et al.* (2004) menar att blandinfektioner leder till att det är svårare att isolera specifika bakterier vilket kan ha försvårat identifiering av *M. cynos* i studien (Chalker *et al.*, 2003b, 2004).

I andra studier har *M. cynos* identifierats som enda bakterie i fall med hundar med kennelhosta. Författarna menar dock att det kan vara orsakat av att hundarna i de båda studierna stod på en antibiotikakur som kan ha slagit ut andra bakterier (Mannering *et al.*, 2009; Zeugswetter *et al.*, 2007). Mykoplasma har också tidigare isolerats som enda agens hos hundar med symtom på kennelhosta men i dessa fall har arten av mykoplasma inte specificerats (Chandler & Lappin, 2002).

Huruvida *M. cynos* kan överleva i miljön är ännu inte kartlagt, men andra arter av mykoplasma kan överleva från veckor till flera månader (Nagatomo *et al.*, 2001) och Chalker *et al.* (2004) har visat att *M. cynos* kan isoleras från luft vilket är ett bevis för att bakterien kan finnas i miljön (Chalker *et al.*, 2004).

### **Pneumovirus**

Hundens pneumovirus (CnPnV) är en av de senaste beskrivna agens i kennelhostakomplexet. CnPnV beskrevs först år 2010 i en studie från USA där viruset isolerades från hundar med kennelhosta (Renshaw *et al.*, 2010). År 2011 genomfördes en fullgenomsekvensering av CnPnV och den bekräftade att viruset hamnade i genus *Pneumovirus*, subfamilj *Pneumovirinae*, familj *Paramyxoviridae* (Renshaw *et al.*, 2011). CnPnV har identifierats från hundar med kennelhosta, men huruvida viruset kan orsaka sjukdom är inte klarlagt. En studie visade att CnPnV kan ingå i saminfektioner då de även diagnostiserats samtidigt som andra agens (Renshaw *et al.*, 2011).

CnPnV har visat sig likna andra viktiga respiratoriska patogener hos både djur och människa, däribland humant och bovint respiratoriskt syncytialvirus, humant metapneumovirus och framförallt musens pneumovirus (MPV). Studier avseende CnPnVs patogenes hos hundar saknas. Andra pneumovirusarter sprids via kontakt med saliv och näsflöde (Decaro *et al.*, 2014). En studie på möss visade att CnPnV replikerade effektivt i lungorna och viralt antigen fanns framförallt i bronkiolernas epitelceller (Percopo *et al.*, 2011).

Pneumovirus har också hittats som en del av kennelhostakomplexet i studier från Italien och Storbritannien (Decaro *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2013). I en studie sågs att majoriteten av de hundar som var positiva för pneumovirus utvecklade milda till måttliga symtom på respiratorisk sjukdom. I studien sågs även att hundar som var seropositiva för pneumovirus hade en lägre risk att utveckla respiratorisk sjukdom (Mitchell *et al.*, 2013).

## MATERIAL OCH METODER

### Material

De prover som användes i denna studie samlades in mellan 2013-2016 från hundar med och utan symtom på kennelhosta, inom ramen för en tidigare klinisk studie på Sveriges Lantbruksuniversitet om kennelhosta ("Kennelhosta hos hund"). Totalt provtogs 120 hundar genom nässvalgsvabbprov inom ramen för etiskt tillstånd C227/11 och C127/14. I denna studie ingår 90 stycken av de insamlade proverna, samt nyprovtagning av två hundar som under studiens gång insjuknade i närområdet. Totalt var 72 av hundarna sjuka och 20 var friska kontroller. Proverna togs genom svabbprov från nos och svalg. Proverna från hundar med symtom på kennelhosta togs 0-7 dagar efter symptomens uppkomst. Alla raser och hundar i alla åldrar var välkomna att delta i provtagningen. Prover samlades in från veterinärkliniker runt om i Sverige från hundar där djurägarna medgav provtagning av hundarna. Information samlades in om de hundar som provtogs, där inkluderades hur länge symtomen funnits, grad av symtom (frisk, lindrig, måttlig, kraftig), vaccinationsstatus, misstänkt smittkälla samt aktiviteter som hunden deltagit i den senaste tiden.

Hundens kliniska symtom graderades enligt följande:

- Lindrigt: Opåverkat AT, hostar sporadiskt
- Måttligt: Opåverkat AT, hostar kraftigt och ihållande
- Kraftigt: Påverkat AT, djup hosta.

Samtliga prov skickades till Statens veterinärmedicinska anstalt (SVA) för DNA/RNA extraktion (maskin Magnatrix 8000+ 96-well extraktionsrobot). Extraherat DNA/RNA förvarades i -80°C.

Proverna har i tidigare studier analyserats för CAV-2, CHV, EIV, CPIV-2, CRCoV och *B. bronchiseptica* (SVA:s luftvägspaket för hund).

### Metod

#### ***Mykoplasmadiagnostik***

##### *DNA-extraktion av positiv kontroll*

DNA-extraktion av positiv kontroll för *M. canis* och *M. cynos* från SVA utfördes med hjälp av QIAamp DNA mini kit (Qiagen) med protokoll DNA Purification from Blood or Body Fluids (spin protocol). Koncentrationen av dsDNA analyserades med hjälp av Qubit 2.0 Fluorometer dsDNA HS (high sensitivity) enligt tillverkarens protokoll.

