



Sveriges lantbruksuniversitet  
Swedish University of Agricultural Sciences

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

# **Användbarheten av inflammationsmarkören SAA som komplement vid kvarkadiagnostik**

*Sandra Lennartsson*

*Uppsala  
2018*

*Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet*

*ISSN 1652-8697  
Examensarbete 2018:71*



# Användbarheten av inflammationsmarkören SAA som komplement vid kvarkadiagnostik

## Usability of the inflammatory marker SAA as a complement in strangles diagnostics

*Sandra Lennartsson*

*Handledare: John Pringle, institutionen för kliniska vetenskaper, SLU*

*Examinator: Miia Riihimäki, institutionen för kliniska vetenskaper, SLU*

*Examensarbete i veterinärmedicin*

**Omfattning:** 30 hp

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

**Kurskod:** EX0736

**Utgivningsort:** Uppsala

**Utgivningsår:** 2018

**Delnummer i serie:** Examensarbete 2018:71

**ISSN:** 1652-8697

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

**Nyckelord:** Kvarka, Serum Amyloid A, subklinisk smittbärare

**Key words:** Strangles, Serum Amyloid A, subclinical carrier

**Sveriges lantbruksuniversitet**  
**Swedish University of Agricultural Sciences**

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap  
Institutionen för kliniska vetenskaper



## SAMMANFATTNING

Kvarka är en global bakteriell övre luftvägsinfektionssjukdom hos häst orsakad av bakterien *Streptococcus equi* (*S. equi*). Sjukdomen i sig är sällan livshotande för de hästar som drabbas men innebär ett lidande för djuren och den orsakar ofta stor skada. Dels i form av ekonomiska förluster för näringsidkare på grund av isolering, merarbete, sjukdomskostnader och bortfall av potentiell inkomst. Det innebär även psykosocial skada för den drabbade hästägaren då sjukdomen är mycket stigmatiserad bland hästfolk. Senare års forskning har visat att det finns subkliniska smittbärare i hästpopulationen och dessa bär på bakterien i sina luftsäckar och de utgör därmed en reservoar och smittorisk.

Nuvarande gold standard för diagnostik av kvarka hos häst är med hjälp av Polymerase Chain Reaction (PCR) där man detekterar bakterie-DNA från provtagningsmaterialet. Dock är denna metod kostsam vid provtagning av flera hästar då både provtagningen och analysen är resurskrävande, och därför vore det intressant att hitta ett alternativt screeningtest för kvarka eller ett beslutsstödjandetest inför riktad PCR-diagnostik. Vid en kvarkainfektion förändras mätbara parametrar så som den vita blod bilden och olika inflammationsmarkörer utöver de kliniska sjukdomstecken som hästarna kan uppvisa i varierande grad. Denna studie ämnar undersöka hur inflammationsmarkören Serum Amyloid A:s (SAA) värde förändras över tid under pågående kvarkainfektion hos häst, om subkliniska smittbärare har förhöjda SAA-värden och om SAA-värdet kan användas prognostiskt eller för att bedöma graden av infektion.

Insamlad data kom från en tidigare studie (Tscheschlok *et al.*, 2018) av ett hundratal unghästar vid stuteri Lewitz i Tyskland. Hästarna undersöktes från oktober 2014 till och med mars 2015 under ett pågående kvarkautbrott. Resultaten från denna undersökning visar att det på grupp nivå finns ett samband mellan förhöjda SAA-värden och verifierad *S. equi* infektion i den akuta sjukdomsfasen. SAA-värdet var inte förhöjt hos de subkliniska smittbärarna och kan därmed inte användas i screeningsyfte för att hitta dessa individer. Normalt SAA-värde kan inte utesluta en pågående kvarkainfektion men ett högt SAA-värde kan användas som ett beslutsstöd för riktad PCR-diagnostik vid en kvarkamisstanke eller vid screening under ett pågående utbrott. Denna studie kunde inte visa att SAA-värdet gick att använda för att uttala sig om prognos eller bedöma den kliniska graden av infektion vid kvarkainfektion.

## SUMMARY

Strangles is a global bacterial upper respiratory tract infection in horses, caused by the bacterium *Streptococcus equi* (*S. equi*). The disease is rarely life-threatening for affected horses but causes great suffering and is a welfare concern. The damage caused by the disease has for the horse owners both economical and psychosocial implications. Business owners may experience financial losses due to the isolation, additional work, costs associated with the outbreak and loss of potential income. The stigma surrounding the disease may also inflict emotional distress. Recent years' research has shown that some horses become subclinical carriers, harbouring the bacteria in their guttural pouches, thereby posing a risk of spreading the disease.

Present gold standard for diagnosing strangles is by polymerase chain reaction (PCR), where bacteria DNA is detected in the testing material. However, this method is rather costly when several horses must undergo testing and consequently it would be of great interest to find an alternative screening test or a decision aid for directed strangles testing. Several clinical parameters apart from the clinical signs are affected by strangles, such as the total leucocyte count and various inflammatory markers. The aim of this study is to investigate how the inflammatory marker Serum Amyloid A's (SAA) value changes over time during a natural outbreak of strangles. Do the subclinical carriers have elevated SAA values and can SAA be used to evaluate the degree of disease or to predict prognosis?

Collected data is from a previous study (Tscheschlok *et al.*, 2018) which examined a large group of yearlings at Lewitz stud, Germany, during a natural outbreak from October 2014 to March 2015. The results from the current study shows a link on a group level between elevated SAA values and strangles during the acute face. The SAA value remained normal with the subclinical carriers, making SAA unsuitable as a screening test to detect these individuals. Normal SAA value cannot exclude the possibility of an ongoing infection while an elevated SAA value can be used as a decision aid for directed PCR testing when suspecting strangles or as a screening test during a confirmed outbreak. This study could not make any conclusions on the utility of SAA as a predictor to evaluate the degree of disease or prognosis.

# INNEHÅLL

INLEDNING .....	1
LITTERATURÖVERSIKT.....	2
Kvarka - <i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>equi</i> .....	2
Etiologi .....	2
Patogenes.....	3
Följsjukdomar och komplikationer.....	4
Differentialdiagnoser.....	5
Subkliniska smittbärare .....	5
Kontroll och prevention.....	6
Diagnostik .....	7
Bakteriologi.....	7
Serologi .....	8
Hematologi: LPK .....	9
Serologiska inflammationsmarkörer .....	10
MATERIAL OCH METODER.....	16
Hästar i studien.....	16
Klinisk undersökning och provtagning .....	16
Analys av prover .....	16
Bearbetning .....	17
Statistisk analys .....	17
RESULTAT .....	18
Bakteriologi: PCR .....	18
Serologi, LPK, SAA och förekomst av feber.....	19
Sensitivitet och specificitet för variablerna att indikera en kvarkainfektion .....	22
SAA-värdets förhållande till övriga variabler oberoende av <i>S. equi</i> .....	23
DISKUSSION .....	24
Resultatdiskussion.....	24
Resultatsammanfattning .....	29
Metoddiskussion.....	29
REFERENSER.....	33





## INLEDNING

Kvarka är en global bakteriell övre luftvägsinfektionssjukdom hos häst. Sjukdomen orsakas av bakterien *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*) och börjar med hög feber, vanligtvis följt av nosflöde och hosta inom någon dag. Nosflödet blir ofta varigt och lymfknutorna i huvud- och halsregionen svullnar och kan bilda bölder som senare kan spricka upp. Dock kan en del hästar få mildare symtom, med eller utan feber vilket kan försvåra diagnostisering och därmed riskera att smittspridningen kan pågå under en längre tid innan diagnosen ställs. Sjukdomen är för de allra flesta hästar ofarlig och de tillfrisknar efter sjukdomsförloppet men den innebär ett lidande för djuren och är ett påtagligt välfärdsproblem. En del hästar har visat sig kunna bli subkliniska smittbärare efter de till synes tillfrisknat, och riskerar därmed att kunna föra smittan vidare under en längre tid. Konsekvenserna för djurägarna är ekonomiska men även psykosociala. Den ekonomiska påverkan beror på isoleringen, merarbetet, sjukdomskostnader och bortfall av potentiell inkomst för näringsidkare. Bara i Storbritannien står hästindustrin årligen för 7 miljarder pund av landets ekonomi (Robinson *et al.*, 2018). Sjukdomen är bland många hästägare mycket stigmatiserad och fruktad och det är inte sällan i stall med flera hästägare inblandade att en fråga om skuld kan uppkomma. Vilken häst är den skyldige till att smittan kom till stallet?

Gold standard för diagnostik av kvarka hos häst är med hjälp av PCR (Polymerase chain reaction) där man detekterar bakterie-DNA från provtagningsmaterialet. Vid kvarkainfektion förändras även andra mätbara parametrar så som den vita blod bilden och olika inflammationsmarkörer. Serum Amyloid A (SAA) är en inflammationsmarkör hos häst som kan stiga vid bakteriell sjukdom och har visat potential att användas för att utvärdera sjukdomsgrad och prognos. PCR-provtagning för kvarka är vid provtagning av flera hästar kostsamt och det vore av intresse att hitta ett alternativt potentiellt screeningtest eller ett beslutsstödjande test inför riktad PCR-diagnostik. Subkliniska smittspridare är ett allvarligt problem i smittspridningen och idag kan de endast upptäckas genom att endoskopera och ta prov från luftsäckarna.

Med detta som bakgrund ämnar denna studie undersöka hur värdet för inflammationsmarkören SAA förändras över tid under pågående kvarkainfektion hos häst. Hur förhåller sig SAA-värdet med bakteriologi för *S. equi* och *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* samt serologi för *S. equi* avseende antigen A och C? Överensstämmer SAA med övriga infektionsparametrar, LPK och feber? Är SAA-värdet fortsatt förhöjt hos subkliniska smittbärare? Kan SAA användas för att säga något om prognos, och/eller infektionsgrad?

## LITTERATURÖVERSIKT

### **Kvarka - *Streptococcus equi subspecies equi***

Kvarka är en bakteriell infektionssjukdom hos häst som främst drabbar de övre luftvägarna. Det är en av de tidigast beskrivna hästsjukdomarna i världen, redan år 1251 skrev Jordan Ruffus om sjukdomen i *De Medicina Equorum* (Ruffus, 1251).

Todd (1910) inleder sin artikel med att ta upp flera äldre källor från 1600- till 1800-talet som beskrivit sjukdomens enzootiska karaktär och dess smittsamhet. Vidare beskrev Todd att kvarka föreföll att drabba den yngre hästpopulationen hårdare jämfört med äldre hästar. Solleysel rekommenderade redan år 1664 isolering av sjuka djur och menade att en vanlig smittväg var via vattenhinkar som sjuka hästar använt.

Kvarka är endemisk i världen och är i engelsktalande länder känd som strangles. Namnet har sitt ursprung i det kvävda lätet vid andning, som en del drabbade hästar kan utveckla på grund av de svullna lymfknutorna i halsregionen.

I Sverige är kvarka anmälningspliktigt vid misstanke och vid konfirmerade sjukdomsfall. År 2016 rapporterades 116 indexfall (Jordbruksverket, 2016). Sedan 2017 har kvarka rapporteringsplikt även i USA och vissa andra länder (Boyle *et al.*, 2018).

### ***Etiologi***

*Streptococcus equi subspecies equi* (*S. equi*) är en grampositiv, katalas negativ, fakultativt anaerob, kockoid, beta-hemolyserande streptokock tillhörande Lancefield grupp C (Sweeney *et al.*, 2014). Det finns bevis som talar för att *S. equi* har en gemensam anfader i en stam av *Streptococcus equi subspecies zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) (Jorm *et al.*, 1994; Webb *et al.*, 2008; Holden *et al.*, 2009). *S. equi* anses vara värdspecifik för hästdjur, *Equidae*, men ett fall finns beskrivet av *S. equi* infektion hos hund (Ladlow *et al.*, 2006).

