



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för kliniska vetenskaper

Överlevnad av *Streptococcus equi* subspecies *equi* på olika material i hästens omgivning

Mikaela Andreasson

*Uppsala
2018*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2018:21*

Överlevnad av *Streptococcus equi* subspecies *equi* på olika material i hästens omgivning

Survival of *Streptococcus equi* subspecies *equi* in surfaces in stable environment

Mikaela Andreasson

Handledare: *Miia Riihimäki, Institutionen för kliniska vetenskaper*

Biträdande handledare: *John Pringle, Institutionen för kliniska vetenskaper*

Examinator: *Susanna Sternberg Lewerin, 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 2018:21

ISSN: 1652-8697

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

Nyckelord: *Kvarka, S. equi, stall, bremsar, vattenhinkar, trästolpar*

Key words: *Strangles, S. equi, twitches, water buckets, wooden posts*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för kliniska vetenskaper

SAMMANFATTNING

Kvarka orsakas av bakterien *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*) och är den vanligaste diagnostiserade infektionssjukdomen hos häst världen över. Det är en sjukdom i övre luftvägarna som orsakar feber, näsflöde och förstörade lymfknotor som kan innehålla abscesser. Sjukdomen är mycket smittsam och allvarliga komplikationer eller dödsfall förekommer. Kvarka smittar framförallt direkt mellan hästar, men också indirekt via exempelvis stallinredning eller utrustning. Kvarka har länge varit en känd sjukdom men endast ett fåtal studier har gjorts för att ta reda på om bakterien har potential att överleva en betydande tid i miljön.

Detta examensarbete syftade till att ta reda på mer kring överlevnadspotentialen av *S. equi* i en stallmiljö. Arbetet delades upp i två delar. I den första kontaminerades material i hästens närmiljö med *S. equi*; trästolpar, fyllda vattenhinkar i plast samt bremsar i plast. Bremsar är ett vanligt hjälpmedel för en veterinär vid en provtagning av en häst med misstänkt kvarka. För de två första materialen undersöktes hur lång tid bakterien överlevde och för bremsarna hur effektiva olika rengöringsscheman var. I den andra delen av arbetet undersöktes hur länge bakterien kunde påvisas i hästens närmiljö efter ett naturligt kvarkautbrott. Miljöprover togs i stall som haft konstaterade fall av kvarka på en eller flera hästar. Proverna togs tidigast tre veckor och upp till sex veckor efter det att alla hästarna blivit kliniskt friska. För diagnostik i de två delarna av arbetet användes odling, som detekterar levande bakterier samt qPCR som påvisar närvaro av bakterie-DNA.

Resultaten visade att noggrann tvätt och desinfektion av bremsar gav negativa odlingsresultat men positiva resultat på qPCR för alla desinfektionsmedel utom klorin. I hinkarna överlevde *S. equi* i maximalt 19 dagar under sommaren och i minst 73 dagar på vintern. På stolparna var odlingsresultaten positiva i maximalt 4 dagar på sommaren och 10 dagar på vintern. Tre av de fyra stallar som haft en kvarkainfektion hade miljöprover som var odlings- eller qPCR-positiva för *S. equi*. De prover som var positiva var från flera olika material; trä, metall, nylon och bomull. Ingen av de vattenhinkar som provtogs i stallarna gav positiva svar på odling eller qPCR, vilket hade kunna betyda att vattenhinkar i stallar har lägre grad av kontamination än i den experimentella studien. Inte heller de trästolpar som provtogs i stallarna gav några positiva resultat, vilket tyder på att *S. equi* inte heller överlever en längre tid på trämaterial utomhus. Alla de positiva proverna i stallarna var från ytor som inte utsattes för direkt solljus.

Resultaten indikerar att omgivningsfaktorerna påverkar hur länge *S. equi* kan överleva i en stallmiljö och att noggrann rengöring krävs för att bli av med bakterien. Tiden för överlevnad var längre på vintern än sommaren. Proverna från stallarna kan ha gett positiva odlingsresultat på grund av att de tidigare sjuka hästarna fortfarande urskilde *S. equi*. Fler studier där överlevnaden i miljön undersöks med samtidig provtagning av hästarna är önskvärt.

SUMMARY

Strangles, caused by the bacteria *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*) is the most commonly diagnosed infectious disease in horses worldwide. Infection by *S. equi* in the upper respiratory tract results in fever, nasal discharge and enlarged lymph nodes that can contain abscesses. Strangles is highly contagious and can also in some cases cause serious complications and even fatalities. Spread of *S. equi* most commonly occurs via direct contact between horses, but also spreads indirectly via for example stable interior and equipment. While strangles as a clinical disease has been well described, whether, and if so, for how long the bacteria can survive on inanimate objects in the stable environment is poorly understood.

The aim of this master's thesis was to address clinically relevant aspects of the survival of *S. equi* in a stable environment. The study was divided in two parts. Firstly, materials in horses' near environment, including wooden posts, filled plastic water buckets and plastic twitches were contaminated with a standardized broth of live *S. equi*. For the first two materials, the time of survival of *S. equi* was investigated. For the twitches, as they are commonly used by veterinarians when sampling a horse with suspicion of strangles, the effectiveness of different cleaning protocols on complete removal of *S. equi* DNA was examined. In the second part of the study, environmental samples were obtained from confirmed strangles outbreaks three to six weeks after all horses had recovered clinically. The purpose was to examine if live bacteria and/or its DNA could be detected in horses' near environment after full recovery from a naturally occurring outbreak of strangles. Culture and qPCR were used as diagnostics in both parts of the study, with culture detecting live bacteria and qPCR DNA from both live and nonviable bacteria.

The results show that *S. equi* survived maximum 19 days in the water buckets under summer conditions and at least 73 days in winter conditions. The culture-results from the wooden posts were positive for maximum 4 days in the summer and 10 days in the winter. Regarding twitches, no live *S. equi* could be recovered on culture after thorough cleaning and disinfection. However, the twitches remained positive to *S. equi* on qPCR for all disinfectants except for bleach. For the natural outbreaks, three out of four stables from the second part of the study had culture- or qPCR-results that were positive for *S. equi*. Several different materials were positive; wood, metal, polyester and cotton. In contrast to the experimental inoculation study, none of the sampled water buckets in any of the stables were positive on culture or qPCR. This may indicate that water sources in a natural outbreak of strangles may have far less contamination by *S. equi* than was done in the experimental work. Similarly, none of the wooden posts sampled in these stables yielded any positive results, which correlates with the results from the first part of the study which showed that *S. equi* did not survive a longer time on wooden material outdoors. Strikingly, all the positive samples from the stables were from surfaces not exposed to direct sunlight.

The results highlight that environmental factors affect the survival of *S. equi* in a stable environment, and thorough cleaning is necessary to get rid of live bacteria. The environmental samples from affected stables may have had positive results because contamination during the outbreak or continued shedding of *S. equi* from the previously ill horses. Nonetheless, it was clear that even following full clinical recovery from outbreaks *S. equi* can be found in stable environments. More studies of the environmental survival with concurrent sampling of the horses are in order.

INNEHÅLL

INLEDNING	1
LITTERATURÖVERSIKT	1
<i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>equi</i>	1
Kliniska tecken	2
Patogenes	2
Epidemiologi	3
Kroniska smittbärare	4
Diagnostik	4
Odling	5
PCR	5
MALDI-TOF	5
Serologi	6
Behandling	6
Hygienåtgärder och kontroll	7
Överlevnad av <i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>equi</i> i miljön	7
Tvätt- och desinfektionsmedel effektiva mot <i>S. equi</i>	9
Forskningsområden inom kvarka	10
MATERIAL OCH METODER	11
Bakterieinokulum	11
Provtagningsmetoder och diagnostik	11
Kontaminationsförsök bremsar	11
Kontaminationsförsök stolpar	13
Kontaminationsförsök hinkar	13
Provtagning stallar	14
Anamnes stallar	14
RESULTAT	15
Kontaminationsförsök bremsar	15
Kontaminationsförsök stolpar	16
Kontaminationsförsök vattenhinkar	17
Miljöprovtagning stallar	18
DISKUSSION	22
SLUTSATS	26
TACK	26
REFERENSER	27

INLEDNING

Kvarka är en vanlig och mycket smittsam luftvägssjukdom hos hästar som orsakas av *Streptococcus equi* subspecies *equi* (härefter kallad *S. equi*). Kvarkabakterien kan orsaka utbrott som både kan pågå under en lång tid och vara svåra att bli av med. Kvarka ger feber, näsflöde och förstörade lymfknutor i huvud- och halsregionen som kan innehålla abscesser. Sjukdomen kan även orsaka dödliga komplikationer. Den finns idag över nästan hela världen och forskningen har fokuserats på exempelvis vaccin och diagnostik men kunskapen kring bakteriens potential att överleva i en stallmiljö är fortfarande låg.

Kvarka smittar framförallt direkt mellan hästar, men även indirekt via miljön. Redan år 1664 fanns det teorier om att *S. equi* kunde överleva tillräckligt länge i miljön för att den vägen smitta från en häst till en annan och det ansågs att en av riskerna var kontaminerade vattenkar eller hinkar (Todd, 1910). Dagens forskning visar att en trolig orsak till de många utbrott av kvarka som inträffar varje år är de asymtomatiska eller ”tysta” smittbärare som bär bakterien under en längre tid och har potential att smitta nya hästar trots att de själv oftast inte visar några kliniska symtom (Verheyen *et al.*, 2000). Det finns dessutom en teori om att *S. equi* har en betydande potential att överleva i miljön och att kontaminerad utrustning eller stallinredning kan vara en smittkälla för nya hästar. Det är även möjligt att redskap som används vid provtagning för hästar med misstanke om kvarka, till exempel bremsar, kan bli kontaminerade med *S. equi* från en tidigare undersökning och därmed kan ge ett missvisande diagnostiskt resultat eller till och med sprida smitta.

Syftet med det här examensarbetet är att utreda vilken potential *S. equi* har att överleva på olika material i ett stall och i hästens närmiljö samt vilken betydelse överlevnadsförmågan har för den fortsatta spridningen av kvarka. Bremsar används ofta vid provtagning av hästar med misstanke om kvarka, både vid endoskopi och nässköljprovtagning. Hur bremsar som varit i kontakt med en kvarkamisstänkt häst bäst rengörs kommer därför också att utredas.

Hur länge kan *S. equi* överleva utanför sitt värdjur hästen och vilken betydelse har det för smittspridningen av kvarka? Det är inte minst en viktig frågeställning för hästägare vars stall blivit drabbat av kvarka. Det har det här examensarbetet till uppgift att ta reda på.

LITTERATURÖVERSIKT

Streptococcus equi* subspecies *equi

Streptococcus equi subspecies *equi* (*S. equi*) är en grampositiv, inkapslad, betahemolyserande bakterie i Lancefield grupp C. *S. equi* orsakar kvarka hos häst, en sjukdom som beskrevs redan år 1251 av officeraren Jordanus Ruffus (Sellon & Long, 2014). Kvarka finns över hela världen och är globalt den mest frekvent diagnostiserade infektionssjukdomen hos häst (Waller, 2014; Animal Health Trust, 2015). I Sverige är sjukdomen anmälningspliktig och mellan år 2005 och 2014 anmäldes i snitt 53 konstaterade fall av kvarka per år (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2015b).

Även *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) ingår i Lancefield grupp C. *S. equi* är en subgrupp till denna (Reed *et al.*, 2010, Waller, 2014). *S. zooepidemicus* räknas som en kommensal i hästars övre luftvägar, men kan spela en roll i respiratorisk sjukdom hos

häst och vid provtagning av en häst med kvarkaliknande symtom kan provsvaret bli *S. zooepidemicus* (Timoney, 1988; Waller, 2014; Robinson *et al.*, 2013).