##### *PCR*

PCR användes för att screena proverna för *M. canis* och *M. cynos*. PCR kördes på ProFlex™ 3 x 32-well PCR System (Life Technologies, 4484073). Proverna kördes enligt PCR protokoll PCR BIO HS Taq DNA Polymerase (PCR Biosystems) och provernas volym var 50 µl. Mastermixen som användes bestod av 0,4 µM av vardera primer (enligt Chalker *et al* 2004, se tabell 1), 1x PCR BIO Reaction buffer, 1,25 enheter av PCR BIO HS Taq DNA polymerase och 2 µl av templat DNA. I varje körning inkluderades en positiv kontroll från SVA och en

negativ kontroll. Det PCR-program som användes var 95 grader i 2 minuter och sedan 40 cykler med 95 grader i 15 sekunder, 55 grader i 15 sekunder och 72 grader i 15 sekunder. Samma forward primer användes för både *M. canis* och *M. cynos*.

Tabell 1: *Primers som användes för PCR*

Primer <sup>1</sup>	Sekvens (5'-3')	Tm (°C)	Produktstorlek (bp)
<b>M.cynos_rev</b>	GATACATAAACACAACATTATATTG	55,8	227
<b>M.canis_rev</b>	CTGTCGGGGTTATCTCGAC	62,1	247
<b>Myck-fwd</b>	CACCGCCCGTCACACCA	71,2	

<sup>1</sup>*Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease, Chalker et al, Microbiology 150, 3491–3497, 2004*

### Gelelektrofores

En 2%-ig gel tillverkades med 1xTBE-buffer och Universal Agarose, peqGold (VWR life science) samt tillsats av GelRed. Gelen laddades med 5 µl prov blandat med 1 µl DNA Gel Loading Dye i brunnarna. Gelen kördes på 100 volt mellan 30-60 minuter. GeneRuler 1 Kb Plus DNA ladder användes som steg. Gelen lästes av på BioRad ChemiDoc touch imaging system under UV-ljus.

### DNA sekvensering

Positiva prover renades med GeneJet PCR Purification kit (Thermo Fischer Scientific) och skickades för sekvensering till Macrogen.

## **Pneumovirusdiagnostik**

### *Realtids-RT-PCR*

Realtids-RT-PCR (rRT-PCR) användes för att leta efter pneumovirus i proverna. rRT-PCR kördes på Corbett Research Rotor-Gene 3000. AgPath-ID One-Step RT-PCR kit (Thermo Fisher Scientific) användes enligt standardprotokoll, det vill säga 0,3 µM av respektive primer, 1x RT-PCR buffer, 0,2 µM TaqMan probe, 1x RT-PCR enzyme mix och 2 µl RNA. Primersekvenserna som användes är hämtade från Decaro *et al* (2014) och amplifierar en bit av M2-genen, se tabell 2. Slutvolym var 25 µl. I varje körning inkluderades en RNA-standard för PCR-produkten för CnPnV från Nicola Decaro (University of Bari, Italien), samt en negativ kontroll utan tillsats och en negativ kontroll med nukleasfritt vatten. En spädningsserie av RNA-standarderna genomfördes för standardkurvan och på sätt kunde antalet genkopior per reaktion i positiva prover beräknas. rRT-PCR-programmet som användes var 45 grader i 10 minuter, 95 grader i 10 minuter och sedan amplifiering i 40 cykler med 95 grader i 15 sekunder och 60 grader i 45 sekunder.

Tabell 2: *Primers och probe som användes för RT-PCR*

Primer/Probe <sup>1</sup>	Sekvens (5'-3')	Tm (°C)
---------------------------	-----------------	---------



---

<b>CnPnV-For</b>	AAGATAAATTCTTCTATGAAAACAGAATGA	62,2
<b>CnPnV-Rev</b>	CCCATCGTAAGTGAGGTTTCTATT	63,0
<b>CnPnV-Pb</b>	CTGCCTAAATACTATCCAGCCATACTGC	67,9

---

<sup>1</sup>*Full-Genome Analysis of a Canine Pneumovirus Causing Acute Respiratory Diseases in Dogs, Italy. Decaro et al. PLOS ONE 9, e85220, 2014.*

## RESULTAT

### Mykoplasma

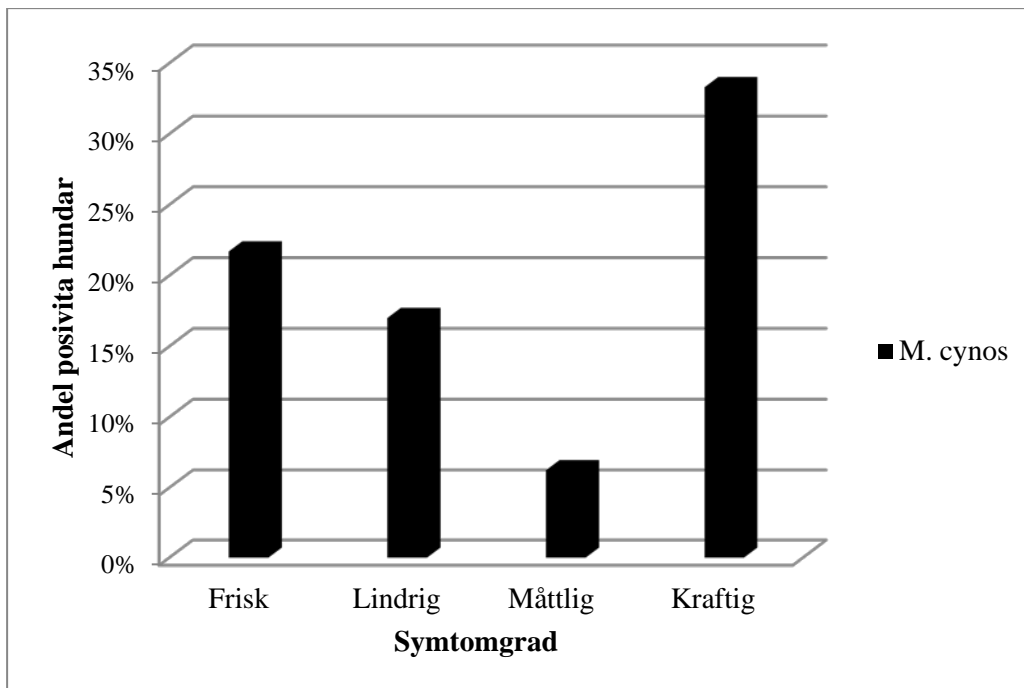
Totalt 15 av de 92 proverna som analyserades var positiva för *M. cynos*. Av de positiva proverna var 12 stycken från sjuka individer och 3 stycken från friska kontroller. För *M. canis* var 76 av hundarna positiva, 57 av de positiva hundarna var sjuka och 17 var friska (tabell 3). Inget statistiskt signifikant samband kunde ses mellan kennelhosta och *M. canis* eller *M. cynos* (Fisher's exact test; P = 1,00).