### ***Virulensegenskaper hos bakterien***

*S. equi* har flera olika egenskaper som påverkar dess virulens och de symtom den ger vid infektion. Det finns flertalet vetenskapliga artiklar som beskriver potentiella virulensfaktorer utifrån att de studerat sekvenserat genom från *S. equi* och dess nära släkting *S. zooepidemicus*.

Harrington *et al.* (2002) valde i deras review artikel över *S. equi*:s virulensfaktorer att kategorisera dem i tre huvudgrupper utifrån deras presumtiva huvudfunktion. Adherens till värddytan, undvikande av värddjurets immunförsvar och ackvisition av näring. En del virulensfaktorer som deltar i ackvisition av näring kan även ha egenskaper som skadar värden eller bidrar till spridningen av *S. equi*. Till gruppen som främjar adherens hör fibronectin-bindande protein och fibrinogen-bindande protein men även bakteriekapseln har visat potential till denna egenskap, vilket studier på närbesläktade *S. zooepidemicus* och andra streptokocker indikerat. Virulensfaktorer som undviker värddjurets immunförsvar är kapseln, mitogena faktorer och cellväggs associerade M-likeprotein, till exempel det *S. equi* specifika SeM. De närings-ackvirerande virulensegenskaperna är surt fosfats, ABC-transportörer, degenerativa enzymer och streptolysin-liknande toxin.

Anzai *et al.* (1999) undersökte tre olika stammar av *S. equi* och fann att den sträng som inte uttryckte en kapsel varken kunde motstå fagocytos av neutrofiler eller ge klinisk sjukdom, trots att den bakteriesträngen kunde återfinnas i luftsäckarna och att de infekterade hästarna hade serokonverterat.

Timoney *et al.* (2014) undersökte sambandet mellan två av *S. equi*:s virulensegenskaper hyaluronkapseln och det fibrinogenbindande ytproteinet SeM och de fann att vid avsaknad av en kapsel blev de bakteriesträngar som ändå uttryckte SeM mer mottaglig för fagocytos. Detta tolkades som att SeM:s antifagocytiska egenskap är beroende av en kapsel. De drog slutsatsen att tidigare studiers resultat att kapseln är en viktig virulensfaktor endast är fullständigt giltigt om bakterien samtidigt uttrycker SeM.

### **Patogenes**

*S. equi* smittar antingen direkt mellan hästar eller via mukopurulent utsöndringar från infekterade hästar som kan finnas på kontaminerad utrustning, i miljön eller på personer. Bakterien tar sig oftast in via nos eller mun där den penetrerar slemhinnan i tonsillkryptor och snabbt sprider sig till lymfatisk vävnad och lymfknotor, då framför allt retrofaryngeal- och submandibularlymfknotorna. Redan tre timmar efter intranasal inokulering med *S. equi* kan bakterien återfinnas i dränerande lymfvävnad i huvud och halsregionen (Timoney & Kumar, 2008).

Kliniska sjukdomstecken utvecklas tre till 14 dagar efter infektionstillfället och infekterade hästar blir smittsamma först en till två dagar efter feberinsättandet. Detta innebär att nya fall kan isoleras innan de får möjlighet att smitta fler hästar, förutsatt att man registrerar feberinsättandet (Sweeney *et al.*, 2005).

Det första sjukdomstecknet är oftast hög feber, följt av nosflöde och lymfadenopati. Lymfknotor i huvud och halsområdet svullnar och kan bilda bölder som om de spricker kan dräneras externt eller i kroppen. Bölder som dränerar sig i kroppen kan potentiellt orsaka att var hamnar i luftvägar eller luftsäckar. Inflammationen i halsen i kombination med svullna lymfknotor orsakar smärta vilket kan leda till anorexi eller minskad aptit. Sjuka hästar kan även hosta, vara letargisk eller utveckla ödem (Smith, 2014).

Hästar i alla åldrar kan drabbas av kvarka. Yngre hästar får generellt kraftigare sjukdomstecken med längre sjukdomsförlopp och ofta med bölder som spricker. Medan äldre hästar ofta uppvisar mildare sjukdomstecken och ett kortare sjukdomsförlopp, så kallad atypisk kvarka. Detta beror troligtvis på tidigare exponering för bakterien eller genomgången sjukdom som skapat en viss immunitet.

Även virulensen hos just den bakteriestam som orsakat sjukdom påverkar symtombild och morbiditet (Anzai *et al.*, 1999; Timoney & Kumar, 2008; Lindahl *et al.*, 2013a; Tscheschlok *et al.*, 2018).

Duffee *et al.* (2015) rapporterade hur vanligt förekommande klassiska tecken på kvarka var hos de 108 kvarkafall som de undersökt. De fann att 72 % presenterat med feber, 62 % med mukopurulent nosflöde och endast 22 % hade utvändiga bölder i faryngealområdet. Till de

mindre vanliga symtomen hörde letargi 27 %, ödem 9 % och 3 % hade neurologisk nedsatthet (Ett fall av generell svaghet, två fall av dysfagi). 9 % av fallen uppvisade inga tecken på kvarka.

Efter genomgången infektion utvecklar ca 75 % av hästarna en avtagande immunitet som kvarstår ungefär 5 år (Todd, 1910; Hamlen *et al.*, 1994). Hästar som behandlas med antibiotika under ett utbrott utvecklar inte en lika stark immunitet, troligtvis för att de inte genomgår infektionen så att deras immunförsvar kan anpassa sig och utveckla antikroppar. Piché (1984) såg att vid det kvarkautbrott de studerade, så insjuknade de flesta unga föl i kvarka en tid efter huvudutbrottet lugnat sig och när penicillinprofylaxbehandling avslutats för dessa föl.

Riskfaktorer för att utveckla kvarka är låg ålder hos individen, att dela vattenhink, att föra samman stora grupper hästar med okänd medicinsk historia, lång transporttid eller andra faktorer som orsakar ett nedsatt immunförsvar.

### ***Följdsjukdomar och komplikationer***

I de flesta fall läker kvarka ut av sig själv efter några veckor, dock kan sjukdomsförloppet vara intensivt. I enstaka fall kan dock allvarliga komplikationer uppstå, ibland med dödlig utgång. Även om infektionens primära predilektionsställe är lymfvävnad i huvud- och halsområdet så kan bakterien sprida sig till andra delar av kroppen till exempel hjärnan och buken och där bilda bölder, så kallad kastad kvarka. Möjliga följsjukdomar till kvarka är lunginflammation, pleurit, luftsäcksempyem, anasarka, immunomedierad myosit och nervpåverkan i form av pares.

Sweeney *et al.* (1987) rapporterade att 20,3 % av kvarkafallen i deras studie drabbades av någon form av komplikation. I en studie av Duffee *et al.* (2015) fann man att av kvarkafallen i studien utvecklade 6,5 % anasarka och 2 % kastad kvarka. Cirka hälften av kvarkafallen undersöktes med endoskop i luftsäckarna och av dessa hade 64 % luftsäcksempyem och 6 % chondroider.

I en litteraturgenomgång undersökte Ramey (2010) om antibiotikabehandling var en riskfaktor för att utveckla kastad kvarka och fann att det inte fanns stöd för den teorin utifrån rådande forskningsläge.

Anasarka även kallad purpura hemorrhagica är en typ III hypersensitivitets-immunomedierad, aseptiskt, nekrotiserande, systemisk vaskulit. Det är antikroppskomplex som påverkar genomsläppligheten i blodkärlen. Den kliniska bilden kan variera i allvarlighetsgrad från mild till dödlig och visar sig som ventrala ödem, petekier och ecchymoser (Smith, 2014).

Duffee *et al.* (2015) undersökte om det fanns riskfaktorer som kunde förutsäga om en häst skulle utveckla följsjukdomar eller komplikationer till sin kvarkainfektion. De fann ett samband mellan anemi och risken att utveckla anasarka, där hästar med anemi hade 22,9 gånger större risk att utveckla anasarka. Någon riskfaktor för att utveckla luftsäcksempyem eller kastad kvarka sågs ej.

En relativt ovanlig komplikation till kvarka är olika former av nervpåverkan. Piché (1984) rapporterade ett fall av en unghäst som fått unilateral facialispares på grund av en böld som orsakat tryck på nerven. Denna pares kvarstod tio månader efter att kvarkainfektionen avläkt.

Piché citerar även tidigare forskning som nämner laryngeal pares som en möjlig komplikation vid kvarkainfektion. Detta orsakas då av svullnad som skapar tryck på *Nervus recurrens*.

### **Differentialdiagnoser**

De kliniska sjukdomstecknen för kvarka kan under de olika sjukdomsfaserna och vid atypisk kvarka vara förvillande lika flertalet andra sjukdomar som drabbar luftvägar. Att använda en specifik provtagning för kvarka är därför av yttersta vikt vid misstanke för att kunna begränsa smittspridningen.

Flera luftvägsviroser som influensa, ekvint herpesvirus, rhinitvirus, ekvint adenovirus och ekvin virusarterit kan ge en symtombild med feber, nosflöde, nedsatt aptit samt hosta i varierande allvarlighetsgrad. Bakteriell sinusit kan ge purulent nosflöde och förstörade mandibularlymfknutor, nosflödet är oftast endast enkelsidig. Bakteriella infektioner i luftvägarna orsakade av till exempel *Actinobacillus spp* och *Bordetella bronchiseptica* uppträder oftast sekundärt till en viros eller nedsatt immunförsvar av annan orsak, men sjukdomstecknen kan likna kvarka. Bronkit och bronkiolit på grund av överkänslighet och allergi kan ge luftvägssymtom med framför allt hosta men ger inte feber. Hos föl är luftvägsinfektioner med *Rhodococcus equi* och *Streptococcus spp* vanliga differentialdiagnoser till luftvägssymtom. Hosta hos föl kan även vara orsakad av spolmaskinfektion (Smith, 2014).

### ***Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus***

*S. zooepidemicus* anses vara en kommensal i noshålan på häst som inte ensam ska kunna ge sjukdomssymtom. Men Lindahl *et al.* (2013a) kunde mest trolig i sin studie fastställa att orsaken till utbrottet av luftvägssymtom som de undersökte berodde på en viss stam av *S. zooepidemicus*. Andra stammar av *S. zooepidemicus* kunde isoleras hos de friska kontrollerna i studien, men inte den stam som isolerats hos de sjuka hästarna.

### **Subkliniska smittbärare**

Redan 1910 föreslog Todd att vissa utbrott av kvarka kunde förklaras av persistent infekterade hästar som inte själva visade kliniska tecken på sjukdom. Denna teori utgick från de observationer han gjort i militärstallar. Där bröt kvarka ut trots att inga nya hästar introducerats eller kontakt med infekterade hästar skett. Todd tolkade detta som att det fanns hästar som troligtvis bar på bakterien och hade en egen immunitet (Todd, 1910).

Vid ett kvarkautbrott på ett stuteri i Kanada 1984 kunde *S. equi* odlas fram från provtagningsmaterial från en unghäst med luftsäcksempyem (Piché, 1984).

Sweeney *et al.* (1989) kunde i sin studie identifiera subkliniska smittbärare med hjälp av nossvabb upp till 27 dagar efter att de kliniska tecknen upphört. I deras studie var prevalensen av subkliniska smittbärare 19,4 %. I en annan studie av Newton *et al.* (2000) var prevalensen av subkliniska smittbärare mellan nio och 44 %.

Newton *et al.* (1997) kunde i sin studie visa att de hästar som var subkliniska smittbärare hade bakterien i sina luftsäckar, vilket även Wood *et al.* (1993) sett hos en ponny med intermittent smittutsöndring. En häst var positiv för *S. equi* i 39 månader (Newton *et al.*, 1997).

Davidson *et al.* (2008) undersökte om serologi är en användbar metod för att förutsäga om en häst är subklinisk smittbärare men kom fram till att det endast kan konfirmera en tidigare exponering för *S. equi*. Endoskopisk undersökning och bakteriell provtagning av luftsäckarna är den enda tillförlitliga metoden att påvisa om hästen är en subklinisk smittbärare. Dock finns en nyare serologisk metod (Robinson *et al.*, 2013) som vad författaren känner till ingen utvärderat i syfte att kunna diagnostisera subkliniska smittbärare.