Kliniska tecken

Kvarka har en inkubationstid från 3 upp till 21 dagar och den typiska symtombilden är initialt depression, anorexi och hög feber. De första kliniska tecknen följs av seröst näsflöde som efter några dagars sjukdom övergår till att vara mukopurulent till purulent (Bild 1). Andra kliniska tecken är förstorade, smärtsamma och varma retropharyngeal- och submandibularlymfknotor, hosta och ögonflöde. De förstorade lymfknotorna kan på grund av abscessbildning orsaka ät- och sväljsvårigheter. I vissa fall spricker abscesserna ut genom huden, luftsäckarna eller i farynx (Anzai *et al.*, 1999; Duffee *et al.*, 2015; Waller, 2013; Mallicote, 2015; Piché, 1984; Neamat-Allah & El Damaty, 2016). Avläkningen av sjukdomen börjar oftast efter att abscesserna spruckit (Taylor & Wilson, 2006; Sweeney, 1996). Sjukdomsdurationen är i medel 14 dagar (Christmann & Pink, 2017). Yngre hästar (1-5 år gamla) drabbas vanligtvis hårdare av sjukdomen medan vuxna hästar kan få en mer atypisk form av kvarka med endast mildare förkylningssymtom. Dock utsöndrar även de *S. equi* som kan orsaka allvarligare sjukdom hos hästar med sämre immunstatus (Boyle, 2017; Sweeney, 1996; Piché, 1984; Sweeney *et al.*, 2005). Tscheschlok *et al.* (2017) påpekar vikten av att inte enbart använda frånvaro av kliniska symtom för att säkerställa att en häst som blivit exponerad för kvarka inte är smittad.



Bild 1: Purulent näsflöde.
Foto J. Pringle

Patogenes

Efter att en smittad häst fått in *S. equi* via nosen eller munnen transporteras bakterien till tonsillvävnad i farynx. Bakterien förflyttas därifrån till huvudets lymfknotor inom 1-3 timmar efter infektion. I lymfknotorna replikerar *S. equi* för att dagar senare återfinnas i stort antal. Det sammanfaller med den initiala febern hos hästen (Timoney & Kumar, 2008; Timoney, 1988). Eftersom *S. equi* snabbt transporteras från nashålan är det 24 timmar efter smittillfället därför betydligt svårare att påvisa bakterien med hjälp av en näsvabb eller ett nässköljprov (Timoney, 1998; 2004). När hästen senare får näsflöde, ungefär 24-48 timmar efter den initiala febertoppen, kan *S. equi* åter vara upptäckbar genom provtagning från nashålan (Sweeney *et al.*, 2005). Vid en kvarkainfektion svarar hästens kropp med att skicka stora mängder neutrofiler till de infekterade lymfknotorna. *S. equi* har dock flera virulensfaktorer, såsom ytproteinet M-like protein (SeM), som effektivt hindrar den infekterade hästens medfödda immunförsvar från

att bekämpa infektionen (Waller, 2013; 2014; Boschowitz & Timoney, 1996). Kapseln av hyaluronsyra som omger *S. equi* har även den betydelse för virulensen och väl inkapslade isolat av bakterien har en större motståndskraft än mindre inkapslade isolat (Anzai *et al.*, 1999).

S. equi kan förutom att orsaka sjukdom i övre luftvägarna även ge andra komplikationer. Det drabbar upp till 20 % av de smittade hästarna och ökar mortaliteten för kvarka (Sweeney *et al.*, 1987). En av komplikationerna är sjukdom i de nedre luftvägarna, såsom pneumoni på grund av aspirerat purulent material. Ytterligare en komplikation är så kallad kastad kvarka vilken innebär att *S. equi* transporteras från de övre luftvägarna hematogent eller via lymfkärl och orsakar abscesser eller ansamlingar av bakterier i andra inre organ (Duffe *et al.*, 2015). I vissa fall spricker abscesserna i lymfknutorna in i luftsäckarna eller bihålorna. Det kan då bildas empyem eller kondroider vilket kan göra hästen till en så kallad kronisk smittbärare. Purpura haemorrhagica är ytterligare en komplikation där hästen får aseptisk nekrotiserande vaskulit med blödningar i slemhinnor samt ödem. Hästar med kvarka kan även drabbas av myosit som troligen beror på en immunmedierad reaktion och även kan komma sekundärt till purpura haemorrhagica (Boyle, 2017; Sweeney *et al.*, 1987; Duffe *et al.*, 2015).

Epidemiologi

Bakterien smittar direkt eller indirekt via näsflöde eller sekret från spruckna lymfknutor från infekterade hästar (Reed *et al.*, 2010). Den indirekta smittspridningen innebär att bakterien överförs via till exempel vatten och foder, stallinredning eller redskap såsom grimmor och bremsar (Sellon & Long, 2014). Att den indirekta smittvägen kunde vara av betydelse skrevs det om redan 1910. Det ansågs att vattenhinkar som blivit kontaminerade med *S. equi* kunde föra smittan vidare (Todd, 1910).

En häst som blivit infekterad med kvarka börjar själv utsöndra bakterier först några dagar efter infektionstillfället, därmed efter den initiala feberfasen inletts. Dock har de studier som gjorts kring bakterieutsöndring endast använt odling som diagnostik (Timoney, 1988; Sellon & Long, 2014; Newton *et al.*, 1997; Sweeney *et al.*, 2005, se Chanter *et al.*, 1998). På grund av att bakterien transporteras från nasofarynx till huvudets lymfknutor kan den vara svår att detektera med till exempel ett nässköjlprov. Detta kan innebära att diagnosen försenas och infekterade hästar kan smitta andra innan de diagnostiseras och isoleras. Om den initiala febertoppen upptäcks tidigt finns dock en chans att identifiera och isolera sjuka hästar innan de själva börjar utsöndra bakterien (Timoney, 2004; Waller, 2013). Uppgifterna om hur länge en infekterad häst kan vara smittförande går isär, men studier har visat att en infekterad häst kan fortsätta att utsöndra bakterien i veckor efter att de kliniska symtomen avtagit. Tiden varierar med olika studier, från tre till åtta veckor (Timoney, 1988; Sellon & Long, 2014; Sweeney *et al.*, 1989). Enligt Prescott & Timoney (2007) upphör majoriteten av smittade hästar att utsöndra bakterien två till tre veckor efter tillfrisknad och *S. equi* inte är detekterbar hos större delen av hästarna fyra till sex veckor efter att de anses friska. Men de fåtal hästar som fortsätter att smitta kan därmed vara en potentiell smittkälla upp till sex veckor efter tillfrisknad (Sweeney *et al.*, 2005; Sweeney *et al.*, 1989). Det finns ingen generell definition om när en häst övergår till att vara en kronisk smittbärare. Vissa artikelförfattare definierar exempelvis de hästar som smittar längre än 40 dagar efter det att de blivit kliniskt friska som kroniska smittbärare (Duffe *et al.*, 2015).

Morbiditeten har rapporterats vara så hög som 100 % hos mottagliga grupper av hästar, medan den högsta rapporterade mortaliteten är 10 %. I utbrottet som Ford & Lokai (1980) beskriver levde 350 unghästar i stora grupper under ett högt smittryck. Flera av hästarna rapporterades vara sjuka redan vid ankomst. Tillsammans med bristande smittskydd och utfodringsrutiner kan det ha bidragit till de höga siffrorna (Ford & Lokai, 1980). Oftast är andelen insjuknade hästar lägre då det också beror på hur tidigt en sjuk häst identifieras och isoleras från övriga mottagliga hästar (Newton *et al.*, 2000). I några av de större utbrott som rapporterats varierade andelen insjuknade hästar (attack-rate) mellan 17 och 84 % (Newton *et al.*, 2000; Dalglish *et al.*, 1993; Piché, 1984; Sweeney *et al.*, 1987; Sweeney *et al.*, 1989; Tscheschlok *et al.*, 2017). De hästar som dör eller avlivas på grund av kvarka har ofta fått en komplikation till sjukdomen, såsom kastad kvarka, pneumoni eller purpura haemorrhagica (Ford & Lokai, 1980; Piché, 1984; Newton *et al.*, 1997). Yngre hästar, under 2 års ålder, beskrivs oftast som mest känsliga för att bli smittade (Neamat-Allah & El Dematy, 2016; Sweeney *et al.*, 1987; Ijaz *et al.*, 2015). Detta är beskrivet vid ett utbrott av kvarka på en gård i Alberta, Kanada 1980, där 100 % av gårdens 131 unghästar drabbades, samtidigt som endast 28 % av fölstona smittades (Piché, 1984). Dock diskuteras det inte om någon av åldersgrupperna har en högre andel vaccinerade hästar i dessa studier. I ett annat, nyligen beskrivet utbrott hos en grupp med 112 unghästar var morbiditeten betydligt lägre, 53 % och dessutom hade cirka hälften av de 53 qPCR-positiva hästarna inga symtom på akut kvarka (Tscheschlok *et al.*, 2017).

Kroniska smittbärare

Hästar infekterade med *S. equi* kan även bli kroniska bärare av bakterien i månader eller år efter infektion. Kroniskt bärarskap är en av de vanligaste komplikationerna till kvarka och beror på att en abscess från en lymfknuta spruckit in i luftsäcken eller på att bakterien tagit sig från farynx direkt till luftsäcken eller en bihåla. Empyem eller intorkat purulent material (kondroider) kan finnas kvar i luftsäckarna hos en kronisk bärare i flera månader eller år och hästen kan därmed fortsätta att sprida kvarka intermittent trots att den inte visar kliniska symtom (Timoney, 2004; Ijaz *et al.*, 2015; Newton *et al.*, 2000; Newton *et al.*, 1997). För att kunna upptäcka en kronisk smittbärare bör både nässköljprov och endoskopering samt sköljning av luftsäckarna med efterföljande PCR eller odling på proverna göras (Mallicote, 2015; Reed *et al.*, 2010; Wilson 1988: se Taylor & Wilson, 2006; Waller, 2013; Ijaz *et al.*, 2015). De kroniska bärarna är troligen en stor bidragande orsak till att bakterien orsakar så pass många utbrott av kvarka varje år (Timoney, 2004). Antalet hästar som efter ett utbrott av kvarka bär och utsöndrar bakterien efter att de blivit kliniskt friska varierar enligt Newton *et al.* (2000) från 10 till över 40 %. I en studie av ett utbrott av kvarka på en gård med cirka 1500 hästar fortsatte identifierade kroniska smittbärare att utsöndra *S. equi* intermittent i upp till 39 månader trots att de sedan länge slutat visa kliniska symtom på sjukdom (Newton *et al.*, 1997). I Ijaz *et al.* (2015) studie på 20 hästar diagnosticerade med kvarka togs prover varannan vecka från nässektret eller var, samtidigt som hästarna stod under behandling med penicillin. Proverna visade sig vara positiva vid PCR-analys i upp till åtta veckor och författarna diskuterar vikten av att isolera hästar i minst 9 veckor efter det att de tillfrisknat från kvarka.

Diagnostik

Vid misstanke om kvarka är två av de vanligaste provtagningsmetoderna nässvabb eller nässköljprov. Det sistnämnda har en fördel, då en större del av nashålan inkluderas i

provtagningen jämfört med en nässvabb. Andra provtagningsmetoder som kan användas är sköljning av luftsäckar och provtagning från abscesser (Lindhahl *et al.*, 2013; Sweeney *et al.*, 2005). Som nämnts tidigare är bakterien svår att detektera från mukosan i näshålan bara ett par timmar efter infektion (Sweeney *et al.*, 2005; Timoney, 2004).

Odling

Odling var tidigare förstahandsvalet vad gäller diagnostik av *S. equi* men metoden är bland annat tidskrävande och överväxt av andra bakterier, till exempel den närbesläktade *S. zooepidemicus*, kan försvåra diagnosen (Lindhahl *et al.*, 2013). Idag är förstahandsvalet istället PCR. Vid odling på blodagar växer bakterien ut som mukoida, honungsfärgade kolonier med en vid zon av betahemolys runt om (Sellon & Long, 2014). I en studie hade odling av *S. equi* sensitiviteten 60,3 % och specificiteten 100 % (Webb *et al.*, 2012).