Tabell 3: Prevalensen av mykoplasma hos de provtagna hundarna

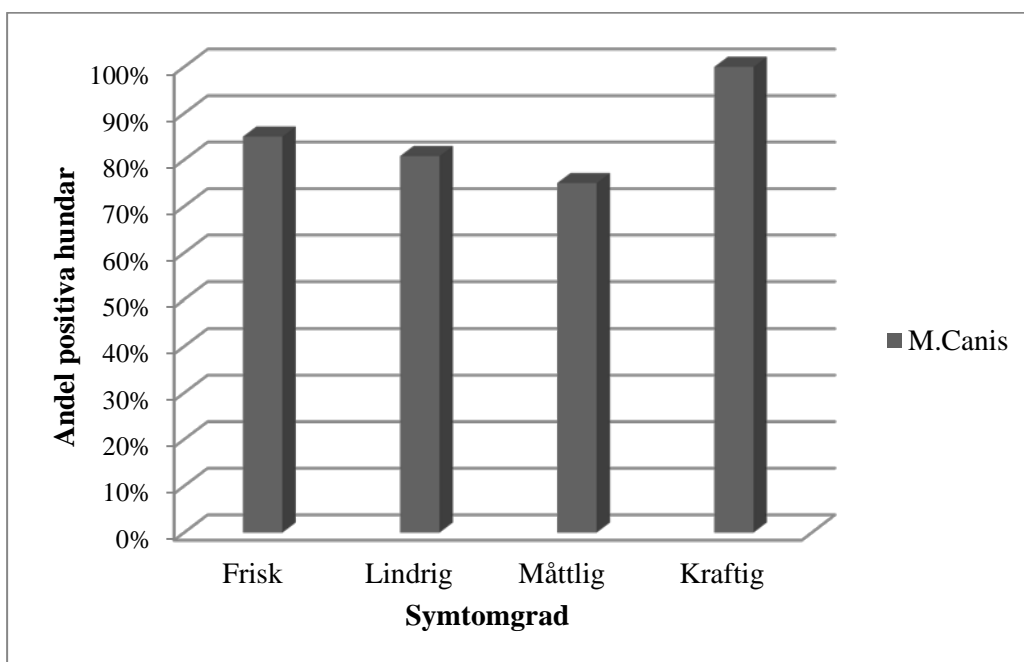
Mykoplasma	Positiva (av sjuka)	Positiva (av friska)	Totala positiva	P-värde	95%-igt konfidensintervall
<i>M. cynos</i>	12/72 (16,6%)	3/20 (15%)	15/92 (16,3%)	1,00	Sjuka: (0,081;0,253) Friska: (0,000;0,306)
<i>M. canis</i>	59/72 (81,9%)	17/20 (85%)	76/92 (82,6%)	1,00	Sjuka: (0,731;0,908) Friska: (0,694;1,000)

### Symtomgrad

De provtagna hundarna delades också in efter sjukdomstecken. Totalt av de 92 provtagna hundarna var 20 stycken friska kontroller och 72 sjuka individer. Av de sjuka hundarna räknades 47 ha lindriga symtom, 16 måttliga och 9 kraftiga symtom. Av de femton positiva proverna för *M. cynos* var 3 stycken friska kontroller och 12 från sjuka individer. I figur 1 presenteras de olika graderna av symtom och andelen positiva prover av varje kategori för *M. cynos*. Av de 12 proverna positiva för *M. cynos* var 22 % (8/47) klassade med lindriga symtom, 17 % (1/16) med måttliga och 33,3 % (3/9) med kraftiga symtom. I figur 2 redovisas samma resultat för *M. canis*. Sjuttiosex hundar var positiva för *M. canis* och av dessa var 17 stycken friska kontroller. Totalt hade 80,8 % (38/47) lindriga symtom, 75 % (12/16) måttliga symtom och 100 % (9/9) kraftiga symtom.



Figur 1: Fördelning av symtomgrad hos hundar positiva för *M. cynos*.