Det var inte alla sjuka hästar som utvecklade tecken på kvarka i Duffee *et al.*:s (2015) studie, vilket belyser vikten av att ta prov från luftsäckarna för att verkligen kunna identifiera ett potentiellt kvarkafall.

### **Kontroll och prevention**

Att kvarka är en mycket smittsam hästsjukdom har varit känt i flera århundraden trots att upptäckten av smittämnen och bakterier kom först under 1800-talets andra hälft. Solleysel menade redan 1664 att isolering av sjuka hästar och att undvika att friska hästar delade vattenhink med sjuka hästar var ett sätt att begränsa smittspridningen.

Det finns få publicerade studier som tittat på *S. equi*:s överlevnad i gårdsmiljö och vilken roll överlevande smitta i miljön kan spela i smittspridningen. Weese *et al.* (2009) undersökte *S. equi*:s överlevnad utomhus, mellan juli och september i Kanada. Detta gjordes genom att inokulera ytan på fyra olika sorters material med *S. equi* upplöst i fysikaliskt koksalt respektive i övre luftvägssekret från döda eller avlivade respiratoriskt friska hästar som ej antibiotika-behandlats. De fann i sin studie att överlevnadstiden var <1–3 dagar. Material och regn påverkade inte överlevnadstiden men exponering för solsken (UV-ljus) sänkte däremot överlevnadstiden signifikant. Deras resultat stödjer teorin att laboratoriestudier om överlevnadstid inte är adekvata för att kunna uttala sig om hur länge smittan persisterar utomhus. Deras resultat antydde att överlevnaden i luftvägssekret var något högre än i koksalt. De belyste även att mikrofloran i omgivningen kan ha en påverkan, genom att konkurrera om plats med *S. equi* men även påverka bakteriell analys av provmaterialet. De efterlyste vidare miljööverlevnadsstudier av andra ytor, då andra faktorer som t.ex. vatten och fodertillblandning potentiellt kan ha en påverkan och poängterade att deras resultat inte bör extrapoleras till områden som inte exponeras för solljus (Weese *et al.*, 2009).

Boyle *et al.* gav 2018 ut ett uppdaterat consensus statement utifrån rådande forskningsläge där de gav detaljerade rekommendationer kring smittskydd och kvarkabekämpning som är till god hjälp för så väl veterinärer som stallägare.

I Sverige är tävlingsstall anslutna till Svensk Travsport skyldiga enligt Svensk travsports smittskyddsreglemente (Svensk Travsport, 2018) att hålla ett misstänkt eller konfirmerat kvarkastall isolerat 20 dygn efter den sista hästen hade feber och/eller nosflöde. Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) rekommenderar att man håller stallet isolerat i minst fyra till sex veckor efter sista sjukdomstecknet. Ett problem med dessa rekommendationer är att det inte fullt ut tar hänsyn till risken med subkliniska smittbärare.

Som stallägare kan man skydda sig mot att ta in smitta på sin gård genom att ha ett fungerande karantänstall med separata hagar där nya hästar får vara i minst tre veckor. Under karantäntiden

är det viktigt att monitorera hästarnas kroppstemperatur och att vara uppmärksam på eventuella sjukdomstecken samt att de personer som hanterar de nya hästarna håller god smittskyddshygien.

Efter ett kvarkautbrott är det viktigt att rengöra och desinficera de miljöer som sjuka hästar vistats i och att vara extra noga där luftvägssekret och böldmaterial kan finnas, till exempel vid vattenkoppar och krubbor. Även utrustning bör saneras. Om möjligt är det bra att låta de boxar och hagar som använts av sjuka hästar få stå tomma en tid, SVA rekommenderar 30 dagar.

### *Vaccination*

I länder utanför Sverige är det vanligt att vaccinera mot kvarka. Dock har det inte funnits något säkert vaccin på marknaden som gett ett fullgott, långvarigt skydd mot infektion. I Sverige är kvarka anmälningspliktigt vid misstanke och vid konfirmerade fall. Eftersom det hittills inte funnits något DIVA-vaccin (Differentiation of Infected from Vaccinated Animals) på marknaden har vaccinering inte varit en möjlighet då de tillgängliga vaccinerna gett utslag på tester för antikroppar mot kvarka.

Forskning att få fram ett vaccin baserat på rekombinanta proteiner som dessutom har DIVA-egenskaper har visat lovande resultat med skydd mot kvarka och få biverkningar (Robinson *et al.*, 2018).

## **Diagnostik**

### *Feber*

Veterinärer har använt sig av mätning av kroppstemperaturen som ett diagnostiskt verktyg sedan 1770. Hos häst är den vanligaste orsaken till feber infektion. Febern behöver inte vara konstant, vid många tillstånd är det vanligt med intermittent feber. Under en febertopp kan temperaturen gå upp med ca 0,75°C för att sedan följas av en temperatursänkning. I många fall kan den sänkningen vara ned till normaltemperatur. Febertopparna förekommer vanligast under eftermiddag och kväll och den lägsta temperaturen uppmäts oftast på morgonen, men individuell variation förekommer (Smith, 2014).

I en retrospektiv fall-kontroll studie av Duffee *et al.* (2015) sågs att bara 72 % av de 108 undersökta kvarkafallen haft feber som en del av symtombilden. Mediantemperaturen var 39,4°C och interquartile range i studien var 38,9°C till 40,0 °C.

## **Bakteriologi**

### *Odling*

Odling av provtagningsmaterial för att påvisa kvarka var länge gold standard men i takt med att nya mer sensitiva metoder utvecklas får bakteriell odling idag anses som ett komplement till diagnostiken (Newton *et al.*, 2000; Båverud *et al.*, 2007; Lindahl *et al.*, 2013b; Webb *et al.*, 2013; Waller, 2014).

Den främsta fördelen med odling är att det kan påvisa en pågående infektion eftersom det krävs levande bakterier för att få en positiv odling. Dock kan en negativ odling inte utesluta en infektion. Det kan bero på att provet kan ha tagits för tidigt i sjukdomsförloppet innan hästen

börjat utsöndra bakterier, att andra bakterier konkurrerat ned antalet *S. equi* i provtagningsmaterialet, att andra bakterier växt i odlingen vilket försvårar tolkningen samt att det krävs en högre koncentration av bakterier närvarande för att metoden ska få högre sensitivitet. *S. equi* kan ibland okulärt vara mycket svår att skilja från *S. zooepidemicus* vilket innebär att man ändå kan behöva komplettera med en PCR undersökning. Sedan är odling mer tidskrävande, det tar en till två dagar innan man har sitt odlingsresultat.

#### *PCR - polymerase chain reaction*

Realtids PCR även kallat kvantitativ PCR, qPCR på engelska anses idag vara gold standard vid kvarkadiagnostik. Metoden baseras på detektion av bakterie DNA har högre sensitivitet än odling (Newton *et al.*, 2000; Båverud *et al.*, 2007; Lindahl *et al.*, 2013b; Webb *et al.*, 2013; Waller, 2014).

Fördelarna med PCR är många, det är en snabb metod, man får svar inom någon timme. Eftersom metoden bygger på att valda DNA sekvenser amplifieras är sensitiviteten mycket hög, det krävs inte så mycket bakterier i provtagningsmaterialet för att få ett positivt resultat. Man kan skilja *S. equi* från *S. zooepidemicus*. En nackdel med metoden är att den inte skiljer på levande och döda bakterier vilket i avsaknad av synliga sjukdomstecken kan försvåra bedömningen om det är en pågående infektion, en aktiv subklinisk smittbärare eller en häst som tillfrisknat från sjukdom och de avdödade bakterierna råkade finnas kvar i provtagningsmaterialet. I de fallen kan odling användas som ett bra komplement till PCR. Metoden kan även ge falskt negativa resultat i de fall där man har en intermitterande smittutsöndring från luftsäckarna och förutsatt att provet inte tagits därifrån. Falska negativa kan även bero på att man tagit prov innan hästen börjat utsöndra bakterier. Metoden är även relativt dyr, framför allt om det är många hästar som ska tas prov ifrån, vilket kan bli en kännbar kostnad för djurägaren.

För att identifiera subkliniska smittbärare är den säkraste metoden att endoskopera och ta prov från luftsäckarna (Newton *et al.*, 1997).

Lindahl *et al.* (2013b) fann att genom att kombinera provtagningslokalisering och direkt analys med PCR eller i kombination med odling och sedan PCR kunde 90 % av fallen vid akut kvarka identifieras. Provtagningslokaliseringarna var nosskölj och nos- eller nasofarynxsvabb.

#### **Serologi**

När immunförsvaret stött på ett smittoämne producerar det antikroppar mot detta, vid serologisk diagnostik är det dessa antikroppar som mäts i serum. Antikropparna delas in i fem huvudklasser, IgG, IgM, IgE, IgA och IgD. De tar olika lång tid att bildas, och hur lång tid de persisterar i cirkulationen är beroende på vilken antikroppsklass de tillhör.

De kommersiella antikroppstest som finns för kvarka analyserar IgG (Boyle *et al.*, 2018).

En positiv antikroppstiter för kvarka innebär bara att hästen någon gång stött på bakterien, det kan inte avgöra om en infektion pågår. Vid parprover eller upprepad provtagning får man ytterligare diagnostisk information där man kan följa en trend för att se om titrarna ökar eller minskar.



Galan & Timoney (1985) kunde visa att sju dagar efter exponering hade hästarna förhöjda antikroppstitrar. En senare vaccinstudie (Timoney *et al.*, 2007) uppmätte de högsta antikroppstitrarna cirka fyra veckor efter exponering och att titrarna sedan avtog under de kommande tre till fyra månaderna. Antikroppar mot SeM var fortsatt förhöjda efter 200 dagar.

Ett problem vid serologisk kvarkadiagnostik har tidigare varit att ytproteinet SzM hos *S. zooepidemicus* som är homolog med SeM hos *S. equi* över C-terminalen korsreagerat i analysen. Detta kunde leda till missvisande provsvar (Kelly *et al.*, 2006). Genom att kombinera två iELISA för två olika ytstrukturer (Antigen A och C) som är unika för *S. equi* fann Robinson *et al.* (2013) att man fick en betydligt säkrare metod att identifiera hästar som exponerats för *S. equi*. Sensitiviteten och specificiteten blev då 93,3 % och 99,3 % jämfört med den SeM iELISA som de jämförde med, sensitivitet 89,9 % och specificitet 77,0 %.

Davidson *et al.* (2008) fann att serologi med iELISA för SeM inte gick att använda för att identifiera subkliniska smittbärare.

Boyle *et al.* (2009) undersökte om det fanns faktorer som ökade risken för att en frisk häst skulle ha förhöjda antikroppstitrar mot SeM och fann att äldre hästar, hästar vaccinerade mot *S. equi*, hästar från gårdar med stor hästomsättning, hästar från gårdar med kvarkahistorik, hästar som exponerats för kvarka och hästar som varit sjuk i kvarka hade en högre oddskvot.

### **Hematologi: LPK**

Något som kan förändras vid pågående inflammation och/eller infektion är blodbilden hos det drabbade djuret. Det är vedertaget inom veterinärmedicin att vid diagnostik avseende inflammation eller infektion undersöka hur den totala vita blodbilden och de olika fraktionerna förhåller sig till varandra. Den röda blodbilden kan även den vara påverkad men det berörs inte i denna studie. Totalantalet vita blodkroppar även känt som leukocytpartikelkoncentration (LPK), består mestadels av neutrofiler, därpå lymfocyter och minst monocyter, eosinofiler och basofiler. Genom att analysera förhållandet mellan dessa i ett så kallat leukogram, kan man få ytterligare diagnostisk och prognostisk information. Totalantalet och förhållandet mellan leukocyterna förändras vid olika fysiologiska och patologiska tillstånd. Andra faktorer som påverkar är ålder, kön, ras, kraftig fysisk ansträngning och dräktighet.