MALDI-TOF

MALDI-TOF (Matrix assisted laser desorption ionization – time of flight mass spectrometer) är en metod som jämför proteinprofiler mot ett referensspektra. Metoden kan användas istället för biokemiska analyser för konfirmering eller när bakteriekolonier har ett atypiskt utseende vid odling och man vill försäkra sig om att det är en viss typ av bakterie (Kudirkiene *et al.*, 2015).

PCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) är en diagnostisk metod som detekterar en DNA-sekvens, till exempel *SeM*-genen som är en viktig virulensfaktor hos *S. equi*. PCR är ungefär tre gånger känsligare än odling för att påvisa *S. equi*, och är ett bättre verktyg för att diagnostisera kvarka hos hästar som urskiljer bakterien intermittent eller i mindre mängd (Webb *et al.*, 2012; Taylor & Wilson, 2006; Newton *et al.*, 2000). PCR skiljer inte mellan levande och döda bakterier men ett positivt PCR-resultat från ett nässköljprov indikerar att hästen har en aktiv infektion med kvarka, då avdödade bakterier inte persisterar på mukosan en längre tid (Waller, 2014; Laus *et al.*, 2007). En häst med ett qPCR-positivt sköljprov från luftsäckarna bör dessutom betraktas som en kronisk smittbärare (Personligt meddelande, Riihimäki, 2017¹). Quantitative PCR (qPCR) kallas också realtime PCR eller Realtids PCR. Det innebär att resultaten av PCR-analysen ses under tiden som den görs, till skillnad från traditionell PCR där den DNA-sekvens man är intresserad av att hitta först uppförökas och sedan avläses. Från qPCR kan man alltså även avgöra vilken mängd av den aktuella DNA-sekvensen som fanns i provet (ThermoFisher, 2017). Båverud *et al.* (2007) utvecklade en qPCR som detekterar och skiljer på *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Den detekterar genen *sodA*, vilken kodar för ett enzym som är en virulensfaktor hos flera streptokocker. Metoden använder även genen *seeI* för att skilja på *S. equi* och *S. zooepidemicus*. I studien hade qPCR 13 % större chans att detektera *S. equi* än vad odling hade. PCR används idag som ”gold standard” för att diagnostisera *S. equi*. Enligt Lindahl *et al.* (2013) var 95 % av proverna från hästar med akut kvarka positiva på PCR medan endast 63 % var positiva på odling.

¹ Miia Riihimäki, institutionen för kliniska vetenskaper, SLU, 2017-10-18

Serologi

Serologi kan användas för diagnostik och övervakning av kvarka (Waller, 2014; Robinson *et al.*, 2013). En indirect enzym-linked immunosorbent assay (iELISA) som används idag är baserad på ytproteinet SeM. Dock är specificiteten för SeM iELISA låg då *S. zooepidemicus* har ett nära identiskt protein och kan ge falskt positiva svar. Robinson *et al.* (2013) kom fram till att en kombination av iELISA för *S. equi* unika antigen A och antigen C (del av SeM-proteinet) gav bra resultat. Sensitiviteten var 93,3 % och specificiteten 99,3% för kombinationen av dessa test.

Behandling

Vid de flesta fall av kvarka krävs ingen behandling utöver vila och understödjande åtgärder såsom en torr och varm miljö samt tillgång till bra foder och vatten (Sweeney *et al.*, 2005). NSAIDs (non steriod antiinflammatory drugs) kan användas som en del i behandlingen för att minska svullnad och smärta (Smith, 2015). Manuell tömning av abscesser kan eventuellt påskynda tillfrisknandet då avläkningen oftast börjar efter att de har spruckit (Waller, 2014; Taylor & Wilson, 2006; Sweeney, 1996). Effekten och nödvändigheten av antibiotikabehandling är omtalad men få studier har gjorts. En författare föreslår profylaktisk antibiotikabehandling till de hästar som varit i kontakt med en konstaterat sjuk häst för att förebygga att de ännu friska hästarna utvecklar sjukdomen (Waller, 2014). Behandling i ett tidigt skede av sjukdomen, innan abscesser har bildats, anses kunna vara effektiv och förhindra ytterligare utveckling av sjukdomen och eventuellt begränsa ett utbrott av kvarka (Smith, 2015; Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap, 2013). Men flera artikelförfattare diskuterar också möjligheten att en tidig antibiotikabehandling kan hämma hästens immunförsvar och därmed även antikroppsbildningen. Det finns även en risk för återsmitta i stallet hos de hästar som blivit antibiotikabehandlade (Sweeney *et al.*, 2005; Sweeney 1996; Waller, 2014). Antibiotika kan även vara aktuellt hos hästar med allvarligare symtom som inte anses kunna bli friska med endast understödjande behandling (Smith, 2015). Vid dyspné på grund av svullnad i svalg och lymfknutor kan tracheotomi behövas för att underlätta andningen. Vid den immunmedierade komplikationen purpura haemorrhagica kan kortisonbehandling bli nödvändig (Taylor & Wilson, 2006; Sellon & Long, 2014).

För att kunna bota kroniska smittbärare med empyem eller kondroider i luftsäckarna kan ytterligare behandling behövas. Sådan behandling innefattar systemisk och/eller lokal antibiotikabehandling, tömning och spolning av luftsäckarnas innehåll med hjälp av endoskopering och avlägsnande av eventuella kondroider med korgliknande verktyg. Slemlösande preparat som acetylcystein kan också användas i luftsäckarna för att lösa upp kondroider eller var (Duffe *et al.*, 2015; Verheyen *et al.*, 2000).

Enligt svensk antibiotikapolicy kan antibiotikabehandling vara indicerat om allvarliga komplikationer uppstått, såsom kastad kvarka, för att behandla kroniska smittbärare som inte självläkt, och eventuellt för behandling av hästar i ett tidigt skede av sjukdomen. Då *S. equi* är känslig för penicillin är det förstahandsvalet i Sverige (Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap, 2013). Andra antibiotika, såsom cefalosporiner eller makrolider, rekommenderas förutom penicillin i utländsk litteratur (Smith, 2015).

Hygienåtgärder och kontroll

Isolering av sjuka hästar och hygienåtgärder är en mycket viktig del i arbetet för att bli av med kvarka i ett drabbat stall. Ett av de första kliniska tecknen på kvarka är feber, som uppträder innan den smittade hästen själv börjar utsöndra *S. equi*. Genom att mäta rektaltemperaturen dagligen, finns det en chans att upptäcka sjuka hästar och därmed isolera dem innan de själva börjar utsöndra bakterien (Timoney, 1988; Taylor & Wilson, 2006; Sellon & Long, 2014; Sweeney *et al.*, 2005). Vidare är viktiga åtgärder att använda speciella kläder och skor vid hantering av sjuka hästar samt ha god handhygien. Med fördel kan sjuka hästar hanteras sist för att undvika smitta till friska hästar. Utrustning som har använts till smittade hästar ska rengöras och desinficeras noggrant efter det att isoleringstiden är slut. Alternativet är att slänga sådant som kan vara svårt att rengöra ordentligt, till exempel grimmor och schabrack (Sweeney *et al.*, 2005). Enligt SVA:s generella råd kring rengöring av stall efter en infektion ska stallet rengöras efter att alla sjuka hästar tillfrisknat och inga nya insjuknar (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2015a).

En vanlig orsak till att ett stall drabbas av kvarka är att en ny häst kommer till stallet. Därför är det viktigt att nya hästar hålls isolerade och undersöks varje dag efter tecken på sjukdom i minst två veckor. Serologiska prover, nässköljprover eller endoskopering med provtagning av luftsäckarna kan användas för att utesluta att nyintroducerade hästar bär på bakterien (Timoney, 2004; Smith, 2015; Gröndahl *et al.*, 2016).

Överlevnad av *Streptococcus equi subspecies equi* i miljön

Vid utbrott av kvarka ställs ofta frågan om hur länge *S. equi* kan överleva i miljön och därmed hur länge exempelvis ett stall behöver vara isolerat innan det kan användas för andra hästar igen. En ytterligare fråga är hur stall, utrustning och betesmarker ska rengöras och hanteras. Få studier har undersökt detta och därmed är kunskapen liten om hur stor roll den indirekta smittvägen av kvarka spelar. Det har sedan en längre tid anats att sjukdomen kan spridas vidare genom till exempel gemensamma vattenhinkar. (Todd, 1910)

I en experimentell studie (Jorm, 1992) undersöktes överlevnaden av *S. equi* på glas och trä vid olika temperaturer. Överlevnadstiden varierade mellan 48 och 63 dagar, där den kortaste var på trämaterial vid 20 °C (luftfuktighet 49 %) och den längsta på samma material i 2 °C (luftfuktighet 32 %). Författaren tar upp faktumet att studien gjordes under mycket kontrollerade former och att överlevnaden av *S. equi* kan se annorlunda ut i en stallmiljö, där den utsätts för omgivningsfaktorer som fukt, solljus och konkurrerande bakterier. Men författaren menar trots detta att *S. equi* har stor potential att överleva en betydande tid i miljön och därmed spela en stor roll i sjukdomsspridningen av kvarka. (Jorm, 1992)

I Skorobohach (1994) kontaminerades flera sorters material med *S. equi* efter att de var rengjorda och desinficerade och därefter undersöktes överlevnaden av bakterien med odling som diagnostisk metod. Överlevnadstiden var längst på plast och i vatten med positiva odlingsprover i upp till 63 dagar. Även bomullsrep var positiva en betydande tid, 37 dagar, medan läder var positivt i 2 dagar och trä endast 1 dag. Denna studie gjordes inomhus och under experimentella förhållanden. Likt Jorm (1992) menar Skorobohach att överlevnaden av *S. equi* i miljön spelar en betydande roll i epidemiologin, men tar liksom Jorm (1992) upp faktumet att

omgivningsfaktorer troligen har en stor påverkan på överlevnaden av bakterien (Skorobohach, 1994). Senare artikelförfattare (Sweeney *et al.*, 2005) menar att dessa två studier inte direkt kan tillämpas på verkligheten då miljöfaktorerna i ett stall är för betydande för överlevnaden av *S. equi*.

I en studie av Weese *et al.* (2009) kontaminerades trä-, plast-, och metallmaterial med *S. equi* som inokulerats antingen i fosfatbuffrad natriumklorid eller sekret från näshålan från friska hästar. Studien gjordes utomhus under sensommaren i Kanada för att jämföra med de tidigare studier som gjorts under mer experimentella former och för att undersöka hur länge bakterien överlever i de förhållanden som den utsätts för i en miljö där hästar normalt vistas. Resultatet blev att *S. equi* överlevde få dagar i ett utomhusklimat. Endast 1 av 16 prover tagna från trämaterial var positivt på odling efter 3 dagar och 2 av 16 prover från metall var positiva. Om vädret var soligt hade *S. equi* en kortare överlevnadstid jämfört med om det var molnigt. Efter 3 dagar var 0 av 24 prover positiva vid soligt väder och 4 av 24 positiva vid molnigt väder. Regn eller dagstemperatur hade däremot ingen effekt på överlevnaden. Om man jämförde överlevnadstiden för de bakterier som inokulerats i sekret från näshålan med de som inokulerats i natriumklorid var det ingen signifikant skillnad. Om gränsen för signifikant överlevnadstid däremot drogs vid endast en dag hade bakterierna i mukus en större chans att överleva. Resultaten i denna studie skiljer sig mycket från de två tidigare experimentella försöken (Jorm, 1991; Skorobohach, 1994) som beskrivits och författarna drar slutsatsen att *S. equi* har en kort överlevnadstid under mer fältmässiga förhållanden utomhus, särskilt i ett soligt klimat. Samtidigt diskuteras det att överlevnadstiden kan se annorlunda ut om bakterien till exempel finns inomhus, i vatten eller foder samt vid lägre temperaturer. Att överlevnaden var något längre i sekret från näshålan tror författarna rimligtvis beror på att mukus skapar gynnsamma förhållanden för *S. equi*. Weese *et al.* (2009) menar att en förlängd karantänstid på grund av bakteriens eventuella överlevnad i miljön inte är nödvändig, i alla fall inte i ett sommarklimat.