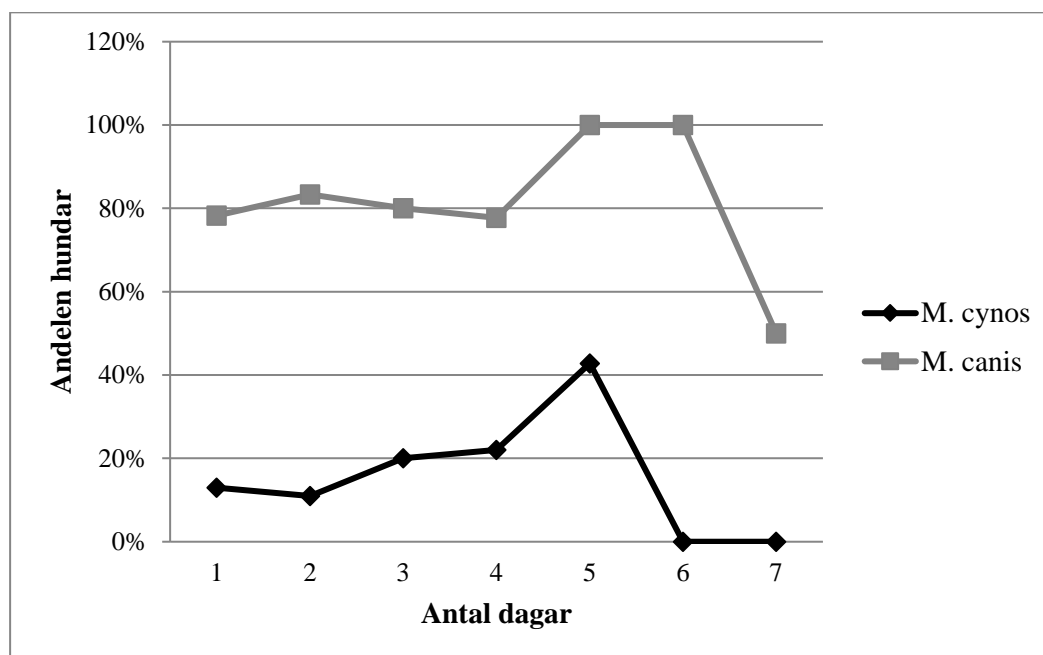


Figur 2: Fördelning av symtomgrad hos hundar positiva för *M. canis*.

### Antal sjukdomsdagar

Av de hundar som var positiva för *M. cynos* och *M. canis* undersöktes antal sjukdomsdagar (figur 3). Resultaten beskriver andelen positiva resultat för de olika sjukdomsdagarna hundarna provtogs på. Av de hundar som provtogs vid dag 1 i sjukdomsförloppet påvisades *M. cynos* hos 13 % (3/23) av hundarna, 11 % (2/18) hade visat symtom i 2 dagar, 20 % (2/10) i 3 dagar, 22 % (2/9) i 4 dagar och 42,8 % (3/7) i 5 dagar. Ingen av de som provtogs dag 6 och 7 var positiv för *M. cynos*. Av de hundar som var positiva för *M. canis* hade 78,3 % (18/23) stycken visat tecken på sjukdom i en dag, 83,3 % (15/18) i två dagar, 80 % (8/10) i tre dagar,

77,7 % (7/9) i fyra dagar, 100 % (7/7) i fem dagar, 100 % (3/3) i sex dagar och 50 % (1/2) i sju dagar.



Figur 3. Antal dagar med sjukdom hos hundar positiva för *M. canis* och *M. cynos*.

### Saminfektioner

Av de prover som analyserades i tidigare forskning vid SLU ("Kennelhosta hos hund") var 27 av hundarna positiva för CPIV-2, 12 stycken positiva för CRCoV och en positiv för CAV-2. Tabell 4 visar en sammanfattning av saminfektioner. *M. canis* var lika vanligt som ensamt agens (40 st) och i saminfektioner (36 st). *M. canis* och CPIV-2 kunde ses som saminfektion hos 24 av hundarna. Saminfektion kunde även ses mellan CRCoV och *M. canis* hos 9 av hundarna. Den hund som var positiv för CAV-2 var även positiv för *M. canis* och CRCoV. Saminfektioner kunde också ses med *M. cynos*. Av de positiva proverna för *M. cynos* var 2 av proverna även positiva för CPIV-2. Saminfektion mellan *M. cynos* och CRCoV kunde ses i 6 av proverna. Endast ett prov var enbart positivt för *M. cynos* utan saminfektioner. Det positiva provet kom från en frisk kontrollhund. Saminfektioner mellan CAV-2 och *M. cynos* kunde inte ses. Hos 13 hundar sågs *M. canis* och *M. cynos* samtidigt. Totalt 5 av hundarna var positiva för *M. cynos*, *M. canis* och CRCoV samtidigt och 2 hundar var positiva för *M. cynos*, *M. canis* och CPIV-2. Ingen hund var positiv för *M. cynos*, CRCoV och CPIV-2 samtidigt.

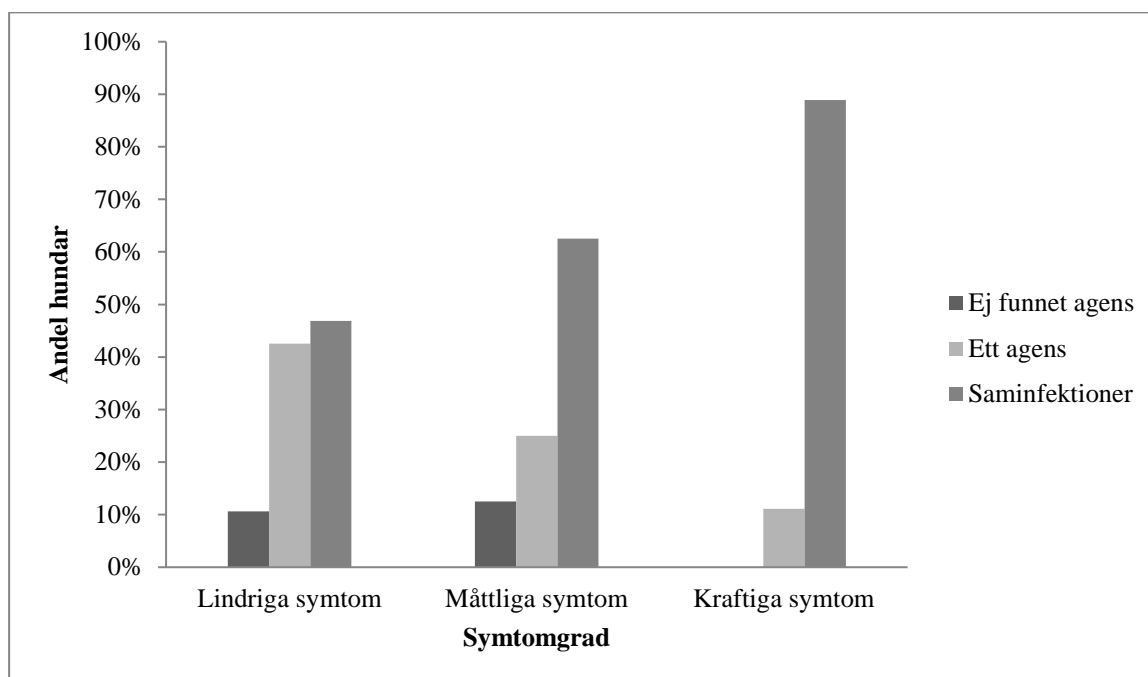
Tabell 4: *M. cynos*, *M. canis* och saminfektioner