Nyfödda friska föl har andra förhållanden mellan sina vita blodkroppar än vuxna individer, men vid 3-4 månaders ålder har de samma referensvärden (Welles, 2010). Små skillnader mellan ston, valacker och hingstar finns rapporterade, ston har ett något högre totalantal leukocyter. Kraftig fysisk ansträngning kan ge tillfälliga förändringar i blodbilden som beror på förändrade nivåer av adrenalin och kortisol (Grondin & Dewitt, 2010). Fysiologisk leukocytos är en övergående måttlig ökning av LPK, (12,000-25,000/ $\mu$ L) som varar 20-30 minuter (Welles, 2010).

Blodbilden analyseras på blod med EDTA-tillsats med hjälp av ett hematologi laboratorieinstrument eller genom manuell differentialräkning av laboratoriepersonal. Det vanligaste sättet att analysera blodbilden är med hjälp av laboratorieinstrument, vilket i de allra flesta fall ger ett tillförlitligt värde, är snabbt, lättillgängligt och kan analyseras av de flesta personer med adekvat upplärning. Laboratorieinstrumenten kan ha olika referensvärden beroende på hur de är

kalibrerade. Som alla maskiner har de sina begränsningar och beroende på analysmetoden kan de ibland klassa de olika blodkropparna fel eller inte få fram något giltigt värde alls. Men för att analysera den totala vita blodbilden utan de olika fraktionerna är laboratorieinstrument ett fullgott alternativ. För att få en så exakt skattning av blodbilden som möjligt kan en manuell differentialräkning vara att föredra. Detta är dock mer kostsamt och tidskrävande eftersom det kräver laboratoriepersonal med särskild kompetens. Vid manuell differentialräkning bör man göra blodutstryket så snart som möjligt efter provtagning.

Antikoagulantian EDTA som tillsats till blodprovet lämpar sig bäst vid analys av blodbilden eftersom blodkropparna behåller sin naturliga morfologi bättre jämfört med övriga anti-koagulantia. Blodprovet bör analyseras så snart som möjligt, efter 24 timmar kan man se tydliga förändringar på blodkropparna och ju längre tid som går desto större är risken att man få felaktiga mätresultat som följd (Welles, 2010).

Normalt referensvärde för totalantal leukocyter hos friska vuxna hästar är 5,400-14,300/ $\mu\text{L}$  för varmblodiga raser och 6,000-12,000/ $\mu\text{L}$  för kallblodiga raser (Grondin & Dewitt, 2010). Vid stegring av totalantalet leukocyter kan man klassificera lymfocytosen från lindrig till extremt kraftig. Welles (2010) anger 14,000-20,000/ $\mu\text{L}$  som måttlig, 20,000-30,000/ $\mu\text{L}$  som kraftig och >30,000/ $\mu\text{L}$  som extremt leukocytos. Vid sänkt totalantal leukocyter (lymfopeni), är det oftast en följd av neutropeni. Neutropeni beror generellt på kraftiga akuta sjukdomar, där neutrofilerna förbrukas i större hastighet än de hinner rekryteras (Welles, 2010).

Hamlen *et al.* (1992) undersökte hur hematologiska parametrar förhöll sig i två grupper av föl, den ena kliniskt positiv för kvarka och den andra negativ. Blodprover togs 0, 2, 4, 6, och 10 veckor efter att fölen exponerats för ett experimentellt infekterat föl. De fann en signifikant skillnad med högre LPK värde i den kvarkapositiva gruppen vid två och fyra veckor efter exponering. Denna ökning var även associerad med en ökning av veckomedian hälsoindexet för studien (högre index = gravare symtom av kvarka).

Ijaz *et al.* (2012) rapporterade ett signifikant högre LPK medelvärde hos kvarkainfekterade hästar jämfört med friska, vecka ett, två och tre efter infektion. Vid de tre mättillfällena varierade LPK medelvärdet från 12,800/ $\mu\text{L}$  ( $\pm 160$  SE) till 14,990/ $\mu\text{L}$  ( $\pm 220$  SE) hos de kvarkainfekterade hästarna.

Även Neamat-Allah & El-Damaty (2016) kunde se ett signifikant högre LPK värde hos kvarkainfekterade arabhästar (9,860/ $\mu\text{L}$   $\pm 90$  SE) jämfört med friska (6,060/ $\mu\text{L}$   $\pm 160$  SE).

### **Serologiska inflammationsmarkörer**

Serologiska inflammationsmarkörer mer känt som akutfasproteiner eller APP:s från engelskans Acute-Phase Protein, är proteiner som ökar vid inflammationsstimuli i kroppen. Petersen *et al.* sammanfattar i sin review-artikel från 2004 att APP bildas som en respons på skada och att det är en tidig ospecifik försvarsmekanism innan ett specifikt immunsvaret uppstår. Proinflammatoriska cytokiner bildas främst av monocyter där skadan uppstår vilket i sin tur stimulerar leverns hepatocyter att syntetisera APP. APP:s klassificeras utifrån om de ökar eller minskar vid ett akutfasvar och i vilken utsträckning. Positiva APP:s delas in i major, moderate och minor och det finns djurslagsskillnader i indelningen. Major APP:s har normalt en låg till

omätbar basnivå, stiger snabbt vid ett inflammatoriskt stimuli, över tio gånger normalvärdet, och återgår relativt snabbt till basvärdet vid tillfrisknande. Moderate APP:s ökar en till tio gånger normalvärdet och har normalt sett en mätbar basnivå, de tar något längre tid på sig att stiga vid inflammation och detsamma gäller när de återgår till normalnivån. Minor APP:s ökar endast med en halv gång till det dubbla av normalvärdet vilket generellt sett inte gör dem lämpade som diagnostiska inflammationsmarkörer. Alla akutfasproteinens syfte och funktion är ännu inte helt kartlagda och mer forskning inom ämnet behövs. Fördelarna med APP i ett diagnostiskt syfte är att de är relativt stabila, klarar av frysning och inte nämnvärt påverkas av stress och kortisonbehandling, dock förekommer undantag.

### *Serum Amyloid A - SAA*

Serum Amyloid A (SAA) är till dags dato det enda major akutfasprotein man funnit på häst (Pepys *et al.*, 1989; Jacobsen & Andersen, 2007). Jämfört med övriga beskrivna akutfasproteiner hos häst har SAA högst sensitivitet (Pepys *et al.*, 1989; Nunokawa *et al.*, 1993; Hultén & Demmers, 2002; Hultén *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004; Hooijberg *et al.*, 2014) vilket gör det attraktivt som potentiell inflammationsmarkör för olika tillstånd.

SAA är ett apolipoprotein som i blodet främst är bundet till high density lipoprotein (HDL) (Benditt & Eriksen, 1977; Husebekk *et al.*, 1986). Hultén *et al.* (1997) kunde i sin studie visa att SAA förekommer i tre isomerer. Dess biologiska funktion är inte helt känd men studier har visat att det bland annat deltar i immunoregleringen. Där har SAA en inhiberande effekt på feber och på neutrofiler och deras förmåga att frisläppa "oxidative burst". SAA har kemotaktisk effekt på monocyter, granulocyter och T-celler och in vitro har en inhiberande effekt på immunsvaret setts. SAA kan inducera kalciummobilisering hos monocyter och inhibera trombocytaktivering. I lipoproteinmetabolismen hjälper SAA till att transportera kolesterol från döende celler till hepatocyterna (Thomas, 2000; Petersen *et al.*, 2004).

SAA produceras främst i levern av hepatocyterna när de får stimulering av proinflammatoriska cytokiner. Det som har störst påverkan på SAA koncentrationen i blodet hos häst är därmed leverns förmåga att syntetisera SAA vid ett inflammatoriskt stimuli (Pepys *et al.*, 1989; Nunokawa *et al.*, 1993; Stoneham *et al.*, 2001; Hultén & Demmers, 2002; Hultén *et al.*, 2002; Petersen *et al.*, 2004). Men flera studier hos andra djurslag inklusive människa har kunnat visa på extrahepatisk produktion av SAA.

SAA:s normala värde i blodet hos friska hästar är lågt till omätbart (Pepys *et al.*, 1989; Hultén *et al.*, 1999b; Jacobsen *et al.*, 2006), mellan 0-5 mg/L, referensvärdet kan variera mellan de olika mätmetoderna. Hos föl under den första levnadsveckan och för ston tre dagar post partum upp till en månad efter nedkomst har förhöjda SAA värden uppmätts (Nunokawa *et al.*, 1993; Stoneham *et al.*, 2001). Då SAA är ett major akutfasprotein kan dess värde öka med över tio gånger det normala.

Vid en inflammation tar det cirka två till tre dagar för SAA att nå sitt högsta värde (Pepys *et al.*, 1989; Nunokawa *et al.*, 1993; Hultén *et al.*, 1999b). Hur stor SAA stegringen blir beror på hur stort det inflammatoriska stimuli är. Flera studier har visat att SAA ökar markant vid akuta bakteriella infektioner men även vid viroser (Pepys *et al.*, 1989; Hultén *et al.*, 1999b; a; Stoneham *et al.*, 2001; Hultén & Demmers, 2002; Belgrave *et al.*, 2013). Andra inflamma-

toriska tillstånd som till exempel vävnadsskada efter kirurgi, ledinflammation eller tarminflammation ger även de förhöjda SAA värden men i en mindre grad (Pepys *et al.*, 1989; Hultén *et al.*, 1999b, 2002; Jacobsen *et al.*, 2006; Westerman *et al.*, 2015). Små stegringar av SAA i intervallet 5–30 mg/L kan vara utlösta av en intramuskulär injektion, intensiv träning med mera och behöver inte betyda att en infektion är orsaken (Lilliehöök, I., Professor vid Institutionen för kliniska vetenskaper; enheten för klinisk kemi, pers.medd., 2018-03-28).

Jacobsen *et al.* (2006) sammanställde i sin diskussion att SAA:s halveringstid i plasma som uppmätts hos laboratoriedjur i flera studier är 30 minuter till två timmar. Vidare diskuterade de att denna egenskap hos SAA gör den väl lämpad för att övervaka graden av inflammation hos ett djur, eftersom att SAA sjunker relativt fort då levern slutat att syntetisera SAA. Studier har uppgett att det tar cirka sju dagar till fyra veckor för SAA att återgå till normalnivån efter ett inflammationsstimuli upphört (Pepys *et al.*, 1989; Nunokawa *et al.*, 1993). Flera studier har visat ett positivt samband mellan SAA värdet och graden av kliniska sjukdomstecken och därmed dess potential för att övervaka ett sjukdomsförlopp (Hultén *et al.*, 1999a; Hultén & Demmers, 2002; Jacobsen *et al.*, 2005; Hobo *et al.*, 2007; Belgrave *et al.*, 2013; Hooijberg *et al.*, 2014).

Hobo *et al.* utformade 2007 en studie där de ville undersöka SAA som potentiell markör för bakteriell pneumoni genom att experimentellt infektera en grupp hästar med *S. zooepidemicus*. I sin studie fann de att serumnivåerna av SAA hos den infekterade gruppen följde graden av kliniska tecken jämfört med den friska kontrollgruppen som hade låga SAA värden.

Westerman *et al.* (2015) undersökte sambandet mellan SAA värdet vid tiden för inskrivning på hästkliniken och en ökad risk för att drabbas av komplikationer eller avlivning under sjukhusvistelsen, men fann att något sådant samband inte fanns. Deras slutsats var att upprepade prover av SAA-värdet sannolikt är mer informativt för att övervaka sjukdomsförloppet och för att förutspå prognos än ett enskilt mätvärde.

Hultén *et al.* (1999b) rapporterade att det fanns individuella skillnader i SAA svaret hos de hästar som utsatts för samma kirurgiska vävnadstrauma. Där några individer hade ett bifasiskt SAA svar med en andra SAA-värdes topp några dagar efter den första som inte verkade korrelera med ökad klinisk inflammation eller komplikationer.