I en nyligen redovisad studie (Durham *et al.*, 2017) undersöktes överlevnadspotentialen av *S. equi* på flera olika material som finns i en stallmiljö, bland annat trästolpar, vattenhinkar, overaller och nässvalgssonder. Som diagnostisk metod användes odling. Försöket gjordes både sommar- och vintertid och överlevnadstiden var som längst 34 dagar i en fuktig vattenhink vintertid. Trästolparna som stod utomhus var då endast positiva i 1 dag. På sommaren överlevde *S. equi* maximalt 9 dagar, då i en nässvalgssond. Trästolparna var då positiva i maximalt 4 dagar och vattenhinkarna i 5 dagar. Temperaturen sommartid varierade mellan 9 och 34 °C och vintertid mellan -3 och 14,5 °C. Författarna drog slutsatsen att bakterien är känslig och inte överlever en särskilt lång tid utanför sitt värddjur, men att den klarar sig längre i kallt, fuktigt klimat och då har en större potential att smitta mottagliga hästar. De påpekar också betydelsen av att särskilt rengöra och desinficera material där *S. equi* verkar trivas bäst.

Flera författare diskuterar potentialen för *S. equi* av överleva i miljön baserat på de ovan beskrivna studierna. Reed *et al.* (2010) skriver att det är osannolikt att *S. equi* överlever mer än ett par veckor i miljön på grund av dess känslighet för solljus, värme, uttorkning och dessutom är flera desinfektionsmedel effektiva mot bakterien. Sweeney (1996) hävdar att *S. equi* endast överlever en kort tid i miljön om den inte är skyddad av fukt från till exempel näsflöde, men att den samtidigt har en stor potential att kontaminera miljön och att transporter och stall där en

smittförande häst stått därmed kan föra vidare infektionen. Även Prescott & Timoney (2007) menar att potentialen för *S. equi* att överleva en betydande tid i miljön är liten och har det som en del i sitt argument att kvarka är en sjukdom som skulle kunna utrotas. Ytterligare artikelförfattare hävdar att den inte överlever i miljön i närvaro av jordbakterier (Sweeney *et al.*, 2005).

Tvätt- och desinfektionsmedel effektiva mot *S. equi*

I Jorm (1992) studie undersöktes även olika desinfektionsmedels effektivitet mot *S. equi*. Flertalet av desinfektionsmedlen var verksamma mot bakterien, bland annat de som innehöll klorhexidin, jod eller aldehyder. Natriumhypoklorit som finns i bland annat klorin var emellertid inte effektivt. Även i Skorobohach (1994) studie testades olika metoder för rengöring av materialen som kontaminerats med *S. equi*, bland annat med virkon, klorin och formaldehyd. Virkon var effektivt även i närvaro av organiskt material, medan klorin och formaldehyd endast var effektiva i frånvaro av organiskt material. Rydén *et al.* (2017) gjorde ett experimentellt försök där bitar av flera olika material (betonggolv, trästolpar, vattenhinkar i plast, lädergrimmor och läderhandskar) kontaminerades med *S. equi*. Bitarna rengjordes efter tre dagar med diskmedel (Fri Ren Natur®) och desinficerades med DesiDos®. Vid provtagning (dag 5) var alla tvättade material negativa för *S. equi* på odling samtidigt som kontrollerna var positiva för alla material förutom lädergrimmorna samt läderhandskarna, där några av kontrollerna var negativa. I studien kontaminerades även nylongrimmor som tvättades i tvättmaskin och torktumlare i olika temperaturer. För att få odlingsnegativa resultat från nylongrimmorna krävdes maskintvätt i 60 °C. Författarna drar slutsatsen att även material som i stallar anses vara svåra att tvätta kan rengöras från *S. equi*. Däremot räckte det inte med maskintvätt i 40 °C för att avdöda bakterien på nylongrimmor, vilket artikelförfattarna föreslår kan bero dess grova yta samt på att fukt lättare stannar kvar i det materialet.

I Johanssons (2016) kandidatarbete undersöktes effektiviteten av tvätt och desinfektion mot *S. equi* på plast-, trä- och betongmaterial i syfte att ta reda på mer om motståndskraften på olika material i hästens närmiljö. Rengöringsmedlet Fri Ren Natur® samt desinfektionsmedlet DesiDos® användes. Det var effektivt för att få negativa resultat på odling från alla kontaminerade ytor. Analys med PCR gjordes inte. Efter fem dygn sågs fortfarande växt i kontrollproverna, där plastmaterialet hade rikligast växt. Studien gjordes under experimentella förhållanden i en skyddad miljö inomhus.

Generellt är grampositiva bakterier känsliga för kemiska desinfektionsmedel om de inte skyddas av organiskt material. Att tvätta och desinficera ett stall kan vara en utmaning då många ytor och material inte är släta och det kan vara svårt att komma tillräckligt djupt ned i materialet. Olika desinfektionsmedel fungerar olika bra på olika material. Inredning som vattenhinkar och krubbor bör vara avtagbara från boxväggen för att lätt kunna rengöras. Det är viktigt att komma ihåg att rengöra hästtransporter, särskilt om de används för hästar som säljs eller tävlas och därmed utgör en viktig potentiell källa för smitta av kvarka. *S. equi* som utsöndras från en smittförande häst skyddas nästan alltid av organiskt material som näsflöde eller var. För att bli av med det organiska materialet och därmed lättare avdöda bakterierna är mekanisk rengöring det mest effektiva då det optimerar chansen att den efterföljande desinfektionen ska vara verksam (Dwyer, 2004). Exempel på desinfektionsmedel som är effektiva mot *S. equi* redovisas i Tabell 1.

Tabell 1: Exempel på desinfektionsmedel som kan vara aktuella vid rengöring av stall

Desinfektionsmedel	Egenskaper
<i>Aldehyder</i>	Har toxiska och eventuellt cancerframkallande egenskaper, men är mycket effektiva mot mikroorganismer även i närvaro av organiskt material. De kan användas på flera underlag såsom plast och metall. Aldehyder finns i till exempel Parvocide plus som rekommenderas av SVA vid rengöring av stall.
<i>Alkoholer</i>	Har bra egenskaper som låg toxicitet men det har dålig verkan mot bakterier som skyddas av organiskt material.
<i>Fenoler</i>	Rekommenderas att använda i stall. Effektivt mot bland annat bakterier även i närvaro av organiskt material. Cidex opa® innehåller ortho-fenylfenol.
<i>Jod</i>	Kan användas mot ett brett spektrum av mikroorganismer, bland annat <i>S. equi</i> , men inaktiveras i närvaro av organiskt material. Används vanligen vid sårrengöring och som handdesinfektion men ej vid rengöring av stora ytor då det inte är kostnadseffektivt.
<i>Klorhexidin</i>	Effektivt mot bland annat grampositiva bakterier i frånvaro av organiskt material. Används främst som handdesinfektion. Var i en experimentell studie effektivt för att avdöda <i>S. equi</i> .
<i>Klorin</i>	Effektivt mot ett brett spektrum av mikroorganismer och förstör fritt DNA. Inaktiveras snabbt av organiskt material och kan därför endast rekommenderas till material som kan tvättas helt fritt från detta. Giftigt för vattenlevande djur.
<i>Persulfat</i>	Effektivt mot ett brett spektrum av mikroorganismer, däribland <i>S. equi</i> . Persulfat finns i Virkon®.

Källor: Johnson & Johnson, 2006; Sweeney, 1996; Dwyer 2004; Naturskyddsföreningen, 2013; Jorm, 1992; Hoppes *et al.*, 2009; Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2015a.

Forskningsområden inom kvarka

Som tidigare nämnts finns det trots den långa tid det funnits kännedom om sjukdomen kvarka bristfälligt med forskning inom flera områden. Överlevnaden av *S. equi* i miljön är ett av dem, ökad kunskap om hur man diagnosticerar och behandlar kroniska smittbärare är ett annat. Ytterligare ett viktigt fält är immunologi och vaccin. I dagsläget finns det inga vaccin som används i Sverige för att förebygga kvarka då det visat sig att det är svårt att tillverka ett vaccin som ger tillräckligt skydd och som inte orsakar biverkningar (Waller, 2014; SVA, 2015b).

Detta examensarbete syftade till att utforska ett av dessa områden djupare och öka kunskapen kring hur länge *S. equi* kan överleva i stallmiljön.

MATERIAL OCH METODER

Bakterieinokulum

Kvarkabuljong användes till de experimentella försöken med bremsar, stolpar och vattenhinkar. Buljongen gjordes med BHI – Brain Heart Infusion från Thermofisher diagnostics (Waltham, US), vilken blandades med renkultur av *S. equi*, stam CCUG23255. Buljongen inkuberades i 37 °C i 20 ± 2 timmar innan användning.

Provtagningsmetoder och diagnostik

Proverna från materialen togs med SodiBox från Food diagnostics eller med E-svabb (ESwab™) från Copan. SodiBox är en steril trasa för mikrobiologisk provtagning som användes till alla trästolpar och till alla torra material i stallarna, till exempel boxväggar och grimmor. SodiBox-trasorna användes utan transportmedium. E-svabbar användes till alla bremsar och vattenhinkar och på fuktiga eller blöta platser i stallarna, till exempel vattenkoppar. Från alla prover gjordes i första hand odling på COBA-plattor (Colistin Oxolinic Blood agar) som lästes av efter 24 samt 48 timmar. COBA-plattorna innehåller kolistin och är selektiva för bland annat *S. equi*. qPCR utfördes på en del av de bremsar, hinkar eller stallprover som var negativa på odling. För att konfirmera växt av *S. equi* på odlingsproverna användes MALDI-TOF. De positiva och negativa provresultaten, för qPCR och odling, delades upp i olika grupper. Analys av proverna utfördes vid BVF (Institutionen för biomedicin och veterinär folkhälsovetenskap, Sveriges lantbruksuniversitet, Uppsala, Avdelningen för bakteriologi och livsmedelssäkerhet). Till proverna tillsattes 100 ml vätska (Buffered Peptone Water®) och därefter roterades proverna i 2 minuter med hjälp av en Stomacher lab-mixer (easyMIX® Lab-Blender, AES-Chemux, Weber Scientific). Vätskan hälldes sedan över till två falconrör (50 ml) och 20µl av vätskan stöks ut på en COBA-platta. Rören centrifugerades därefter på 3320 varv i 15 min. Av pelleten som bildats ströks 10µl ut på en orörd COBA-platta. Plattorna inkuberades 48 timmar i 37° i 5 % CO₂-inkubator. Plattorna lästes av efter 24 och 48 timmar och en koloni från varje grupp analyserades med MALDI-TOF för mikrobiologisk identifikation.

Kontaminationsförsök bremsar

Trettio stycken bremsar i plast av olika storlek och märke användes i försöken (se Bild 2). Då försöken skulle likna fältmässiga förhållanden så mycket som möjligt användes bremsar som donerades av olika hästkliniker och veterinärstationer och därmed redan varit använda i fält. Vissa av bremsarna användes flera gånger. Försöken delades upp på tre olika tillfällen och gjordes i en isoleringsbox på hästkliniken på Universitetsdjursjukhuset, Uppsala, i det uthus som hinkarna stod i och i ett förråd på hästkliniken. Inför försöken tvättades alla bremsar med diskmedel och desinficerades 10 minuter i DesiDos®. De snören som användes var av bomull. Olika rengöringsprotokoll användes för varje grupp som bestod av 6 bremsar med eller utan bremssnören. En kontrollgrupp användes. Varje brems lades i en förslutbar plastpåse och kontaminerades därefter med 5 ml kvarkabuljong. Efter 30 minuter rengjordes bremsarna enligt de olika protokollen och lades därefter i en ny plastpåse. Kontrollerna lades direkt i en ny plastpåse. Cirka 50 ml vatten hälldes över bremsarna och därefter gjordes provtagning med E-svabbar som rullades mot provtagningsmaterialet och vattnet i påsen i minst 1 minut. Vilka rengörings- och desinfektionsmedel som användes redovisas i Tabell 2.