Agens	<i>M. cynos</i> positiva	<i>M. canis</i> positiva	Totalt antal positiva
<b>CPIV-2</b>	2	24	27
<b>CRCoV</b>	6	9	12
<b>CAV-2</b>	0	1	1
<b><i>M. canis</i></b>	13	61	74

<i>M. cynos</i>	2	13	15
<b>CRCoV + CPIV-2</b>	0	0	-
<i>M. canis</i> + <b>CRCoV</b>	5	-	-
<i>M. canis</i> + <b>CPIV-2</b>	2	-	-

### Saminfektioner och symtomgrad

Det var totalt 9 hundar som klassificerades med kraftiga symtom i den här studien. Av dessa hundar hittades agens hos samtliga hundar. Hos endast en av hundarna hittades enbart ett agens, men hos resterande 8 stycken sågs saminfektion med minst två agens (88,9 %). Av de 16 hundar som hade måttliga symtom kunde inget agens ses hos 2 individer (12,5 %). Hos 4 stycken sågs endast ett agens utan saminfektion (12,5 %) och hos 10 stycken sågs saminfektioner (62,5 %). Det var 47 stycken hundar med lindriga symtom och av dessa kunde inget agens ses hos 5 hundar (10,6 %), men hos 20 av hundarna hittades ett agens (42,6 %) och hos 22 stycken sågs saminfektioner (46,9 %). Skillnaden mellan hundar med kraftiga och lindriga symtom (Fisher's exact test,  $p = 0,064$ ) och kraftiga och måttliga symtom (Fisher's exact test,  $p = 0,61$ ) var dock inte statistiskt signifikant. Ingen signifikant skillnad kunde heller ses mellan hundar med måttliga och lindriga symtom (Fisher's exact test,  $p = 0,35$ ).



Figur 4: Andel hundar i respektive symtomgrad med antalet funna agens

### Pneumovirus

Två av de 92 provtagna hundarna var positiva för pneumovirus (2,2 %). Båda uppvisade lindriga symtom. En av hundarna hade uppvisat symtom i 2 dagar vid provtagning, och en i 4 dagar. Båda uppvisade saminfektion med *M. canis*. Inga andra agens var identifierade som saminfektioner. Hundarna är provtagna från samma provtagningsområde men lever inte i samma familj.

## DISKUSSION

Pneumovirus roll i kennelhostakomplexet och dess utbredning är inte helt klarlagt. Viruset upptäcktes i samband med kennelhosta först år 2010 i USA (Renshaw *et al.*, 2010) och efter det har viruset även påvisats i Storbritannien och Italien (Decaro *et al.*, 2014; Mitchell *et al.*, 2013). I en studie sågs ett starkt samband mellan CnPnV och kennelhosta (Mitchell *et al.*, 2013). Enligt kändedom har inga studier tidigare tittat på prevalensen av pneumovirus i Sverige. I den aktuella studien påvisades två positiva prover av pneumovirus (2,2 %). Detta är för litet antal för att dra vidare slutsatser, men kan konfirmera att CnPnV finns i Sverige och kan vara en del av kennelhostakomplexet även hos svenska hundar.

Båda hundarna som i den här studien testades positiva för CnPnV hade lindriga symtom på kennelhosta. Den ena hunden var provtagen två dagar efter symptomutbrott och den andra fyra dagar efter. Andra studier har visat att även kliniskt friska hundar kan vara positiva för CnPnV (Decaro *et al.*, 2016) men det var ingenting som sågs i den här studien.

Saminfektioner med *M. canis* och CnPnV kunde ses hos de två positiva hundarna. Inga andra agens var identifierade som saminfektioner. Tidigare studier har dock kunnat se saminfektioner mellan CnPnV och CRCoV, *B. bronchiseptica* och *M. canis* (Decaro *et al.*, 2016; Renshaw *et al.*, 2011), men då kunde inget samband mellan CnPnV och kennelhosta upptäckas.

De CnPnV-positiva proverna är provtagna i samma län med 6 dagars mellanrum, och kommer troligen från samma sjukdomsutbrott. I den här studien kommer de provtagna hundarna från många olika ställen i landet och är samlat över flera år. Det hade varit intressant att jämföra olika utbrott med varandra då kennelhosta är en komplex sjukdom med flera agens som kan vara involverade.