I denna studie användes en immunoturbidometrisk metod för analys av SAA via ett automatiserat kemiinstrument. Immunologiska metoder har alltid en relativt hög imprecision. Inomkörningsvariationen och mellankörningsprecisionen (CV%) för serumprover från häst är oftast mellan 5–10% för värden >5mg/L. Vid mätresultat <5mg/L kan imprecisionen vara betydligt högre (Lilliehöök, I., Professor vid Institutionen för kliniska vetenskaper; enheten för klinisk kemi, pers.medd., 2018-03-28).

En studie fann att SAA koncentrationen i hästserum minskade signifikant efter 48 och 72 timmars förvaring i rumstemperatur (Rendle *et al.*, 2009) medan en annan studie rapporterade att SAA koncentrationen var stabil i 17 dagar och att ingen skillnad mellan att förvara proverna i kyl (4°C) eller i rumstemperatur (22°C) kunde ses (Hillström *et al.*, 2010).

I en studie av bovint SAA och dess stabilitet vid förvaring sågs en signifikant minskning av SAA koncentrationen vid frysförvaring i -18°C (Tóthová *et al.*, 2012).

SAA anses stabilt över tid vid frysförvaring, men författaren till denna studie har inte hittat någon artikel som specifikt undersökt ekvint SAA:s stabilitet vid frysförvaring. En studie (Jacobsen *et al.*, 2006) använde sig av frysta SAA prover som var upp till ett år gamla när de utvärderade en human immunoturbidometrisk analys metod, samma som använts i denna studie, och de ansåg sina resultat som valida. Dock diskuterade de aldrig frysförvaringen och vilken eventuell påverkan detta kan ha haft på deras resultat.

Pepys *et al.* (1989) rapporterade i sin studie att det fanns hästar som exponerats för *S. equi* som inte insjuknat och inte heller hade förhöjda SAA nivåer.

Flera studier har tittat på SAA:s samstämmighet med övriga inflammationsmarkörer. Belgrave *et al.* (2013) hade i sin studie en mycket svag positiv korrelation mellan SAA, fibrinogen och LPK medan en svag negativ korrelation mellan SAA och albumin:globulin kvoten kunde påvisas. Nunokawa *et al.* (1993) fann en positiv korrelation mellan förhöjt SAA-värde och förhöjt CRP, men konkluderade att SAA var mer sensitivt för att diagnostisera inflammation hos häst. Hultén & Demmers (2002) fann att fölen i deras studie hade signifikant förhöjda SAA- och fibrinogenvärden i gruppen med bakteriell infektion men att ingen statistisk skillnad i LPK eller neutrofilkoncentration mellan gruppen med bakteriell infektion och den övriga gruppen kunde ses. Hooijberg *et al.* (2014) såg att SAA var den inflammationsmarkör som hade högst precision att diagnostisera inflammation hos häst av serumjärn, fibrinogen, LPK och totalantal neutrofiler.

### *Fibrinogen*

Fibrinogen är hos häst en moderate APP och dess funktion i kroppen är som prekursor i hemostasen och det verkar även som ett förstadium för reparation efter vävnadsskada (Thomas, 2000).

Fibrinogen cirkulerar normalt i blodet och har ett normalvärde på 100-400 mg/dl (Grondin & Dewitt, 2010).

Fibrinogenvärdet ökar i blodet vid inflammation, under dräktighet och vid partum. Vid disseminerad intravasal koagulation (DIC) går värdet ned då fibrinogen förbrukas (Thomas, 2000).

Fibrinogen når sitt högsta värde två till fem dagar efter att inflammationsstimulit introducerats (Hultén *et al.*, 2002; Hobo *et al.*, 2007).

Belgrave *et al.* (2013) fann att sensitiviteten och specificiteten för fibrinogen att kunna diagnostisera en häst med ett pågående inflammatoriskt tillstånd var 59 % respektive 51 %.

Hobo *et al.* (2007) jämförde hur fibrinogen och SAA förhöll sig hos en grupp hästar med experimentellt inducerad pneumoni och fann att fibrinogen-värdet inte alls följde sjukdomsförloppet i samma grad som SAA. Fibrinogen var fortfarande förhöjt cirka en vecka efter att SAA-värdet och de kliniska tecknen avtagit.

Hamlen *et al.* (1992) undersökte bland annat hur fibrinogen förhöll sig i två grupper av föl, den ena kliniskt positiv för kvarka och den andra negativ. Blodprover togs 0, 2, 4, 6, och 10 veckor efter att fölen exponerats för ett experimentellt infekterat föl. De fann en signifikant skillnad med högre fibrinogenvärde i den kvarkapositiva gruppen vid två och fyra veckor efter exponering, 1,6 - 1,9 gånger så högt värde som i den negativa gruppen. Denna ökning av fibrinogenvärdet var även associerad med en ökning av veckomedian hälsoindexet för studien (högre index = gravare symtom av kvarka). Ijaz *et al.* (2012) kunde även i sin studie se ett signifikant högre fibrinogenvärde hos kvarkainfekterade hästar jämfört med friska, cirka två gånger så högt.

Hultén & Demmers (2002) såg i sin studie att de föl som hade en bakteriell infektion hade högre fibrinogenvärden i akutskedet än de föl i studien som hade en icke-bakteriell infektion eller oklar diagnos. 6,6 g/L i medelvärde hos gruppen med bakteriell infektion jämfört med den andra gruppen 3,5 g/L.

Vid experimentellt inducerad aseptisk ledinflammation kunde förhöjda serumnivåer av fibrinogen uppmätas, vilket visar att lokala processer kan ge utslag systemiskt (Hultén *et al.*, 2002).

### *Haptoglobin*

Haptoglobin är hos häst en moderat APP vars funktion är att binda fritt hemoglobin i blodet. Dess värde kan sjunka vid en hemolytisk anemi eller vid ett massivt hematom. Vid ett inflammationsstimuli ökar värdet inom 24 till 48 timmar. Ökade haptoglobinvärden kan även ses vid akut och kronisk gräsbetessjuka (Thomas, 2000). Föl har förhöjda haptoglobinvärden upp till ett års ålder och ston har förhöjda värden fyra månader pre-partum och upp till en månad post-partum (Taira *et al.*, 1992). Haptoglobinkoncentrationen i serum förblir stabil vid förvaring i rumstemperatur i upp till tre veckor och i minst sex månader vid frysförvaring i -26°C (Kent & Goodall, 1991). I Sverige finns idag ingen kommersiellt tillgänglig tillförlitlig analysmetod av haptoglobin.

Westerman *et al.* (2015) fann att SAA och haptoglobinnivåerna var signifikant högre hos hästar med inflammatoriska tillstånd. De menade att utvärdering av haptoglobinkoncentrationen i ett kliniskt sammanhang skulle vara mest användbart för att utvärdera kroniska inflammationstillstånd.

Vid experimentellt inducerad aseptisk ledinflammation var haptoglobinkoncentrationen 1,14 gånger högre än baslinjenivåerna hos de undersökta hästarna (Hultén *et al.*, 2002).

### *Serumjärn*

Serum- eller plasmajärn är en negativ inflammationsmarkör som sjunker under akutfasen för att minska tillgängligheten av järn för bakterier och därmed inhibera deras tillväxt. Hypoferremi är inte specifikt för akutfasreaktionen utan kan vara orsakat av anemi av andra orsaker än inflammation till exempel blödning (Smith, 2014).

Borges *et al.* (2007) kunde visa att sensitiviteten för serumjärn att påvisa systemisk inflammation var högre än för fibrinogen, 90 % jämfört med 82 %. Skiljekriteriet för att klassas som hypoferremi var ett värde under 105µg/dL.

Hooijberg *et al.* (2014) utvärderade olika rutindiagnostest på häst som finns för att utvärdera inflammation och fann att efter SAA var serumjärn näst känsligast för att påvisa systemisk inflammation.

Serumjärnkonzentrationen var avsevärt lägre hos de hästar med en kraftigare inflammation efter kastration än de som inte hade en uttalad inflammation, denna skillnad sågs åtta dagar efter ingreppet. Detta indikerar att serumjärn kan användas för att monitorera graden av inflammation (Jacobsen *et al.*, 2005).

### *Albumin*

Albumin är det vanligaste plasmaproteinet i blodet och dess funktion är att transportera molekyler och joner, reglera det kolloidosmotiska trycket samt vara en källa av aminosyror för vävnaden. Albumin produceras av levern. Albuminvärdet ökar relativt vid dehydrering och det är den vanligaste orsaken till hyperalbuminemi. För att utvärdera en sänkning av albumin är den säkraste metoden att räkna ut rationen mellan albumin och totalantalet globuliner. Albumin fungerar som ett negativt akutfasprotein, det vill säga att vid inflammation ses en hypoalbuminemi. När hypoalbuminemin är ett akutfassvar bör man även se förhöjda koncentrationer av globuliner. Hypoalbuminemi i kombination med normal eller ökad globulinkonzentration beror generellt på en ökad förlust av albumin, att albumin träder ut extravaskulärt eller på grund av nedsatt albuminproduktion. Hypoalbuminemi i kombination med sänkta globulinnivåer kan bero på övervätskning t.ex. vid intravenös dropptterapi, akut blodförlust, exsudativ lesion eller protein-losing enteropati (Thomas, 2000).

Vid kvarkainfektion hos häst kunde Ijaz *et al.* (2012) se ett signifikant lägre albuminvärde, cirka 30 %, hos kvarkainfekterade hästar jämfört med friska. Neamat-Allah & El-Damaty (2016) fick även de i en liknande studie ett signifikant lägre albuminvärde, cirka 20 % lägre jämfört med friska arabhästar.

## MATERIAL OCH METODER

### Hästar i studien

I ursprungsstudien av Tscheschlok *et al.* (2018) undersöktes 112 nyligen avvanda varmbloodsföl i åldern 7-10 månader under hösten 2014 till och med mars 2015 på stuteri Lewitz i Tyskland. De var grupperade utifrån kön och gick i separata hagar med vindskydd, men nos-till-noskontakt mellan grupperna kunde förekomma. I början av hösten 2014 efter avvänjning började flera av fölen att uppvisa kliniska tecken på kvarka vilket sedan spreds till allt fler individer i de två grupperingarna. Inga åtgärder för att begränsa smittspridningen inom grupperna gjordes, utan smittspridningen och sjukdomsförloppet fick ha sin naturliga gång tills hästarna tillfrisknade. Syftet var att observera och ta prover från hästarna från det akuta insjuknandet till tillfrisknande och undersöka utvecklingen av eventuella subkliniska smittbärare. Ingen av hästarna fick antibiotikabehandling för sin kvarka. Personalen på gården såg till hästarna varje dag och de blev regelbundet undersökta och provtagna av veterinär.

I denna studie om SAA och kvarka valdes de hästar ut som det fanns ett SAA-prov för vid sista provtagningen i mars 2015. Detta resulterade i 98 stycken individer, 44 stycken hingstar och 55 stycken ston, vars redan insamlade data undersöktes retrospektivt.

### Klinisk undersökning och provtagning

I mitten av november 2015 när utbrotten föreföll att ha nått sin kulmen genomgick alla hästar i studien en klinisk undersökning, det togs blodprov och nössvabbprov tagna ca 15 cm upp i nosen med hjälp av amies kolat transportmedium (Swab, Amies-Coal; Sarstedt AG&Co 51588 Nümbrecht, Germany). Engångshandskar användes vid nössvabbstagningen och de byttes inför varje ny individs provtagning. I december genomgick hästarna ännu en klinisk undersökning och blodprovstagning. Vid den sista provtagningen i mars 2015 genomgick hästarna ännu en klinisk undersökning och blodprov togs. Den bakteriella undersökningen utökades utöver nössvabb även med sköljprov från nos och luftsäckar för odling och PCR. Sköljprovet från luftsäckarna togs med hjälp av endoskop.

### Analys av prover

#### *Bakteriologi: Odling och PCR*

Odling och qPCR avseende *Streptococcus equi* subspecies *equi* och *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus*.