Tabell 2: Rengöring- och desinfektionsmedel som användes vid kontaminationsförsök av bremsar

Produkt	Aktiv ingrediens
Yes diskmedel	Tensider
Cidezyme	Subtilisin, tensider
Cidex® opa	Ortoftalaldehyd
Virkon® S	Kaliumperoximonosulfat
Klorin	Natriumkhypoklorit, persulfat
Desidos	Kaliummonopersulfat

Bremsarna delades in i åtta grupper med sex stycken i varje utefter hur de skulle rengöras och om de skulle ha snören eller inte enligt Tabell 3.

Tabell 3: Grupper i försöket med bremsarna

Grupp	Rengöring	Desinfektion	Brems och/eller snöre	Koncentration <i>S. equi</i> i buljong CFU/ml
A	Yes diskmedel, ljummet vatten	DesiDos®, 10 min	Brems	1,1 x 10 ⁹
B	Yes diskmedel, ljummet vatten	Virkon®, 10 min	Brems	1,1 x 10 ⁹
C1	Yes diskmedel, ljummet vatten	-	Snöre	1,1 x 10 ⁹
C2	Yes diskmedel, ljummet vatten	-	Brems	1,1 x 10 ⁹
D	Yes diskmedel, ljummet vatten	Sjudande vatten, 10 min	Brems	2,5 x 10 ⁸
E	Cidezyme	Cidex® opa, 10 min	Brems	2,5 x 10 ⁸
F	Yes diskmedel, ljummet vatten	Klorin, 10 min	Brems	Undersöktes ej
G	-	-	Brems	1,1 x 10 ⁹
H	-	-	Brems, snöre	1,1 x 10 ⁹



Bild 2: Olika typer av bremsar som användes i försöken.

Kontaminationsförsök stolpar

Försöket skedde i oktober och november samt i maj och juni. Impregnerade trästolpar (24 stycken) som tidigare stått utomhus och nyttjats som häststaket och därmed hade bruksslitage användes. Stolparna slogs ned med cirka en meters mellanrum utomhus i fyra grupper med sex stolpar i varje grupp. De kontaminerades med 10 ml kvarkalösning med koncentrationen $3,5 \times 10^8$ (vinter) och $2,5 \times 10^8$ CFU/ml (sommar) som hälldes på från toppen av stolpen. Stolparna provtogs i grupper om 6 dag 4, 10 (sommar och vinter), 17 (endast vinter) och 19 (endast sommar). För provtagning användes SodiBox som gnuggades i minst 1 minut på översta delen av stolpen. Medeltemperatur under vintern var $3,1 \text{ }^\circ\text{C}$ och under sommaren $14 \text{ }^\circ\text{C}$. Nederbörd under dygnet i medeltal $2,1 \text{ mm}$ under vintern och $1,7 \text{ mm}$ under sommaren. Luftfuktigheten var i medel 86% vintertid och 69% sommartid.

Kontaminationsförsök hinkar

Försöket ägde rum i november, december och januari samt i maj och juni. Sex stycken 20-liters plasthinkar användes. Hinkarna hade tidigare använts i stall och hade normalt bruksslitage i form av mindre repor. De var innan försöket endast ytligt rengjorda. Alla hinkar fylldes med cirka 15 l kallt vatten och kontaminerades därefter med 5 ml kvarkabuljong med koncentrationen $2,1 \times 10^8$ CFU/ml (vinter) och $2,5 \times 10^8$ CFU/ml (sommar). Hinkarna stod i en icke-isolerad utbyggnad, en miljö som liknade ett stall. På sommaren byttes vattnet i hinkarna ut varje dag efter kontaminationen med undantag av de två första dagarna. Ingen ytterligare rengöring gjordes. På vintern byttes vattnet inte ut. Provtagning av hinkarna gjordes med e-svabbar som gnuggades mot hinken och i vattnet i minst en minut innan det att vattnet byttes den aktuella dagen. Prover togs dag 4, 10, 17, 31, 45 och 73 på vintern och dag 4, 10, 19 och 24 på sommaren. Under försöken var medeltemperaturen utomhus under vintern $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Nederbörden var i medeltal under dygnet $2,3 \text{ mm}$ under vintern och luftfuktigheten var i medel 87% under vinterperioden. Förhållandena under sommaren var samma som vid försöket med stolparna.

Provtagning stallar

Fyra stycken stallar som haft konstaterade fall av kvarka på en eller flera hästar var med i studien. Enligt smittskyddsreglementet för Svensk Travsport (smittskyddsreglemente svensk travsport, 2017) ska ett stall som haft utbrott av kvarka vara isolerat i minst 20 dagar efter att alla drabbade hästar är kliniskt friska, därför togs prover efter cirka 20 dagar. Proverna togs på olika material där den eller de sjuka hästarna hade hållits, till exempel boxinredning, vatten- eller foderhinkar, grimmor och stolpar. På torra ytor användes SodiBox, som gnuggades mot materialet i minst en minut och sedan lades i en steril påse. På fuktiga ytor, såsom vattenhinkar eller vattenkoppar användes e-svabbar som rullades mot materialet i minst en minut och sedan lades i röret med amies medium. Vid alla provtagningstillfällen användes skyddskläder. Handskar byttes vid varje nytt prov som togs.

Anamnes stallar

Stall 1: En nyinköpt häst konstaterades positiv för kvarka ett par dagar efter att den anlät till stallet. Den stod då isolerad och fortsatte därefter stå isolerad med en sällskapshäst i ett eget stall och egen hage. De isolerade hästarna hanterades separat och personalen bytte kläder och skor efter hantering. Varken stallet, hagen eller utrustning hade tvättats eller bytts ut vid provtagningen då den sjuka hästen varit kliniskt frisk i 19 dagar. Sällskapshästen hade inte visat symtom på sjukdom. Paddocken som provtogs låg cirka fem meter ifrån den hage som de isolerade hästarna gick i och icke-isolerade hästar gick dagligen till och från paddocken. Proverna togs på våren.

Stall 2: En nyimporterad häst som varit i Sverige i två veckor innan den via en hästhandlare flyttade till sin nya ägare. I sitt nya stall visade den tecken på kvarka och fick en böld i området för retropharyngeallymfknotorna som senare sprack. Efter konstaterad kvarka isolerades hästen tillsammans med två sällskapshästar till hagar med ett vindskydd som låg ca 1 km från huvudanläggningen. En del utrustning såsom gramma, grimskafte och krubba hade tvättats och desinficerats med tvättmedel och virkon. Ingen av de två sällskapshästarna hade visat tecken på sjukdom under hela perioden. Vid provtagning hade den sjuka hästen varit kliniskt frisk i 19-21 dagar. Proverna togs på sommaren.

Stall 3: En ridskola som fick ett utbrott av kvarka efter att en ny häst köpts in. Den nya hästen isolerades i cirka två veckor men släpptes sedan ut till övriga hästar och strax därefter visade den kliniska tecken på kvarka och konstaterades sjuk. Därefter blev 14 av 22 hästar sjuka under en längre period. Stallet provtogs 27 dagar efter att den sista hästen slutade visa kliniska symtom. Då var stallets karantän över sedan cirka en vecka. En del inredning hade tvättats med högtryckstvätt och de hade även byggt nytt i en del av stallet. Grimmor hade tvättats i 60 grader maskintvätt samt legat i virkonbad. Proverna togs på sommaren.

Stall 4: Ett privatstall med tre stycken hästar, varav en var dräktig när kvarka konstaterades. Hästarna smittades av två andra hästar som de varit i kontakt med och som visat kliniska tecken på kvarka men vid provtagning fått svaret *S. zooepidemicus*. Nässköljprov från de tre hästarna var däremot positivt för *S. equi*. Vid provtagningstillfället hade hästarna varit kliniskt friska i sex veckor. Provtagningen kunde inte ske tidigare då det inte fanns någon möjlighet att analysera proverna. Stallet hade tvättats och desinficerats med virkon. Grimmorna hade tvättats

i 60 °C. Utestallet hade inte desinficerats och hästarna hade inte varit där på cirka två veckor. Transporten hade inte heller rengjorts och den hade inte använt på cirka åtta veckor. Provtagningen skedde på hösten.

RESULTAT

Alla desinfektionsmedel var effektiva för att ge negativa odlingsresultat för *S. equi* på bremsarna, men endast klorin gav negativa resultat på qPCR. Kontrollerna samt de bremsar som endast var rengjorda med diskmedel hade positiva odlingsresultat (Tabell 4 samt Diagram 1). På trästolparna var odlingsresultaten negativa redan efter 4 dagar på sommaren och 10 dagar på vintern (Tabell 5 och 6). I de fyllda vattenhinkarna var odlingen positiv i upp till 19 dagar på sommaren och 73 dagar på vintern (Tabell 7 och 8). Resultaten från stallarna ses i Tabell 9-12. Tre av de fyra provtagna stallar hade odlingsresultat som var positiva för *S. equi*, flera olika sorters material var positiva. Totalt var 6/51 (11 %) av proverna från stallar positiva på odling som inkluderade två nylongrimmor, två boxväggar av trä (Bild 4), en boxvägg av metall och ett grimskafat av bomull. På 6 av de prover som var negativa på odling gjordes också qPCR, där var 1/6 prov positivt (17 %). Det positiva provet var från en vattenkopp i metall (Bild 3).

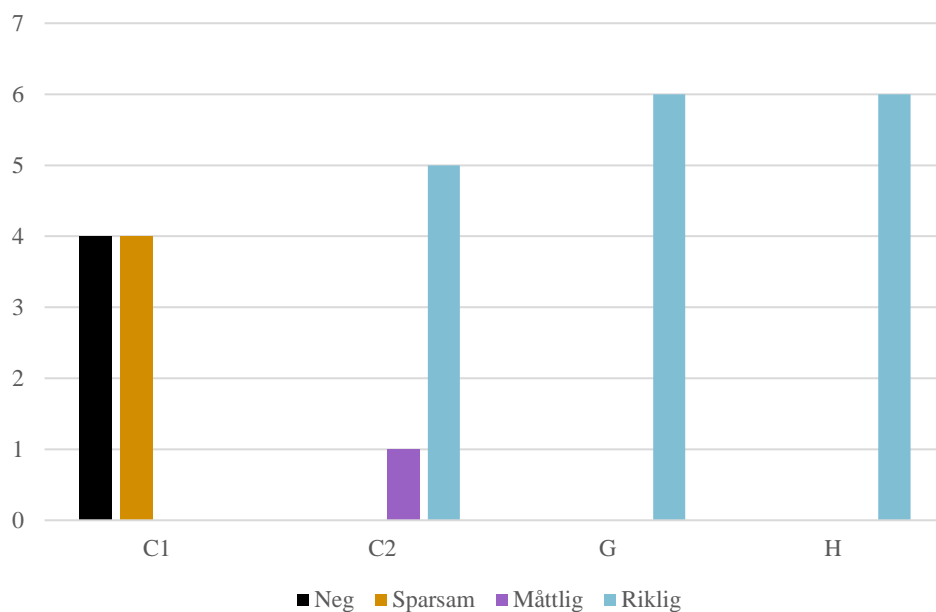
Kontaminationsförsök bremsar

Tabell 4: Resultat av tvätt och desinfektion av bremsar

Grupp	Odling pos	Odling neg	PCR pos	PCR neg
A	0/6	6/6	5/6	1/6
B	0/6	6/6	5/6	1/6
C1	4/6	2/6	2/2	0/2
C2	6/6	0/6		
D	0/6	6/6	6/6	0/6
E	0/6	6/6	6/6	0/6
F	0/6	6/6	0/6	6/6
G	6/6	0/6		
H	6/6	0/6		

A: Endast brems. Yes diskmedel, DesiDos®, B: Endast brems. Yes diskmedel, Virkon®, C1: Brems med snöre. Yes diskmedel. Resultat brems. C2: Resultat snöre, D: Endast brems. Yes diskmedel, desinfektion med sjudande vatten, E: Endast brems. Cidezyme®, Cidex Opa®, F: Endast brems. Yes diskmedel, klorin, G: Endast brems. Ingen tvätt eller desinfektion. H: Brems med snöre. Ingen tvätt eller desinfektion.