Tidigare studier som undersökt mykoplasmas roll i kennelhostakomplexet har sett ett samband mellan kennelhosta och *M. cynos*, men i den här studien kunde inget samband ses. Av de provtagna hundarna i den här studien var 16,6 % av de friska hundarna positiva och 15 % av de sjuka hundarna. I en studie som sett ett samband mellan *M. cynos* och kennelhosta var 9,7 % av de friska hundarna positiva för *M. cynos* och cirka 22 % av de sjuka hundarna (Chalker *et al.*, 2004). Andra studier har också bekräftat *M. cynos* roll i komplexet (Decaro *et al.*, 2016; Rycroft *et al.*, 2007). I en studie sågs inget samband mellan *M. cynos* och kennelhosta. Där var 81 % av de sjuka hundarna positiva för *M. cynos* och 73 % av de friska hundarna (Joffe *et al.*, 2016). I studier som fann ett samband mellan *M. cynos* och kennelhosta provtogs hundarna från nedre luftvägarna genom BAL (bronkoalveolärt lavage) (Chalker *et al.*, 2004; Mannering *et al.*, 2009). En annan studie provtog hundarna genom nässvabbprov och såg inget samband med kennelhosta (Joffe *et al.*, 2016). Det är möjligt att provtagning med nässvalgsvabb inte är det mest lämpliga sätt för att finna *M. cynos*. *M. cynos* har tidigare isolerats från både sjuka och friska individer (Chalker *et al.*, 2004; Joffe *et al.*, 2016; Rycroft *et al.*, 2007). På grund av att *M. cynos* kan finnas hos både sjuka och friska individer är det svårt att utvärdera bakteriens roll i kennelhostakomplexet.

I den här studien var *M. canis* vanligt förekommande hos de provtagna hundarna men inget samband kunde ses mellan *M. canis* och kennelhosta. Detta har inte heller visats i tidigare studier som undersökt mykoplasmas roll i kennelhostakomplexet (Chalker *et al.*, 2004; Decaro *et al.*, 2016). Prevalensen av *M. canis* var hos de sjuka hundarna 81,9 % och hos de

friska kontrollerna 85 %. I en tidigare studie sågs *M. canis* hos 21,8 % av de friska hundarna och hos 30,2% av de sjuka hundarna. Detta utgjorde en population i studien som provtogs med tonsillsvabb, men liknande resultat kunde ses hos den andra populationen i studien som provtogs från nedre luftvägar (Chalker *et al.*, 2004).

I figur 1 jämförs de som testats positiva för *M. cynos* med symtomgrad av sjukdom. Där ses att den största procentuella delen är de som är sjuka med kraftiga symtom (33 %). Till kraftiga symtom räknas de hundar som uppvisar ett påverkat allmäntillstånd och djup hosta vid provtagningstillfället. I tidigare studie sågs att *M. cynos* är vanligast vid måttliga symtom på sjukdom vilket i den studien inkluderade hosta och näsflöde och till viss del även nedsatt allmäntillstånd. I studien räknades kraftiga symtom då den drabbade hunden hade hosta, näsflöde, nedsatt allmäntillstånd och/eller inappetens samt kliniska tecken på sjukdom i nedre luftvägarna (Chalker *et al.*, 2004). Sett till uppdelning av symtomgrad verkade majoriteten av hundarna i föregående studie och den här studien ha liknande symtom. Vid jämförelse med *M. canis* och symtomgrad (figur 2) kan inte någon direkt skillnad ses. Alla hundar med kraftiga symtom som var med i studien var positiva för *M. canis*.

Vid provtagning fick ägare till deltagande hundar fylla i ett formulär, och där ingick frågor om hur länge hunden uppvisat symtom på sjukdom. I figur 3 redovisas andelen positiva hundar för *M. canis* och *M. cynos*. Intressant är att det kan ses en procentuellt tydlig ökning i andelen positiva hundar med *M. cynos* vid dag 5, men *M. cynos* påvisades även under tidigt sjukdomsförlopp. Inga positiva prover kunde ses under dag 6 och 7. Studier har visat att *M. cynos* är involverad i tidig sjukdom med kennelhosta och eventuellt kan fungera som initierande agens (Chalker *et al.*, 2004; Rycroft *et al.*, 2007). I den här studien går det inte att se en tydlig skillnad i *M. cynos* och antal sjukdomsdagar. Det kan vara orsakat av att det inte är lika många hundar som testats positiva.

I den här studien sågs enbart en hund som endast var positiv för *M. cynos*. Övriga hundar som var positiva för *M. cynos* var även positiva för andra agens. Det är tidigare omtalat om *M. cynos* som ensam agens kan orsaka sjukdom. Tidigare studier har föreslagit detta, men utan att specificera vilken mykoplasmaart (Chandler & Lappin, 2002). Två studier som undersökt *M. cynos* roll hittade *M. cynos* som enda agens hos sjuka hundar men i båda studierna var de positiva hundarna behandlade med antibiotika vilket författarna menar kan vara orsaken till resultatet (Mannering *et al.*, 2009; Zeugswetter *et al.*, 2007). Senare studier som letat efter saminfektioner och *M. cynos* har kunnat bekräfta att *M. cynos* kan agera som enda agens och orsaka sjukdom (Joffe *et al.*, 2016).

I den här studien var saminfektioner mycket vanligt, främst på grund av *M. canis* höga prevalens. Saminfektioner med *M. canis* var vanligt förekommande med CPIV-2, CRCoV och *M. cynos*. Den enda hund som tidigare observerats positiv för CAV-2 var också den positiv för *M. canis*. Saminfektioner kunde också ses mellan *M. cynos*, CPIV-2 och CRCoV. Ingen hund var positiv för *M. cynos*, CRCoV och CPIV-2 samtidigt. Saminfektioner mellan CAV-2 och *M. cynos* sågs inte vilket främst kan bero på den låga förekomsten av positiva individer med CAV-2. Två hundar var positiva för *M. cynos*, *M. canis* och CPIV-2 samtidigt. Även hundar som var positiva för *M. cynos*, *M. canis* och CRCoV samtidigt kunde ses. Vilken roll saminfektioner har för kennelhostakomplexet är inte helt utrett (Chvala *et al.*, 2007; Erles *et al.*, 2004).