#### *Serologi*

Serumproverna analyserades efter förvaring i -20°C med en optimerad ELISA som undersöker både antigen A (SEQ\_2190) och Antigen C (SeM) (Robinson *et al.*, 2013).

#### *Hematologi: LPK*

LPK analyserades med Sysmex KX-21N; Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Tyskland.

#### *SAA*

Serumproverna analyserades på klinisk kemiska laboratoriet vid Universitets Djursjukhuset (UDS) i Uppsala under februari 2018 efter förvaring i -20°C, med ett automatiserat kemiinstrument Architect c4000 från Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA.



Analysmetoden är en immunoturbidometrisk metod, LZ test SAA från Eiken Chemicals Co, Ltd, Tokyo, Japan.

## **Bearbetning**

Bearbetning av rådata skedde i Microsoft Office Excel innan data exporterades till IBM SPSS Statistics version 24. Från ursprungsrådata i Excel plockades data ut från tre undersökningstillfällen som det fanns sparade serumprover från. Detta inkluderade data om feber, LPK, serologi för antigen A och C, samt bakteriologi (odling och PCR) avseende *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Detaljerade data från de kliniska undersökningarna utelämnades för att begränsa materialet. De 14 individer som det inte fanns ett separat serumprov för från den sista provtagningen i mars 2015 exkluderades ur studien.

I SPSS kodades vissa variabler om för att möjliggöra vidare analys. Feber, SAA och LPK, Antigen A och C kodades om till dikotoma variabler. Serologi och LPK kodades om till trikotoma variabler och SAA kodades även om till en polytom variabel. Saknade värden fick en egen kodning 999. Vid sista provtagningen i mars 2015 togs tre olika PCR prov för *S. equi* från samma individ. Det sammanlagda resultatet från de provtagningarna bildade en ny variabel, positiv för *S. equi* på  $\geq 1$  av PCR proven.

De hypoteser som studien ville pröva var om det fanns ett samband mellan att vara positiv för *S. equi* och samtidigt ha ett förhöjt SAA värde i den akuta sjukdomsfasen samt för subkliniska smittbärare. Hur överensstämde SAA värdet med de övriga inflammationsmarkörerna feber och LPK? Hur påverkades SAA värdet om hästen var positiv för *S. zooepidemicus*? Och påverkades SAA värdet om hästen hade serokonverterat för *S. equi*:s antigen A och/eller C?

## **Statistisk analys**

Till den deskriptiva och analytiska statistiken användes IBM SPSS Statistics version 24. Shapiro-wilks test användes för att bedöma om data var normalfördelad inför vidare analyser. I analyserna ansågs ett P-värde  $<0,05$  vara signifikant. Mann-Whitney-test utfördes för att utvärdera medelvärdesskillnader i SAA-värden mellan gruppen PCR positiv och negativ för *S. equi*. För jämförelse mellan skillnader av samma variabel mellan två grupper utfördes McNemar-test. Sensitivitet och specificitet kalkylerades för att utvärdera de enskilda variabelernas potential att indikera en potentiell kvarkainfektion.

## RESULTAT

### Bakteriologi: PCR

Här redovisas resultaten från PCR provtagningarna vid de tre provtillfällena eftersom att i samtliga fall var sensitiviteten för PCR provtagningen högre än för bakteriell odling. Ingen häst var positiv på sin bakterieodling för *S. equi* utan att samtidigt vara positiv på PCR. För att åskådliggöra detta presenteras även odlingspositiva i tabell 2a och 2b november 2014, vilket var den provtagning med flest positiva på odling.

Vid den första provtagningen i november 2014 togs prov på samtliga 98 individer avseende bakteriologi för *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Totalt var 45 (46 %) av 98 individer PCR positiva för *S. equi*. I gruppen som var PCR positiv för *S. equi* var 35 (77,8 %) samtidigt positiv för *S. zooepidemicus*. I gruppen som var PCR negativ för *S. equi* var 53 (100 %) samtidigt positiv för *S. zooepidemicus*.

Vid den sista provtagningen i mars 2015 utökades den bakteriella provtagningen för att kunna påvisa eventuella subkliniska smittbärare, resultatet för PCR provtagningen för *S. equi* är sammanställt i tabell 1. 15 (15,3 %) var PCR positiva för *S. equi* på en eller flera av provtagningsmetoderna och dessa utgjorde sedan den totala gruppen som jämförelser mot *S. zooepidemicus* och övriga variabler gjordes. I den PCR positiva gruppen för *S. equi* var 9 (60 %) positiva för *S. zooepidemicus* på nossvabb, 13 (86,7 %) på nosskölj och 11 (73,3 %) på luftsäcksskölj. I den PCR negativa gruppen för *S. equi* var 46 (55,4 %) positiva för *S. zooepidemicus* på nossvabb, 83 (100 %) på nosskölj och 58 (70,7 %) på luftsäcksskölj. Bland luftsäckssköljproverna i den negativa gruppen saknades prov för en individ och det är valid procent som presenteras.

Tabell 1. Mars 2015 PCR *S. equi*

	Frekvens (valid %)		Antal (%)	Saknas (%)
	PCR positiv	PCR negativ		
<b>Positiv på ≥1 av provmetoderna nedan</b>	15 (15,3%)	83 (84,7%)	98 (100%)	
<b>Nossvabb</b>	2 (2%)	96 (98%)	98 (100%)	
<b>Nosskölj</b>	9 (9,2%)	89 (90,8%)	98 (100%)	
<b>Luftsäcksskölj</b>	10 (10,3%)	87 (89,7%)	97 (99%)	1 (1%)

Ingen av hästarna som testade positivt uppvisade synliga kliniska tecken på kvarka. Av de som var positiv på nossvabb var en negativ på övriga prov. Fyra av nossköljningarna var inte positiv på luftsäcksskölj och fem av luftsäckssköljningarna var inte positiv på nosskölj.

## Serologi, LPK, SAA och förekomst av feber

Resultaten för SAA, LPK, förekomst av feber och serologi från de tre provtagningarna i november och december 2014 samt mars 2015 är presenterade i tabell 2a-4a. Resultaten har grupperats utifrån om individen testats positiv för *S. equi* på PCR i provtagningen i november 2014 respektive mars 2015. För proverna tagna i mars 2015 klassades individen som positiv om den testats positivt på ett eller flera av provtagningsmetoderna. Resultaten för medelvärde, median, minimivärde och maxvärde är presenterade i tabell 2b-4b.

Tabell 2a. November 2014, Odling och PCR för *S. equi* jämfört med SAA, LPK, Feber och Serologi

Variabel	Frekvens (valid %)				Antal (%)	Saknas (%)
<b>SAA mg/L</b>	0–5 (inom referensområdet)	5,1–250 (lindrigt -måttligt förhöjt)	250,1–899 (måttligt - kraftigt förhöjt)	>900 (mycket kraftigt förhöjt)		
<i>Odling+</i>	12 (85,7%)	0	2 (14,3%)	0	14 (100%)	0
<i>PCR+*</i> <sup>1</sup> <sup>2</sup>	34 (82,9%)	2 (4,9%)	2 (4,9%)	3 (7,3%)	41 (91,1%)	4 (8,9%)
<i>PCR-*</i> <sup>1</sup> <sup>2</sup>	36 (81,8%)	4 (9,1%)	4 (9,1%)	0	44 (83%)	9 (17%)
<b>LPK 10<sup>3</sup>/μL</b>	<5400 (under referensvärdet)	5400–14000 (normalt)	>14 000 (förhöjt)			
<i>Odling+</i>	0	9 (64,3%)	5 (35,7%)		14 (100%)	0
<i>PCR+</i>	0	31 (68,9%)	14 (31,1%)		45 (100%)	0
<i>PCR-</i>	1 (1,9%)	39 (73,6%)	13 (24,5%)		53 (100%)	0
<b>Feber</b>	<i>Feber</i>	<i>Feberfri</i>				
<i>Odling+</i>	2 (14,3%)	12 (85,7%)			14 (100%)	0
<i>PCR+</i>	9 (20%)**	36 (80%)			45 (100%)	0
<i>PCR-</i>	8 (15,1%)**	45 (84,9%)			53 (100%)	0
<b>Serologi</b>	<0,3 negativ	0,3–0,49 misstänkt positiv	>0,5 serokonverterat			
<b>Antigen A</b>						
<i>Odling+</i>	5 (35,7%)	1 (7,1%)	8 (57,1%)		14 (100%)	0
<i>Antigen A PCR+</i>	13 (29,5%)	4 (9,1%)	27 (61,4%)		44 (97,8%)	1 (2,2%)
<i>Antigen A PCR-</i>	22 (42,3%)	8 (15,4%)	22 (42,3%)		52 (98,1%)	1 (1,9%)
<b>Antigen C</b>						
<i>Odling+</i>	14 (100%)				14 (100%)	0
<i>Antigen C PCR+</i>	44 (100%)				44 (97,8%)	1 (2,2%)
<i>Antigen C PCR-</i>	51 (98,1%)	1 (1,9%)			52 (98,1%)	1 (1,9%)

\*<sup>1</sup>McNemar test visade på en signifikant skillnad ( $p < 0,0001$ ) i resultaten av att ha normalt SAA (<5mg/L) och att ha ett förhöjt SAA (>5mg/L) mellan gruppen PCR+ och PCR-.

\*<sup>2</sup>McNemar test visade på en signifikant skillnad ( $p < 0,001$ ) i resultaten av att ha normalt-måttligt förhöjt SAA (0–250 mg/L) och att ha ett måttligt-kraftigt förhöjt SAA (>250 mg/L) mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Temperatur >38,2 °C klassades som feber. \*\*McNemar test visade på en signifikant skillnad ( $p < 0,0001$ ) i resultaten mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Tabell 2b. November 2014, Odling och PCR för *S. equi* jämfört med SAA, LPK och Feber

Variabel		Median	Medelvärde	Min. värde	Maxvärde
<b>SAA mg/L*</b>	<i>Odling+</i>	0,12	50,2	0,0	445,9
	<i>PCR+</i>	118,8	0,0	0,0	1500
	<i>PCR-</i>	0,08	54,3	0,0	569,3
<b>LPK 10<sup>3</sup>/μL</b>	<i>Odling+</i>	12 500	13 307	7400	22 500
	<i>PCR+</i>	12 658	12 400	5600	24 900
	<i>PCR-</i>	11 400	11 906	1100	22 900
<b>Feber °C</b>	<i>Odling+</i>	38,0	38,0	37,6	38,5
	<i>PCR+</i>	38,02	38,0	37,5	38,8
	<i>PCR-</i>	37,987	38,0	37,3	39,5

\*Mann-Whitney test kunde inte påvisa någon signifikant medelvärdesskillnad i SAA mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Tabell 3a. December 2014, PCR resultat för *S. equi* från november jämfört med SAA, LPK, Feber och Serologi

Variabel	Frekvens (valid %)				Antal (%)	Saknas (%)	
<b>SAA mg/L</b>	<i>0–5 (inom referensområdet)</i>	<i>5,1–250 (lindrigt -måttligt förhöjt)</i>	<i>250,1–899 (måttligt - kraftigt förhöjt)</i>	<i>&gt;900 (mycket kraftigt förhöjt)</i>			
	<i>PCR+*</i> <sup>1</sup> <sup>2</sup>	38 (84,4%)	4 (8,9%)	1 (2,2%)	2 (4,4%)	45 (100%) 0	
	<i>PCR-*</i> <sup>1</sup> <sup>2</sup>	44 (86,3%)	6 (11,8%)	1 (2%)		51 (96,2%) 2 (3,8%)	
<b>LPK 10<sup>3</sup>/μL</b>	<i>&lt;5400 (under referensvärdet)</i>	<i>5400–14000 (normalt)</i>	<i>&gt;14 000 (förhöjt)</i>				
	<i>PCR+</i>	40 (88,9%)	5 (11,1%)		45 (100%)		
	<i>PCR-</i>	50 (94,3%)	3 (5,7%)		53 (100%)		
<b>Feber</b>	<i>Feber</i>	<i>Feberfri</i>					
	<i>PCR+</i>	11 (24,4%)**	34 (75,6%)		45 (100%)		
	<i>PCR-</i>	14 (26,4%)**	39 (73,6%)		53 (100%)		
<b>Serologi</b>	<i>&lt;0,3 negativ</i>	<i>0,3–0,49 misstänkt positiv</i>	<i>&gt;0,5 serokonverterat</i>				
	<b>Antigen A PCR+</b>	13 (28,9%)	1 (2,2%) 31 (68,9%)		45 (100%)		
	<b>Antigen A PCR-</b>	21 (39,6%)	5 (9,4%) 27 (50,9%)		53 (100%)		
	<b>Antigen C PCR+</b>	45 (100%)				45 (100%)	
	<b>Antigen C PCR-</b>	50 (94,3%)	2 (3,8%) 1 (1,9%)		53 (100%)		

\*<sup>1</sup>McNemar test visade på en signifikant skillnad ( $p < 0,00001$ ) i resultaten av att ha normalt SAA (<5mg/L) och att ha ett förhöjt SAA (>5mg/L) mellan gruppen PCR+ och PCR-.