Diagram 1: Växt odlingspositiva bremsar: grupp C1, C2, G, H som beskrivs i tabell 4



Sparsam växt: 6-25 CFU

Måttlig växt: 26-75 CFU

Riklig växt: >75 CFU

Kontaminationsförsök stolpar

Tabell 5: Resultat av kontaminationsförsök stolpar sommar

Provtagningsdag	Odling pos	Odling neg
Dag 4	0/6	6/6
Dag 10	0/6	6/6
Dag 19	0/12	12/12

Tabell 6: Resultat av kontaminationsförsök stolpar vinter

Provtagningsdag	Odling pos	Odling neg
Dag 4	6/6	0/6
Dag 10	0/6	6/6
Dag 17	0/12	12/12

Kontaminationsförsök vattenhinkar

Tabell 7: Resultat av kontaminationsförsök hinkar sommar

<i>Provtagningsdag</i>	<i>Odling pos</i>	<i>Odling neg</i>	<i>PCR pos</i>	<i>PCR neg</i>
<i>Dag 4</i>	6/6	0/6		
<i>Dag 10</i>	5/6	1/6		
<i>Dag 19</i>	1/6	5/6	5/5	0/5
<i>Dag 24</i>	0/6	6/6	6/6	0/6
<i>Medel ± SD</i>	10,5 ± 4,8 överlevnadsdagar			

Tabell 8: Resultat av kontaminationsförsök hinkar vinter

<i>Provtagningsdag</i>	<i>Odling pos</i>	<i>Odling neg</i>	<i>PCR pos</i>	<i>PCR neg</i>
<i>Dag 4</i>	6/6			
<i>Dag 10</i>	6/6			
<i>Dag 17</i>	6/6			
<i>Dag 31</i>	6/6			
<i>Dag 45</i>	4/6	2/6	0/2	2/2
<i>Dag 73</i>	1/6	5/6	0/5	5/5
<i>Medel ± SD</i>	45,0 ± 15,3 överlevnadsdagar			

Miljöprovtagning stallar

Tabell 9: Resultat provtagning stall 1

<i>Provtagningsplats</i>	<i>Odling S. equi (pos/neg)</i>	<i>Antal kolonier S. equi</i>
<i>Vattenhink kvarkahäst, plast</i>	Neg	
<i>Vattenhink grannhäst, plast</i>	Neg	
<i>Vattenkar hage, plast</i>	Neg	
<i>Grimma, nylon</i>	Pos	Sparsam växt
<i>Box, trä</i>	Pos	Måttlig växt
<i>Box, metall</i>	Pos	Riklig växt
<i>Krubba, plast</i>	Neg	
<i>Fönster, plast</i>	Neg	
<i>Grimskافت, bomull</i>	Pos	Sparsam växt
<i>Dörrhandtag stall, metall</i>	Neg	
<i>Box grannhäst, metall och trä</i>	Neg	
<i>Plastpåse hage</i>	Neg	
<i>Stolpe hage, trä</i>	Neg	
<i>Grimskافت hage, bomull</i>	Neg (Pos <i>S. zooepidemicus</i>)	Sparsam växt <i>S. zooepidemicus</i>
<i>Grind hage, trä</i>	Neg	
<i>Paddock, trä</i>	Neg	
<i>Totalt positiva material</i>	4/16 (25 %)	

Tabell 10: Resultat provtagning stall 2

Provtagningsplats	Odling <i>S. equi</i> (pos/neg)	Antal kolonier
Ligghall trä 1	Neg	
Ligghall trä 2	Neg	
Foderhink, plast	Neg (Pos <i>S. zooepidemicus</i>)	Sparsam växt <i>S. zooepidemicus</i>
Trästolpe 1	Neg	
Trästolpe 2	Neg	
Trästolpe 3	Neg	
Grind hage, plast	Neg	
Grimma, nylon	Neg (Pos <i>S. zooepidemicus</i>)	Sparsam växt <i>S. zooepidemicus</i>
Vattenkopp ligghall, metall	Neg (Pos <i>S. equi</i> på qPCR)	
Vattenhink hage, plast	Neg (Neg även qPCR)	
<i>Total positiva material</i>	1/10 (10 %)	



Bild 3: Vattenkopp stall 2, positiv för *S. equi* på qPCR.

Tabell 11: Resultat provtagning stall 3

<i>Provtagningsplats</i>	<i>Odling S. equi pos/neg</i>	<i>Antal kolonier</i>
<i>Utebox 2 trä</i>	Neg	
<i>Utebox 2 metall</i>	Neg	
<i>Utebox 2 vattenkopp, metall</i>	Neg	
<i>Lösdrift, trä</i>	Neg	
<i>Lösdrift, metall</i>	Neg	
<i>Grimma, nylon tvättad</i>	Pos	Sparsam växt
<i>Grimma, nylon tvättad</i>	Neg	
<i>Täcke, ej tvättat</i>	Neg	
<i>Vattenkopp utebox 1, metall</i>	Neg	
<i>Utebox 1, trä</i>	Neg	
<i>Box 1 stall, trä och metall</i>	Neg	
<i>Box 2 stall, metall och trä</i>	Neg	
<i>Krubba med vatten, plast</i>	Neg (Neg även på qPCR)	
<i>Krubba med vatten, plast</i>	Neg (Neg även på qPCR)	
<i>Totalt positiva material</i>	1/14 (7 %)	

Tabell 12: Resultat provtagning stall 4

Provtagningsplats	Odling <i>S. equi</i> pos/neg	Antal kolonier
<i>Utebox, plywood</i>	Neg	
<i>Utebox, trä</i>	Pos	1 koloni
<i>Box 1, trä + krubba, tvättad</i>	Neg	
<i>Box 2, trä + krubba, tvättad</i>	Neg	
<i>Box 3, trä + krubba, tvättad</i>	Neg	
<i>Vattenhink 1, plast</i>	Neg (neg även på q-PCR)	
<i>Vattenhink 2, plast</i>	Neg (neg även på q-PCR)	
<i>Grimma, nylon, tvättad</i>	Neg	
<i>Grimma, nylon, tvättad</i>	Neg	
<i>Transport</i>	Neg	
<i>Transport</i>	Neg	
<i>Totalt positiva material</i>	1/11 (9 %)	

Sparsam växt: 6-25 CFU
 Måttlig växt: 26-75 CFU
 Riklig växt: >75 CFU



Bild 4: *Utebox stall 4, positivt för S. equi på odling.*
 Foto: Johanna Bergeå

DISKUSSION

För ett stall som drabbas av kvarka innebär det alltid en jobbig tid, med sjuka hästar och ibland lång tid av isolering. För större stall och företag som är beroende av sin hästverksamhet kan sjukdomen orsaka stor ekonomisk skada i och med att stallet måste vara stängt på grund av karantän. Många gånger innebär ett utbrott av kvarka dessutom kostsam behandling av sjuka hästar och sanering av miljön. Vid utbrott av kvarka vill hästägare ofta ha svar på hur lång karantänstiden behöver vara, när det kommer vara säkert att låta de hästar som varit sjuka att lämna stallet och när hästar som varit sjuka kan ha kontakt med friska hästar igen. Syftet med detta examensarbete var att få mer kunskap kring om *S. equi* kan överleva en betydande tid i ett stall och hur viktig motståndskraften i miljön är för den fortsatta spridningen av kvarka. Ett ytterligare syfte var att ta reda på hur tvätt och desinfektion av bremsar av plast, som använts som hjälpmedel till kvarkamistänkta hästar, bäst utförs.

Bremsar av plast är ett hjälpmedel som används dagligen av veterinärer som jobbar med hästar, och ett tillfälle när veterinären ofta tar hjälp av en brems är vid nässköljprovtagning eller endoskopering av en häst som misstänks ha kvarka. Ibland kan prov behöva tas på flera hästar i ett stall. Om samma brems nyttjas till flera hästar, finns det då en risk att de eventuella bakterierna från den första hästen ger ett falskt positivt resultat på den andra hästen trots rengöring? På grund av att bremsen är ett redskap som ofta används på hästar med kvarka valdes de till kontaminationsförsöket i det här arbetet. Resultaten vid tvätt av bremsarna ses i tabell 4 och diagram 1. De visar att *S. equi* inte kan detekteras på odling efter desinfektion med några av de desinfektionsmedel som användes. Användning av endast diskmedel räckte dock inte för att få ett negativt odlingsresultat, där blev 67 % av bremsarna och 100 % av snörena positiva på odling. Däremot gav endast ett av de desinfektionsmedel som användes helt negativa resultat på qPCR (klorin) medan övriga desinfektionsmedel gav mellan 83 och 100 % positiva qPCR-resultat. qPCR är en känsligare diagnostik än odling vad gäller *S. equi* och den detekterar även avdödade bakterier och DNA-fragment, vilket kan vara orsaken till att resultaten av qPCR blev positiva på nästan alla bremsar där odlingen varit negativ. Om proverna hade tagits dagen efter rengöring hade resultaten möjligen varit negativa i större utsträckning, för att DNA:t hade hunnit försvinna. Det skulle i så fall vara en aspekt att ta hänsyn till i framtida försök. Dock är risken liten att de positiva qPCR-resultaten betyder att det finns levande bakterier kvar på bremsarna efter noggrann desinfektion, och särskilt inte i en mängd som hade varit stor nog att infektera en häst med kvarka. Det finns en risk för kontamination mellan försöken trots noggrann hygien, men då 92 % av alla de bremsar som varit negativa på odling blev positiva på qPCR är det troligt att det är ett sant resultat. De positiva qPCR-resultaten visar vikten av att ha en ren brems vid provtagning av en häst där man har misstanke om kvarka. Detta tar även Lindahl *et al.* (2013) upp i sin artikel, där de påpekar att PCR är extremt känsligt för att detektera *S. equi* och för att undvika kontamination från bremsar eller andra instrument ska de vara väl rengjorda mellan varje häst. Kanske ska användning av brems helt undvikas vid till exempel ett nässköljprov, detta för att undvika att få falskt positiva resultat vid misstanke om kvarka. Om brems ändå är nödvändigt bör veterinären ha i åtanke att ett positivt PCR-resultat från en kvarkaprovtagning kan innebära att DNA från *S. equi* funnits på bremsen trots att den är noggrant rengjord och desinficerad. Bremsnöre bör bytas mellan varje häst. Detta är extra viktigt när bremsen ska användas vid provtagning i ett nytt stall. Klorin var som tidigare nämnt effektivt även för att få ett negativt qPCR-resultat. Klorin är effektivt mot ett brett spann av

mikroorganismer och förstör fritt DNA men inaktiveras snabbt i närvaro av organiskt material. Det är dessutom ett dåligt val ur miljösynpunkt, då det är giftigt för vattenlevande djur (Naturskyddsföreningen, 2017). Detta gör att det trots sin effektivitet inte är lämpligt för desinfektion av veterinära redskap eller stallinredning.

Resultaten från de försök som gjordes med trästolpar och vattenhinkar kan ses i tabell 5-8. Försöken med trästolparna genomfördes både vinter- och sommartid. Vintertid var alla stolpar positiva på odling efter 4 dagar men negativa efter 10 dagar. Sommartid var odlingsresultaten negativa redan efter 4 dagar. Detta skulle kunna betyda att ett fuktigt och kallare klimat med mindre mängd solljus förlänger bakteriens överlevnadstid, och tvärtom förkortar ökad temperatur och solljus tiden. Dock överlevde bakterien maximalt 10 dagar även utan rengöring eller desinfektion av stolparna. Den korta överlevnaden på trästolpar sommartid stämmer överens med Weese *et al.* (2009) studie som visade att *S. equi* endast överlevde några få dagar i ett sommarklimat på de material som kontaminerats. Kortast var överlevnadstiden på trämaterial när det var soligt (max 24 h). Den nyligen redovisade studien av Durham *et al.* (2017) hade mycket likheter med denna studie, då överlevnaden av *S. equi* på olika material som förekommer i ett stall undersöktes. Durham *et al.* använde i likhet med denna studie bland annat trästolpar och vattenhinkar. Stolparna var vintertid odlingspositiva i maximalt en dag och sommartid maximalt fyra dagar. Dessa resultat stämmer till viss del överens med detta examensarbete med tanke på den korta överlevnadstiden. Överlevnadstiden var emellertid längre vintertid i denna studie, vilket skulle kunna bero på en skillnad i klimatet.