En tidigare studie visade att det fanns ett signifikant samband mellan förekomsten av *M. cynos* och CRCoV i saminfektion, liksom *M. cynos* och *M. canis* i saminfektion (Decaro *et al.*, 2016). Samma studie såg även att förekomst av saminfektion mellan *M. cynos*, CPIV-2 och *B. bronchiseptica* var möjligt, men detta var inte signifikant (Decaro *et al.*, 2016). En annan studie där förekomsten av *M. cynos* var hög har också visat att saminfektion med *M. cynos* är vanligt förekommande. Där sågs att saminfektioner mellan *M. cynos*, CPIV-2 och CRCoV var vanligt förekommande. Inte heller i den studien kunde saminfektion med alla tre ovan nämnda patogener ses samtidigt (Joffe *et al.*, 2016).

Vid jämförelse mellan antalet påfunna agens och symtomgrad kunde nästan en signifikant skillnad ses mellan hundar med kraftiga och lindriga symtom. Hos alla hundar med kraftiga symtom sågs minst ett agens och det var mycket vanligt med saminfektioner. Hos hundar med måttliga symtom var saminfektioner fortsatt vanligast, men hos flera hundar kunde endast ett agens upptäckas och hos några individer sågs inget av de agens som undersöktes i studien. Hos hundar med lindriga symtom var det lika vanligt med saminfektioner som att enbart ett agens hittades. Även i denna grupp hundar sågs en andel utan något identifierat agens. Tidigare studier har föreslagit att agens kan agera synergistiskt och potentiella sjukdom (Buonavoglia & Martella, 2007; Randolph *et al.*, 1993). Upptäckten i den här studien kan tala för att agens kan potentiella varandra och tillsammans orsaka allvarligare sjukdomstecken.



## **KONKLUSION**

I detta examensarbete kunde inget statistisk signifikant samband påvisas mellan kennelhosta och förekomst av mykoplasma och pneumovirus. Både *M. cynos* och *M. canis* kunde ses hos både sjuka och friska individer. Förekomsten av *M. cynos* uppmättes till 16,3 % varav 12/72 (16,6%) av de sjuka var positiva och 3/20 (15 %) var friska. Förekomsten av *M. canis* var 82,6 % varav 59/72 (81,9 %) av de sjuka var positiva och 17/20 (85 %) var friska. Pneumovirus kunde ses hos två individer i studien vilka båda var lindrigt sjuka. Detta är i enighet med tidigare studier att CnPnV kan vara en del av kennelhostakomplexet och orsaka sjukdom. Då kennelhosta är en komplex sjukdom med flera agens som kan vara involverade krävs fler studier för att vidare kartlägga olika agens utbredning och på så sätt vidare få en uppfattning om vilka agens som är involverade vid sjukdomsutbrott.

## **ACKNOWLEDGMENT**

Tack till Tomas Jinnerot på SVA för positiva kontroller för mykoplasma och Nicola Decaro på University of Bari i Italien för positiva kontroller för CnPnV. Tack även till följande anslagsgivare: Agria/SKK:s forskningsfond, Svelandsstiftelsen för djurens hälsa och livskvalité, Jan Skogsborgs fond och MSD Animal Health.

## REFERENSER

- Almes, K.M., Janardhan, K.S., Anderson, J., Hesse, R.A., Patton, K.M., 2010. *Fatal Canine Adenoviral Pneumonia in Two Litters of Bulldogs*. J. Vet. Diagn. Invest. 22, 780–784.
- Appel M., Binn L.N., *Canine infectious tracheobronchitis. Short review: kennel cough*, in: Appel M.J. (Ed.), *Virus infections of carnivores*, Elsevier Science Publisher, Amsterdam, 1987, pp. 201–211.
- Bemis, D.A., 1992. *Bordetella and Mycoplasma Respiratory Infections in Dogs and Cats*. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract. 22, 1173–1186.
- Buonavoglia, C., Martella, V., 2007. *Canine respiratory viruses*. Vet. Res. 38, 355–373
- Byun, J.-W., Yoon, S.-S., Woo, G.-H., Jung, B.Y., Joo, Y.-S., 2009. *An outbreak of fatal hemorrhagic pneumonia caused by Streptococcus equi subsp. zooepidemicus in shelter dogs*. J. Vet. Sci. 10, 269–271.
- Chalker, V.J., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2003a. *The association of Streptococcus equi subsp. zooepidemicus with canine infectious respiratory disease*. Vet. Microbiol. 95, 149–156.
- Chalker, V.J., Owen, W.M.A., Paterson, C., Barker, E., Brooks, H., Rycroft, A.N., Brownlie, J., 2004. *Mycoplasmas associated with canine infectious respiratory disease*. Vet. Microbiol. 150, 3491–3497.
- Chalker, V.J., Toomey, C., Opperman, S., Brooks, H.W., Ibuoye, M.A., Brownlie, J., Rycroft, A.N., 2003b. *Respiratory Disease in Kennelled Dogs: Serological Responses to Bordetella bronchiseptica Lipopolysaccharide Do Not Correlate with Bacterial Isolation or Clinical Respiratory Symptoms*. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 10, 352–356.
- Chandler, J.C., Lappin, M.R., 2002. *Mycoplasma Respiratory Infections in Small Animals: 17 Cases (1988–1999)*. J. Am. Anim. Hosp. Assoc. 38, 111–119.
- Chvala, S., Benetka, V., Möstl, K., Zeugswetter, F., Spergser, J., Weissenböck, H., 2007. *Simultaneous Canine Distemper Virus, Canine Adenovirus Type 2, and Mycoplasma Cynos Infection in a Dog with Pneumonia*. Vet. Pathol. 44, 508–512.
- Day, M.J., Horzinek, M.C., Schultz, R.D., Squires, R.A., 2016. *WSAVA Guidelines for the vaccination of dogs and cats*. J. Small Anim. Pract. 57, E1–E45.
- Decaro, N., Mari, V., Larocca, V., Losurdo, M., Lanave, G., Lucente, M.S., Corrente, M., Catella, C., Bo, S., Elia, G., Torre, G., Grandolfo, E., Martella, V., Buonavoglia, C., 2016. *Molecular surveillance of traditional and emerging pathogens associated with canine infectious respiratory disease*. Vet. Microbiol. 192, 21–25.
- Decaro, N., Pinto, P., Mari, V., Elia, G., Larocca, V., Camero, M., Terio, V., Losurdo, M., Martella, V., Buonavoglia, C., 2014. *Full-Genome Analysis of a Canine Pneumovirus Causing Acute Respiratory Disease in Dogs, Italy*. PLOS ONE 9, e85220.
- Englund, L., Jacobs, A.A.C., Klingeborn, B., Chriel, M., 2003. *Seroepidemiological survey of Bordetella bronchiseptica and canine parainfluenza-2 virus in dogs in Sweden*. Vet. Rec. 152, 251–254.
- Erles, K., Brownlie, J., 2008. *Canine Respiratory Coronavirus: An Emerging Pathogen in the Canine Infectious Respiratory Disease Complex*. Vet. Clin. North Am. Small Anim. Pract., Emerging and Reemerging Viruses in Dogs and Cats 38, 815–825.
- Erles, K., Dubovi, E.J., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2004. *Longitudinal Study of Viruses Associated with Canine Infectious Respiratory Disease*. J. Clin. Microbiol. 42, 4524–4529.