\*<sup>2</sup>McNemar test visade på en signifikant skillnad ( $p < 0,001$ ) i resultaten av att ha normalt-måttligt förhöjt SAA (0–250 mg/L) och att ha ett måttligt-kraftigt förhöjt SAA (>250 mg/L) mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Temperatur >38,2 °C klassades som feber. \*\*McNemar test visade på en signifikant skillnad ( $p < 0,006$ ) i resultaten mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Tabell 3b. December 2014, PCR resultat för *S. equi* från november jämfört med SAA, LPK och Feber

Variabel		Median	Medelvärde	Min. värde	Maxvärde
SAA mg/L*	PCR+	0,0	85,8	0,0	1500
	PCR-	0,0	12,2	0,0	403
LPK 10 <sup>3</sup> /μL	PCR+	10 800	11 411	5600	31 000
	PCR-	10 100	10 287	5700	17 400
Feber °C	PCR+	38,0	38,05	37,4	38,7
	PCR-	38,0	37,99	37,3	39,1

\*Mann-Whitney test kunde *inte* påvisa någon signifikant medelvärdeskillnad i SAA mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Tabell 4a. Mars 2015, PCR för *S. equi* jämfört med SAA, LPK, Feber och Serologi

Variabel	Frekvens (valid %)				Antal (%)	Saknas (%)
SAA mg/L	0–5 (inom referensområdet)	5,1–250 (lindrigt -måttligt förhöjt)	250,1–899 (måttligt - kraftigt förhöjt)	>900 (mycket kraftigt förhöjt)		
	PCR+* <sup>1</sup> * <sup>2</sup>	15 (100%)			15 (100%)	0
	PCR-* <sup>1</sup> * <sup>2</sup>	75 (91,5%)	5 (6,1%)	2 (2,4%)	82 (98,8%)	1 (1,2%)
LPK 10 <sup>3</sup> /μL	<5400 (under referensvärdet)	5400–14000 (normalt)	>14 000 (förhöjt)			
	PCR+	1 (6,7%)	11 (73,3%)	3 (20%)	15 (100%)	0
	PCR-		77 (92,8%)	6 (7,2%)	83 (100%)	0
Feber	Feber	Feberfri				
	PCR+	7 (46,7%)**	8 (53,3%)		15 (100%)	
	PCR-	29 (34,9%)**	54 (65,1%)		83 (100%)	0
Serologi	<0,3 negativ	0,3–0,49 misstänkt positiv	>0,5 serokonverterat			
	Antigen A PCR+	2 (13,3%)	1 (6,7%)	12 (80%)	15 (100%)	0
	Antigen A PCR-	19 (23,8%)	19 (23,8%)	42 (52,5%)	80 (96,4%)	3 (3,6%)
	Antigen C PCR+	10 (66,7%)	3 (20%)	2 (13,3%)	15 (100)	0
	Antigen C PCR-	74 (92,5%)	2 (2,5%)	4 (5,0%)	80 (96,4%)	3 (3,6%)

\*<sup>1</sup>McNemar test kunde *inte* påvisa en signifikant skillnad i resultaten av att ha normalt SAA (<5mg/L) och att ha ett förhöjt SAA (>5mg/L) mellan gruppen PCR+ och PCR-.

\*<sup>2</sup>McNemar test visade på en signifikant skillnad (p <0,002) i resultaten av att ha normalt-måttligt förhöjt SAA (0–250 mg/L) och att ha ett måttligt-kraftigt förhöjt SAA (>250 mg/L) mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Temperatur >38,2 °C klassades som feber. \*\*McNemar test visade på en signifikant skillnad (p <0,001) i resultaten mellan gruppen PCR+ och PCR-.

Tabell 4b. Mars 2015, PCR för *S. equi* jämfört med SAA, LPK och Feber

Variabel		Median	Medelvärde	Min. värde	Maxvärde
SAA mg/L*	PCR+	0,0	0,2	0,0	2,1
	PCR-	0,0	21,8	0,0	819
LPK 10 <sup>3</sup> /μL	PCR+	12 200	11 473	1400	16 200
	PCR-	10 800	10 848	5900	15 800
Feber °C	PCR+	38,2	38,26	37,6	39,1
	PCR-	38,2	38,16	37,3	39,1

\*Mann-Whitney test kunde inte påvisa någon signifikant medelvärdesskillnad i SAA mellan gruppen PCR+ och PCR-.

### Sensitivitet och specificitet för variablerna att indikera en kvarkainfektion

De olika variablernas individuella diagnostiska potential att påvisa eller att avskriva en kvarkamistanke är presenterade i tabell 5 utifrån om de provtagits positivt för kvarka på PCR.

Tabell 5. Sensitivitet och specificitet för de olika variablerna avseende *S. equi*

November		Sensitivitet	Specificitet
	SAA	17,1%	81,8%
	Feber	20,0%	84,9%
	LPK	31,1%	75,5%
	Antigen A	61,4%	57,7%
	Antigen C		100,0%
<b>December</b>			
	SAA	15,6%	86,3%
	Feber	24,4%	73,6%
	LPK	11,1%	94,3%
	Antigen A	68,9%	49,1%
	Antigen C	0,0%	98,1%
<b>Mars</b>			
	SAA	0,0%	91,5%
	Feber	46,7%	65,1%
	LPK	20,0%	92,8%
	Antigen A	80,0%	47,5%
	Antigen C	13,3%	95,0%

SAA >5mg/L, Feber >38,2 grader C, LPK >14 000 10<sup>3</sup>/μL, Antigen A och C >0,5.

### SAA-värdets förhållande till övriga variabler oberoende av *S. equi*

I tabell 6 är SAA-värdets förhållande till variablerna feber, LPK, PCR status för *S. zooepidemicus* och serologiskt status för antigen A och C vid de tre provtagningarna presenterade.

Tabell 6. SAA-värdets förhållande till övriga variabler oberoende av *S. equi*

Variabel och provtagningstillfälle		Frekvens (valid %)			
		SAA mg/L		0-250	>250
		0-5	>5,1		
<b>Feber</b>					
November	<i>Feber</i>	10 (11,8%)	5 (5,9%)	11 (12,9%)	4 (4,7%)
	<i>Feberfri</i>	60 (70,6%)	10 (11,8%)	65 (76,5%)	5 (5,9%)
December	<i>Feber</i>	17 (17,7%)	8 (8,3%)*	23 (24,0%)	2 (2,1%)**
	<i>Feberfri</i>	65 (67,7%)	6 (6,3%)*	69 (71,9%)	2 (2,1%)**
Mars	<i>Feber</i>	35 (36,1%)	1 (1,0%)*	35 (36,1%)	1 (1,0%)**
	<i>Feberfri</i>	55 (56,7%)	6 (6,2%)*	60 (61,0%)	1 (1,0%)**
<b>LPK</b>					
November	<i>Förhöjd</i>	15 (17,6%)	9 (10,6%)	18 (21,2%)	6 (7,1%)**
	<i>Normal</i>	55 (64,7%)	6 (7,1%)	58 (68,2%)	3 (3,5%)**
December	<i>Förhöjd</i>	4 (4,2%)	4 (4,2%)	5 (5,2%)	3 (3,1%)
	<i>Normal</i>	78 (81,3%)	10 (10,4%)	87 (90,6%)	1 (1,0%)
Mars	<i>Förhöjd</i>	7 (7,2%)	2 (2,1%)	8 (8,2%)	1 (1,0%)**
	<i>Normal</i>	83 (85,6%)	5 (5,2%)	87 (89,7%)	1 (1,0%)**
<b>PCR <i>S. zooepidemicus</i></b>					
November	<i>Positiv</i>	62 (72,9%)	14 (16,5%)*	68 (80,0%)	8 (9,4%)**
	<i>Negativ</i>	8 (9,4%)	1 (1,2%)*	8 (9,4%)	1 (1,2%)**
Mars	<i>Positiv</i>	88 (90,7%)	7 (7,2%)*	93 (95,6%)	2 (2,1%)**
	<i>Negativ</i>	2 (2,1%)	0*	2 (2,1%)	0**
<b>Positiv serologi</b>					
November	<i>Antigen A</i>	38 (44,7%)	6 (7,1%)*	41 (48,2%)	3 (3,5%)**
	<i>Negativ</i>	32 (37,6%)	9 (10,6%)*	35 (41,2%)	6 (7,1%)**
December	<i>Antigen A</i>	46 (47,%)	11 (11,5%)*	54 (56,3%)	3 (3,1%)**
	<i>Negativ</i>	36 (37,5%)	3 (3,1%)*	38 (39,6%)	1 (1,0%)**
Mars	<i>Antigen A</i>	50 (53,2%)	3 (3,2%)*	53 (56,4%)	0**
	<i>Negativ</i>	37 (39,4%)	4 (4,3%)*	39 (41,5%)	2 (2,1%)**
November	<i>Antigen C</i>	0	0	0	0
	<i>Negativ</i>	70 (82,4%)	15 (17,6%)	76 (89,4%)	9 (10,6%)
December	<i>Antigen C</i>	0	1 (1,0%)*	1 (1,0%)	0
	<i>Negativ</i>	82 (85,4%)	13 (13,5%)*	91 (94,8%)	4 (4,2%)
Mars	<i>Antigen C</i>	6 (6,4%)	0	6 (6,4%)	0
	<i>Negativ</i>	81 (86,2%)	7 (7,4%)	86 (91,5%)	2 (2,1%)

SAA användes i två jämförelser mot övriga parametrar. Normalt SAA (0-5mg/L) mot förhöjt SAA (>5,1mg/L) och normalt-lindrigt förhöjt (0-250mg/L) mot lindrigt-kraftigt förhöjd (>250mg/L). Temperatur >38,2 °C klassades som feber. LPK >14 000 10<sup>3</sup>/μL klassades som förhöjd. Positiv serologi var ett värde >0,5. \*McNemar test visade på en signifikant skillnad mellan grupperna (p <0,000–0,035). \*\* McNemar test visade på en signifikant skillnad mellan grupperna (p <0,000–0,039).

## DISKUSSION

### Resultatdiskussion

#### *Bakteriologi: PCR*

I samtliga fall var sensitiviteten för PCR provtagningen högre än för bakteriell odling. Ingen häst var positiv på sin bakterieodling för *S. equi* utan att samtidigt vara positiv på PCR vilket överensstämmer med tidigare resultat (Newton *et al.*, 2000).

Vid den sista provtagningen i mars 2015 var det ingen av de 15 PCR positiva för *S. equi* som uppvisade synliga kliniska tecken på kvarka. Endast två var positiva på nossvabb varav en testade negativt på övriga prov. Av de som testade positivt på nosskölj var fyra negativ på luftsäcksskölj och fem av de positiva på luftsäcksskölj var inte positiv på nosskölj. Samtliga 15 positiva bör därför klassas som subkliniska smittbärare. Av resultaten kan man dra slutsatsen att för att med största säkerhet kunna upptäcka en subklinisk smittbärare bör man kombinera de tre bakteriologiska provlokaliseringarna.