Försöken med vattenhinkarna gjordes under vinter- och sommartid. Hinkarna stod i ett oisolerat uthus och sommartid byttes vattnet ut alla dagar utom de första. Tabell 7 visar att 5 av 6 hinkar var odlingspositiva dag 10 sommartid. Dag 19 var 1 hink positiv och dag 24 var alla negativa på odling men positiva på qPCR. Trots att vattnet byttes ut varje dag överlevde alltså *S. equi* i 83 % av fallen i minst 10 dagar och DNA fanns kvar i minst 24 dagar. Resultaten från vintern ses i tabell 8. Dag 31 var alla hinkar odlingspositiva, dag 45 var 4 av 6 hinkar fortfarande positiva och dag 73 var en hink positiv. Medelvärde för överlevnadstiden var på sommaren 10,5 dagar och på vintern 45,0 dagar. Vintertid överlevde bakterien alltså i medel fyra gånger så lång tid som på sommaren, vilket skulle kunna förklaras av lägre temperatur och även på grund av att vattnet inte byttes ut. Redan 1664 fanns det teorier kring att för hästarna gemensamma dricksutrymmen/vattenhinkar kunde vara en källa för smitta av kvarka (Todd, 1910). Även i Durham *et al.* (2017) kontaminerades fuktiga vattenhinkar som stod inomhus. De fann att överlevnaden var 5 dagar sommartid och 34 dagar vintertid, alltså kortare jämfört med denna studie. De varierande resultaten skulle kunna förklaras med högre medeltemperatur och annorlunda metoder jämfört med denna studie. Precis som Weese *et al.* (2009), Durham *et al.* (2017) samt flera andra artikelförfattare diskuterar indikerar resultaten från denna studie att överlevnaden av *S. equi* kan vara längre i gynnsamma miljöer som svalare klimat, mindre UV-strålning och högre fuktighet.

Både de trästolpar och vattenhinkar som användes hade tidigare använts i stall och hade ett därmed naturligt slitage. De provtogs inte för *S. equi* innan de användes i försöken. Bremsarna samlades in från veterinärstationer och hästkliniker där de hade använts i arbetet och blivit naturligt slitna. Syftet med ett naturligt slitage var att få ett resultat som reflekterar verkliga

förhållanden. Ett slitet och använt material kan vara svårare att rengöra. Dessutom kan stolparna och hinkarna som inte rengjordes innan försöken ha haft en naturlig bakterieflora som *S. equi* kunde konkurrera med. Bremsarna tvättades och desinficerades innan försöken.

Den bakteriebuljong som användes vid kontamination av bromsar, stolpar och hinkar hade en hög koncentration av *S. equi* i renkultur. Detta kan ha påverkat omgivningsbakterierna på ett sätt som inte skulle skett vid en kontamination från en häst. Utsöndring av *S. equi* från hästar med kvarka sker dessutom med näsflöde eller sekret från en abscess, vilket gör att omgivningsfaktorerna är annorlunda jämfört med i detta försök. I Weese *et al.* (2009) studie överlevde *S. equi* längre när de inokulerats i sekret från näshålan, om gränsen drogs vid en dag. Teorin är att sekret från näshålan utgör en skyddande miljö. Det är möjligt att överlevnadstiden i denna studie varit längre om bakterien hade skyddats av mukus. Då stolparna och hinkarna endast var ytligt rengjorda fick troligen *S. equi* även en viss naturlig konkurrens av omgivningsbakterier, vilket även varit fallet i verkligheten.

De fyra stallar som provtogs hade haft en eller flera hästar som varit sjuka i kvarka. Proverna togs efter det att alla hästar varit friska i cirka tre veckor i tre av stallen och sex veckor i ett av stallen. Från provtagningarna i de fyra stallarna var 6/51 (11 %) prover positiva på odling och 1/6 (17 %) på qPCR. De material som fick positiva provsvar var varierande; metall, trä, bomull och nylon. I två av stallarna blev nylongrimmor positiva på odling och i ett av de stallen hade den aktuella grimman enligt uppgift tvättats i maskin 60 °C. Svårigheten att rengöra nylongrimmor visade sig även i Rydén *et al.* (2017) studie där maskintvätt i 60 °C var nödvändig för att grimmorna skulle få negativa resultat på odling. Då noggrann rengöring krävs för att bakterien inte ska spridas vidare är ett alternativ att byta ut alla syntetgrimmor och eventuellt andra material som är svåra att rengöra och som varit i kontakt med smittade hästar efter ett utbrott av kvarka. I ett av stallen gav träytan i en utebox ett positivt odlingsresultat för *S. equi*, dock påvisades bara en koloni. Den uteboxen hade varken tvättats eller desinficerats och hästar hade inte vistats där på 14 dagar, vilket säkerställer att bakterien överlevt åtminstone den tiden. Bland övriga ytor som provtogs fanns flertalet vattenhinkar som stod utomhus, krubbor i plast inomhus, ett hästtäck, plastpåsar utomhus och trästolpar utomhus. Alla dessa var negativa på odling. Alla de positiva ytorna och materialen var belägna inomhus eller skyddade under tak och hade inte blivit utsatta för solljus, vilket ytterligare stärker teorin om att bakterien är känslig för UV-ljus. Samtliga trästolpar som provtogs i stallarna var negativa på odling. Jämförelsevis var överlevnadstiden på trästolparna i det experimentella försöket i denna studie positiva i mindre än fyra dagar sommartid och i mellan fyra och tio dagar vintertid. Resultatet från stallarna skulle kunna tyda på att *S. equi* överlever en kort tid utomhus på trästolpar, men det är heller inte säkert att de aktuella stolparna någon gång blivit kontaminerade med bakterier från de tidigare sjuka hästarna. De vattenhinkar och krubbor av plast som inkluderades i provtagningen i stallarna stod delvis utomhus och delvis inomhus och vissa av dem var vattenfyllda. Ingen av dem gav ett positivt resultat på odling eller qPCR. Detta resultat kan jämföras med den experimentella delen av studien, där vattenhinkarna var positiva i medel 10,5 dagar på sommaren och 45,0 dagar på vintern. Sammantaget skulle dessa resultat kunna tyda på att vår- och sommartid överlever *S. equi* kortare än tre veckor i krubbor och vattenhinkar av plast. Det kan också innebära att bakterien överlevde längre i det experimentella försöket än i en verklig situation. Då inget av stallarna provtogs vintertid kan ingen jämförelse göras med

det experimentella försöket. Potentiellt skulle *S. equi* kunna överleva längre i vattenhinkar på vintern i ett stall, särskilt vid en låg temperatur. En metallyta på en boxvägg var positiv för *S. equi* i ett av stallarna. I Weese *et al.* (2009) studie var endast 2 av 16 prover positiva på en metallyta efter 3 dagar. Dock utfördes den studien utomhus. Det är möjligt att *S. equi* skulle kunna ha en större potential att överleva inomhus på metallytor.

Det finns en risk att kontaminerade material har missats vid provtagningarna av stallarna, dels för att endast utvalda material eller utrustning provtogs, och dels för att hela ytan av exempelvis en boxvägg inte inkluderades. Då odlingarna skedde på COBA-plattor som är selektiva för streptokocker blev det sällan blandflora och därmed var risken liten för att *S. equi* missades. De stallmaterial som hade ett litet antal kolonier vid positiv odling hade sannolikt en lägre risk att finnas i tillräcklig dos för att kunna smitta en ny häst, men kunde på grund av provtagningsmetoden kunde *S. equi* också finnas i en större mängd än vad som syntes vid odling. Ett positivt qPCR-svar där odlingen tidigare varit negativ utesluter inte att det finns levande bakterier kvar, men sannolikheten för att smitt dosen är av klinisk relevans är lägre. Ur klinisk synpunkt var det alltså främst positiva odlings svar som var relevanta.

Från provtagningen i stallarna var ett av de positiva odlingsresultaten från en utebox. Detta var det enda av de sex positiva odlingsresultaten där ingen häst hade vistats fram till provtagning. För de andra fem proverna kunde ett positivt odlings svar även bero på miljökontamination av en häst som tidigare varit sjuk och fortfarande urskilde *S. equi*. Den risken kan ha varit särskilt stor i det tredje stallet i studien, där 14 av 22 hästar varit sjuka, vilket innebär en större risk för att minst en av hästarna blivit en kronisk smittbärare. Till exempel Christmann & Pink (2017) och Waller (2014) menar att identifiering och behandling av de kroniska smittbärarna är det viktigaste för att bli kvitt fortsatt smittspridning vid ett utbrott. Diagnostiken kan där också anses vara den största utmaningen. I en studie konstaterade författarna att 68 % av alla utbrott med kvarka resulterar i minst en häst som utsöndrar *S. equi* under fyra veckor efter det att den inte längre har några kliniska tecken på sjukdom (Newton *et al.*, 1999). Hur många hästar som blir tysta smittbärare beror troligen på flera faktorer, såsom behandling, isolering och immunstatus. En del källor hävdar att överlevnaden i miljön inte är av betydelse (Prescott & Timoney, 2007, Weese *et al.*, 2009), medan vissa hävdar att den kan vara av betydelse för smittspridning (Jorm, 1992, Sweeney *et al.*, 2005). Kunskapen om överlevnaden av *S. equi* i miljön är oavsett en viktig del i smittspridningen. En tyst smittbärare skulle indirekt, via kontaminerad inredning eller utrustning, kunna smitta nya hästar. Det är därför viktigt att veta hur länge bakterien kan överleva på olika material och hur de bäst rengörs. Vid försöket med vattenhinkarna blev odlingsresultaten positiva i maximalt 19 dygn (1/6 hinkar) sommartid och i minst 73 dagar (1/6 hinkar) vintertid. Under denna tid skulle en vattenhink kunna ha en stor potential att sprida kvarka till ytterligare hästar.

I den här studien sågs positiva resultat från tre av fyra stallar efter det att hästarna varit friska i tre till sex veckor. Det skulle kunna bero på att hästarna fortfarande utsöndrade levande bakterier eller på att bakterierna överlevt i miljön. Detta resultat pekar på att det krävs en isoleringstid för stall som är längre än de tre veckor efter tillfrisknande som svensk travsport har som krav. SVA rekommenderar minst fyra till sex veckors isolering efter det att alla hästar är kliniskt friska, vilket troligen är mer rimligt. Veterinärer har olika rekommendationstid för

hur lång en isolering ska vara och kontrollen för att den följs är inte särskilt hård. Djurägaren själv har ett stort ansvar att hålla noggrann hygien och informera allmänheten och besökande. Därför är det viktigt att det finns tydliga rekommendationer om hur lång en isoleringstid ska vara och råd kring hur ett stall ska tvättas och desinficeras. Mer strikta regler skulle kunna öka motivationen för att smittskyddsrekommendationer följs i större utsträckning. I de provtagna stallarna var flera olika sorters material odlingspositiva efter provtagning, vilket visar på betydelsen att rengöra och desinficera hela stallet och utrustningen som varit i kontakt med smittade hästar. Utrustning som är svår att rengöra, till exempel nylongrimmor, kan vara enklare att byta ut. SVA har generella råd vad gäller rengöring av stall och stallutrustning efter en infektion, bland annat kvarka. Rengöring skall ske när alla hästar tillfrisknat och inga nya hästar drabbas i slutet av isoleringstiden, efter det att alla hästar varit friska i fyra till sex veckor. Risken är annars att hästar som är kliniskt friska fortfarande urskiljer *S. equi* och därför återkontaminerar miljön. Eftersom *S. equi* är känslig för flertalet desinfektionsmedel borde noggrann rengöring och desinfektion vara tillräcklig för att bli av med smittämnet i miljön.