- Erles, K., Toomey, C., Brooks, H.W., Brownlie, J., 2003. *Detection of a group 2 coronavirus in dogs with canine infectious respiratory disease*. *Virology* 310, 216–223.
- Fass (2015-10-20). *Nobivac® KC vet*.  
<https://www.fass.se/LIF/product?userType=1&nplId=20070314000021>. [2017-11-25]
- Ford, RB. (2012). Canine Infectious Respiratory Disease. I: Greene, CE. *Infectious Diseases of Dog and Cat*. 4 ed. Missouri: Elsevier Saunders, 55-66.
- Joffe, D.J., Lelewski, R., Weese, J.S., McGill-Worsley, J., Shankel, C., Mendonca, S., Sager, T., Smith, M., Poljak, Z., 2016. *Factors associated with development of Canine Infectious Respiratory Disease Complex (CIRDC) in dogs in 5 Canadian small animal clinics*. *Can. Vet. J.* 57, 46–51.
- Mannering, S.A., McAuliffe, L., Lawes, J.R., Erles, K., Brownlie, J., 2009. *Strain typing of Mycoplasma cynos isolates from dogs with respiratory disease*. *Vet. Microbiol.* 135, 292–296.
- Mitchell, J.A., Cardwell, J.M., Renshaw, R.W., Dubovi, E.J., Brownlie, J., 2013. *Detection of Canine Pneumovirus in Dogs with Canine Infectious Respiratory Disease*. *J. Clin. Microbiol.* 51, 4112–4119.
- Nagatomo, H., Takegahara, Y., Sonoda, T., Yamaguchi, A., Uemura, R., Hagiwara, S., Sueyoshi, M., 2001. *Comparative studies of the persistence of animal mycoplasmas under different environmental conditions*. *Vet. Microbiol.* 82, 223–232.
- Percopo, C.M., Dubovi, E.J., Renshaw, R.W., Dyer, K.D., Domachowske, J.B., Rosenberg, H.F., 2011. *Canine pneumovirus replicates in mouse lung tissue and elicits inflammatory pathology*. *Virology* 416, 26–31.
- Randolph, J.F., Moise, N.S., Scarlett, J.M., Shin, S.J., Blue, J.T., Bookbinder, P.R., 1993. *Prevalence of mycoplasmal and ureaplasma recovery from tracheobronchial lavages and prevalence of mycoplasmal recovery from pharyngeal swab specimens in dogs with or without pulmonary disease*. *Am J Vet Res* 54, 387–391.
- Renshaw, R., Laverack, M., Zylich, N., Glaser, A., Dubovi, E., 2011. *Genomic analysis of a pneumovirus isolated from dogs with acute respiratory disease*. *Vet. Microbiol.* 150, 88–95.
- Renshaw, R.W., Zylich, N.C., Laverack, M.A., Glaser, A.L., Dubovi, E.J., 2010. *Pneumovirus in Dogs with Acute Respiratory Disease*. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 993–995.
- Rosendal, S., 1978. *Canine Mycoplasmas: Pathogenicity of Mycoplasmas Associated with Distemper Pneumonia*. *J. Infect. Dis.* 138, 203–210.
- Rycroft, A.N., Tsounakou, E., Chalker, V., 2007. *Serological evidence of Mycoplasma cynos infection in canine infectious respiratory disease*. *Vet. Microbiol.* 120, 358–362.
- Schulz, B.S., Kurz, S., Weber, K., Balzer, H.-J., Hartmann, K., 2014. *Detection of respiratory viruses and Bordetella bronchiseptica in dogs with acute respiratory tract infections*. *Vet. J.* 201, 365–369.
- SVA (2016-09-29). *Kennelhosta hos hund*. <http://www.sva.se/djurhalsa/hund/infektionssjukdomar-hund/kennelhosta-hund>. [2017-11-25]
- Zeugswetter, F., Weissenböck, H., Shibly, S., Hassan, J., Spargser, J., 2007. *Lethal bronchopneumonia caused by Mycoplasma cynos in a litter of golden retriever puppies*. *Vet. Rec.* 161, 626–628.