SLUTSATS

Resultaten från denna studie visar att *S. equi* har potential att överleva en betydande tid i miljön, men att den är känslig för vissa omgivningsfaktorer. Den är dessutom känslig för flertalet rengörings- och desinfektionsmedel, men även en rengjord brems kan ge ett positivt qPCR-resultat vilket kan påverka en provtagning på en misstänkt kvarkahäst. För att få mer kunskap kring *S. equi* överlevnad i en stallmiljö skulle det vara önskvärt med studier där material kontaminerades med *S. equi* i sin naturliga miljö, alltså skyddade av exempelvis mukus från näshålan. Det skulle också vara intressant med ytterligare provtagningar i stallar som haft utbrott av kvarka och samtidigt undersöka de tidigare sjuka hästarna för att se om de fortfarande urskiljer *S. equi*.

TACK

Tack till min handledare Miia Riihimäki och biträdande handledare John Pringle för all hjälp, support och utlånande av framtida bastu. Tack till Lise-Lotte Fernström för alla analyser av prover och för att du svarade på alla mina frågor, utan dig hade det inte gått! Likaså tack till Elin Svonni och Anneli Rydén för hjälp vid försöken. Tack till Emma Storm för alla diskussioner och konstruktiv kritik. Tack även till de kliniker och veterinärstationer som skänkte sina bremsar till mig. Och sist men inte minst tack till de som ställde upp och lät mig ta prover i deras stallar.

REFERENSER

- Animal Health Trust (2015). Strangles – a pathogenic legacy of the war horse. (05-09-2017-09)
http://www.aht.org.uk/cms-display/DEFRA_AHT_BEVA_equine_reports.html. [2017-10-25]
- Anzai, T., Timoney, J.F., Kuwamoto, Y., Fujita, Y., Wada, R., Inoue, T. (1999). In vivo pathogenicity and resistance to phagocytosis of *Streptococcus equi* strains with different levels of capsule expression, *Veterinary Microbiology*, 67: 277-286
- Boschowitz, F.S., Timoney, J.F. (1994). Inhibition of C3 deposition on *Streptococcus equi* subsp. *equi* by M protein: a mechanism for survival in equine blood. *Infection and Immunity*, 8:3515-3520
- Boyle, A.G. (2017). Strangles and its complications, *Equine Veterinary Education*, 29: 149-157
- Båverud, V., Johansson, S.K., Aspan, A. (2007). Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Veterinary Microbiology*, 124: 219-229
- Chanter, N., Newton, J.R., Wood, J.L., Verheyen, K., Hannant, D. (1998). Detection of strangles carriers. *The Veterinary Record*, 18: 496
- Christmann, U., Pink, C. (2017). Lessons learned from a strangles outbreak on a large Standardbred farm, *Equine Veterinary Education*, 29: 138-143
- Dagleish, R., Love, S., Pirie, H.M., Taylor, D.J., Wright, N.G. (1993). An outbreak of strangles in young ponies. *The Veterinary Record*, 132: 528-531
- Duffe, L.R., Stefanovski, D., Boston, R.C. & Boyle, A. G. (2015). Predictor variables for and complications associated with *Streptococcus equi* subsp *equi* infection in horses, *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 10: 1161-1168
- Durham, A., Hall, S., Kulp, L., Underwood, C. (2017). A study of the environmental survival of *Streptococcus equi* subspecies *equi* (abstract). In: 10th Annual European College of Equine Internal Medicine Congress, 13
- Dwyer, R.M. (2004). Environmental disinfection to control equine infectious diseases, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 20: 531-542
- Ford, J., Lokai, M.D. (1980). Complications of *Streptococcus equi* infection, *Equine Practice*, 2: 41-44
- Gröndahl, G., Melys, V., Ljung, H., Riihimäki, M., Båverud, V. (2016). Performance of the iELISA in horses with long term guttural pouch carriage of *Streptococcus equi* subsp *equi*. *Journal of Equine Veterinary Science*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2016.02.029>, [06-12-2017]
- Ijaz, M., Ali, M.M., Mehmood, K., Ali, S. (2015). Molecular diagnosis of *Streptococcus equi* subsp.*equi* along with carrier potential in clinically affected horses, *Pakistan Journal of Zoology*., 3: 870-873
- Johansson, E. (2016). Överlevnad av *Streptococcus equi* subspecies *equi* i hästens närmiljö, efter rengöring och desinfektion. Sveriges lantbruksuniversitet. Djursjukskötprogrammet (Kandidatarbete 2016:24)
- Johnson & Johnson (02-20-2006),
(<https://www.onemed.se/Archive/InfoPages/ProdInfo/202034.pdf>,Produktblad, [2017-09-11]
- Jorm, L.R. (1992). Laboratory studies on the survival of *Streptococcus equi* subspecies *equi* on surfaces, *Equine Infectious Diseases*, 6: 39-43
- Laus, F., Preziuso, S., Spaterna, A., Beribé, F., Tesesi, B., Cuteri, V. (2007). Clinical and epidemiological investigation of chronic upper respiratory diseases caused by beta-haemolytic Streptococci in horses. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 30: 247-260
- Lindahl, S., Båverud, V., Egenvall, A., Aspán, A. & Pringle, J. (2013). Comparison of sampling sites and laboratory diagnostic tests for *S. equi* subsp. *equi* in horses from confirmed strangles outbreaks, *Journal of Veterinary Intern Medicine*, 27; 542-547

- Mallicote, M. (2015). Update on *Streptococcus equi* subsp. *equi* Infections, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 31: 27-41
- Naturskyddsforeningen, städa utan giftiga kemikalier, (30-07-2013)
<https://www.naturskyddsforeningen.se/vad-du-kan-gora/gron-guide/stada-utan-giftigakemikalier>
 [2017-10-24]
- Neamat-Allah, A.N.F & El Damaty, H.M. (2016). Strangles in Arabian horses in Egypt: Clinical, epidemiological, haematological, and biochemical aspects. *Veterinary World*, 9: 820-826 (online-tidning, publicerad 06-08-2016)
- Newton, J.R., Wood, L.N., Dunn, K.A., de Brauwere M.N., Chanter, N. (1997). Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*, *The Veterinary Record*, 140: 84-90
- Newton, J.R., Verheyen, K., Talbot, N.C., Timoney, J.F., Wood, J.L.N., Lakhani, K.H., Chanter, N. (2000). Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*, *Equine Veterinary Journal*, 32: 515-526
- Piché, C.A., (1984). Clinical observations on an outbreak of strangles, *Canadian Veterinary Journal* 25: 7-11
- Prescott, J.F., Timoney, J.F., (2007). Could we eradicate strangles in equids?, *Veterinary Clinics of North America*, 3: 377-378
- Reed, S.M., Bayly, W.M., Sellon, D.C. (2010). *Equine Internal Medicine*, 3. Ed, St. Louis, Saunders Elsevier, 306-311
- Robinson, C., Steward, K.F., Potts, N., Hammond, T., Pierce, K., Gunnarsson, E., Svansson, V., Slater, J., Newton, J.R., Waller, A.S. (2013). Combining two serological assays optimizes sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure, *The Veterinary Journal*, 197: 188-191
- Ryden, A., Pringle, J., Fernström, L-L., Svonni, E., Riihimäki, M. (2017). Effectiveness of cleaning and sanitation of stable environment and riding equipment following contamination with *Streptococcus equi*. Abstract at: British Equine Veterinary Association congress in Birmingham
- Sellon, D.C., Long, M.T. (2014). *Equine infectious diseases*, 2. Ed, Saunders Elsevier, 265-276
- Skorobohach, B.J. (1994). The effect of various surfaces and disinfectants upon the survival of *Streptococcus equi*. In: 20th Annual Meeting of the Western Canadian Association of Equine Practitioners, 25-28
- Smith, B.P. (2015). *Large Animal Internal Medicine*, 5. Ed, Elsevier Mosby, 504-507
- Smittskyddsreglemente Svensk Travsport, (2017-01-31)
<https://www.travsport.se/artikel/smittskyddsregler> [08-09-2017]
- Statens Veterinärmedicinska Anstalt (2015-09-04 a). Generella råd kring stallrengöring och desinfektion vid smittsamma sjukdomar – häst. <http://www.sva.se/djurhalsa/hast/stallrengoring-hast> [2017-11-21]
- Statens Veterinärmedicinska Anstalt (2015-11-16 b). Kvarka hos häst
<http://www.sva.se/djurhalsa/hast/infektionssjukdomar-hast/kvarka-hast/> [2017-09-01]
- Sveriges Veterinärmedicinska Sällskap (2013-05). *Antibiotikapolicy för häst*.
<http://www.svf.se/Documents/S%c3%a4llskapet/H%c3%a4stsektionen/Anitibiotikapolicy%20h%c3%a4st.pdf> [02-10-2017]
- Sweeney, C.R., Whitlock, R.H., Meirs, D.A., Whitehead, S.C., Barningham, S.O. (1987). Complications associated with *Streptococcus equi* infection on a horse farm. *Journal of American Veterinary Medical Association*. 191: 1446-1448.
- Sweeney, C.R., Benson, C.E., Whitlock, R.H., Meirs, D.A., Barningham, S.O., Whitehead, S.C., Cohen, D. (1989). Description of an epizootic and persistence of *Streptococcus equi* infections in horses. *Journal of Veterinary Medical Association*, 9: 1281-1286

- Sweeney, C. R. (1996). Strangles: *Streptococcus equi* infection in horses, *Equine Veterinary Education*, 8: 317-322
- Sweeney, C.R., Timoney, J.F., Newton, J.R., Hines, M.T. (2005). *Streptococcus equi* infections in horses: guidelines for treatment, control, and prevention of strangles, *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 19: 123-134
- Taylor, S.D., Wilson, W., D. (2006). *Streptococcus equi* subsp. *equi* (Strangles) Infection, *Clinical Techniques in Equine Practice*, 3: 211-217
- Timoney, J.F. (2004). The pathogenic equine streptococci, *Veterinary Research* 35: 397-409
- Timoney, J.F., Kumar, P. (2008). Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles), *Equine Veterinary Journal*, 40: 637-642
- Timoney, J.F. (1988). Shedding and maintenance of *Streptococcus equi* in typical and atypical strangles, In: Powell DG, ed. *Equine Infectious Diseases V*. Lexington Kentucky: The University Press of Kentucky, 28-33
- ThermoFisher (11-10-2017) qPCR vs. Digital PCR vs. traditional PCR.
<http://www.thermoFisher.com/se/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/qpcr-education/qpcr-vs-digital-pcr-vs-traditional-pcr.html> [12-10-2017]
- Todd, A.G. (1910). Strangles, *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 23: 212-229
- Tscheschlock, L., Venner, M., Steward, K., Böse, R., Riihimäki, M., Pringle, J. (in press) Decreased clinical severity of strangles in weanlings associated with restricted seroconversion to optimized *S. equi* assays. *Journal of Veterinary Internal Medicine*
- Verheyen, K., Newton, J.R., Talbot, N.C., de Brauwere, M.N., Chanter, N. (2000). Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi*, *Equine Veterinary Journal*, 32: 527-532
- Waller, A., S. (2014). New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses, *Veterinary Clinics of North America: Equine Practice*, 30: 591-607
- Waller, A., S. (2013). Strangles: Taking steps towards eradication, *Veterinary Microbiology* 167: 50-60
- Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K.F., Robinson, C., Newton, J.R., Waller, A.S. (2012). Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay, *The Veterinary Journal*; <http://dx.doi.org/10.1016/tvj.2012.07.007>
- Weese, J., S., Jarlot, C., Morley, P., S. (2009). Survival of *Streptococcus equi* on surfaces in an outdoor environment, *Canadian Veterinary Journal*, 50: 968-970