I gruppen som var negativ för *S. equi* var samtliga hästar positiv för *S. zooepidemicus* vid de två provtagningarna (nossvabb vid den första provtagningen 2014 och nosskölj vid den andra provtagningen 2015).

#### *Serologi*

Hästarna i studien utvecklade en mild form av kvarka (Tscheschlok *et al.*, 2018) där väldigt få serokonverterade för både antigen A och C i den optimerade ELISA (Robinson *et al.*, 2013) som användes. Eftersom de kliniska sjukdomstecknen var så milda bör detta även ha påverkat graden av inflammation hos de drabbade hästarna och därmed SAA värdet, vilket även resultaten i studien pekar mot. Tittar man på allvarlighetsgraden av utbrottet kom det inte i närheten av det utbrott Piché beskrev 1984 där flera hästar utvecklade komplikationer och/eller dog under utbrottet. Att just detta utbrott var så mildt tror Tscheschlok *et al.* (2018) kan vara kopplat till den minskade andel som serokonverterade för antigen C. De kunde inte hitta någon förändring i SeM proteinet som antigen C är en del av däremot en 61 baspar lång deletion i genen SEQ\_0402. Vad detta innebär för *S. equi*:s virulens kunde de inte svara på i sin studie utan vidare forskning på ämnet krävs.

#### *Hematologi: LPK*

Vid de tre provtagningarna hade den PCR positiva gruppen för *S. equi* en större andel individer med ett LPK högre än 14,000  $10^3/\mu\text{L}$  jämfört med den negativa gruppen. PCR-positiva gruppen (31,1 %, 11,1 % och 20 %) jämfört med den PCR-negativa gruppen (24,5 %, 5,7 % och 7,2 %). Vid de tre provtagningarna var även median och medelvärde något högre i den PCR-positiva gruppen, men inget som var statistiskt signifikant. I den PCR-positiva gruppen varierade minimivärdet och maxvärdet mellan 1,400  $10^3/\mu\text{L}$  och 31,000  $10^3/\mu\text{L}$  vid de tre mätillfällena jämfört med den negativa gruppen, 1,100  $10^3/\mu\text{L}$  och 22,900  $10^3/\mu\text{L}$ .

Enligt Welles (2010) får föl liknande referensvärden som vuxna redan vid tre till fyra månaders ålder. Vilket för denna studie innebär att hästarnas ålder och tolkningen av LPK-resultaten inte bör vara en felkälla i resultatet, speciellt eftersom de undersökta hästarna var runt ett år gamla.



Tidigare studier har rapporterat signifikant förhöjd LPK en till fyra veckor efter insjuknande i kvarka (Hamlen *et al.*, 1992; Ijaz *et al.*, 2012), men efter den akuta fasen gick LPK ned till mer normala nivåer. Ijaz *et al.* (2012) såg att under första till tredje veckan varierade LPK-medelvärdet från 12,800 10<sup>3</sup>/μL (±160 SE) till 14,990 10<sup>3</sup>/μL (±220 SE). En annan studie rapporterade att kvarkainfektade arabhästar hade cirka 3500-4000 10<sup>3</sup>/μL högre LPK jämfört med de friska kontrollerna.

Trots att inget signifikant högre LPK-värde kunde uppmätas i denna studie sågs en tendens med större andel individer med högt LPK och något högre median och medelvärde i den PCR-positiva gruppen. Den leukocytos som sågs var mild till måttligt, liknande som i Ijaz *et al.*:s studie (2012). Detta innebär att ur ett kliniskt perspektiv kan LPK användas tillsammans med andra diagnostiska metoder för att göra en samlad bedömning av patienten. Men normalt LPK kan inte utesluta en potentiell kvarkainfektion då enskilda individer kan ha normalt LPK trots infektion alternativt att man råkat ta sitt blodprov efter akutfasen då LPK återgått till mer normala nivåer.

### SAA

Vid den första provtagningen i november 2014 hade den *S. equi* PCR-positiva gruppen och den negativa ungefär lika stor andel individer som hade ett SAA-värde >5 mg/L, 17,1 % respektive 18,2 %. Sett till fördelningen hade 12,2 % i den positiva gruppen ett SAA som var måttligt till mycket kraftigt förhöjt medan i den negativa gruppen hade 9,1 % ett SAA som var måttligt-kraftigt förhöjt. McNemar-test kunde visa på en signifikant skillnad mellan att ha normalt SAA (<5mg/L) och att ha ett förhöjt SAA (>5mg/L) mellan gruppen PCR-positiv och PCR-negativ, där den positiva gruppen hade högre värden. McNemar-test visade även på en signifikant skillnad mellan att ha normalt-måttligt förhöjt SAA (0-250mg/L) och att ha ett måttligt-kraftigt förhöjt SAA (>250mg/L) mellan gruppen PCR-positiva och PCR-negativa, där den positiva gruppen hade högre värden. Medelvärdet i den positiva gruppen var högre än i den negativa, 118,8 mg/L jämfört med 54,3 mg/L men någon signifikant skillnad kunde inte påvisas med hjälp av Mann-Whitney-test. Medianvärdet var 0 respektive 0,08 mg/L. Maxvärdet var betydligt högre i den positiva gruppen, 1500 mg/L jämfört med 569,3 mg/L.

Vid den andra provtagningen i december, drygt två veckor efter den i november hade den *S. equi* positiva gruppen något större andel individer med ett SAA-värde >5 mg/L, 15,5 % jämfört med 13,8 % i den negativa gruppen. 6,6 % i den positiva gruppen hade ett SAA som var måttligt till mycket kraftigt förhöjt medan i den negativa gruppen hade 2 % ett SAA som var måttligt-kraftigt förhöjt. McNemar-test kunde visa på en signifikant skillnad mellan att ha normalt SAA (<5mg/L) och att ha ett förhöjt SAA (>5mg/L) mellan gruppen PCR-positiv och PCR-negativ, där den positiva gruppen hade högre värden. McNemar-test visade även på en signifikant skillnad mellan att ha normalt-måttligt förhöjt SAA (0-250mg/L) och att ha ett måttligt-kraftigt förhöjt SAA (>250mg/L) mellan gruppen PCR-positiva och PCR-negativa, där den positiva gruppen hade högre värden. Medelvärdet i den positiva gruppen var högre än i den negativa, 85,5 mg/L jämfört med 12,2 mg/L men någon signifikant skillnad kunde inte påvisas med hjälp av Mann-Whitney-test. Medianvärdet var 0 mg/L för båda grupperna. Maxvärdet var betydligt högre i den positiva gruppen, 1500 mg/L jämfört med 403 mg/L.

Vid den sista provtagningen i mars 2015, cirka fyra månader efter decemberprovtagningen hade samtliga i den *S. equi* positiva gruppen ett SAA-värde inom referensområdet. I den negativa gruppen hade nu 8,5 % ett SAA-värde >5 mg/L, av dessa med förhöjt värde hade 2,4 % ett SAA som var måttligt-kraftigt förhöjt. McNemar-test kunde inte påvisa en signifikant skillnad mellan att ha normalt SAA (<5mg/L) och att ha ett förhöjt SAA (>5mg/L) mellan gruppen PCR-positiv och PCR-negativ. McNemar-test visade på en signifikant skillnad mellan att ha normalt-måttligt förhöjt SAA (0-250mg/L) och att ha ett måttligt-kraftigt förhöjt SAA (>250mg/L) mellan gruppen PCR-positiva och PCR-negativa, där den negativa gruppen hade högre värden. Medelvärde i den positiva gruppen var lägre än i den negativa, 0,23 mg/L jämfört med 21,8 mg/L men någon signifikant skillnad kunde inte påvisas med hjälp av Mann-Whitney test. Medianvärdet var 0 mg/L för båda grupperna. Maxvärdet var betydligt högre i den negativa gruppen, 819 mg/L jämfört med 2,1 mg/L.

Vid de två första provtagningarna var det 45 av 98 individer som räknades till den positiva gruppen medan i den sista provtagningen var det 15 individer av 98. Det förefaller att i mars hade den akuta kvarkainfektionen avtagit eftersom alla kvarkapositiva hade normala SAA-värden. De högre värdena i den negativa gruppen måste vara orsakad av andra inflammations-skapande faktorer än *S. equi*.

De signifikanta skillnaderna mellan grupperna som McNemar-test kunde påvisa var små eftersom att Mann-Whitney-test inte kunde påvisa någon signifikant medelvärdeskillnad mellan grupperna vid någon av provtagningarna. Sensitiviteten och specificiteten vid de tre provtagningarna varierade mellan 0,0–17,1 % och 81,8–91,5 % respektive.

Utifrån dessa resultat kan slutsatsen dras att det finns ett samband mellan förhöjt SAA och *S. equi* i det akuta sjukdomsskedet när man undersöker det på grupp-nivå. Men det ger inte utslag vid medelvärdesjämförelse och går man ned på individnivå kan resultaten variera stort. Tidigare studier har visat att det finns en individvariation i SAA-svaret när individer utsatts för samma inflammationsstimuli (Hultén *et al.*, 1999b). Ur ett kliniskt perspektiv innebär det att normalt SAA inte kan utesluta en kvarkainfektion även om specificiteten kan vara förhållandevis hög. På grund av smittsamheten och de konsekvenser sjukdomen får är det önskvärt med ett screeningstest med hög sensitivitet snarare än specificitet. Men ett högt SAA kan användas som beslutsstöd för riktad PCR-diagnostik i till exempel en screeningsituation.

Av de hästar som var subkliniska smittbärare vid sista provtillfället, hade ingen ett förhöjt SAA-värde. Vilket tolkas som att de bakterier som hästarna härbärgerade i sina luftsäckar inte gav en generellt mätbar inflammation som gav utslag på serum-SAA. Utifrån de resultaten i denna studie kan SAA inte användas i diagnostiskt syfte för att upptäcka subkliniska smittbärare. Dock var antalet undersökta subkliniska smittbärare endast 15, en större undersökt grupp hade gett ett säkrare svar på frågan.

#### *SAA-värdets förhållande till övriga variabler oberoende av S. equi*

När utbrottet var i det akuta sjukdomsskedet i december var det signifikant fler individer som hade feber och samtidigt hade ett förhöjt SAA-värde, jämfört med de feberfria. Vid den första provtagningen i november sågs ingen signifikans, detta kan möjligen förklaras av den fördröjning på två till tre dagar (Pepys *et al.*, 1989; Nunokawa *et al.*, 1993; Hultén *et al.*, 1999b)

det tar för SAA-värdet att gå upp vid inflammatoriskt stimuli samt att febern är som högst initialt och sedan kan sjunka. Vid den sista provtagningen och när de kliniska kvarkatecknen läkt ut sågs en omvänd signifikans där den feberfria gruppen var de med förhöjda SAA-värden. Utifrån detta går inga tydliga slutsatser att dras om SAA-värdets förhållande till feber. Feber används flitigt av kliniker som en diagnostisk markör på infektion och det är då intressant att det inte överensstämmer på det sätt man förväntar sig med den major inflammationsmarkör som SAA ändå är. Författaren har inte i sin efterforskning till litteraturöversikten kommit över någon artikel som undersökt feber och dess validitet att diagnostisera inflammation eller infektion.

Vid studiens början i november var det signifikant fler i gruppen med måttligt-kraftigt förhöjd SAA (>250mg/L) som samtidigt hade förhöjd LPK (>14000  $10^3/\mu\text{L}$ ), vilket liknar de data tidigare studier (Hamlen *et al.*, 1992; Ijaz *et al.*, 2012) presenterat om LPK vid början av en kvarkainfektion. Även vid den sista provtagningen i mars sågs signifikant fler med måttligt-kraftigt förhöjd SAA och förhöjd LPK. SAA och LPK förefaller att ha ett positivt samband när det gäller kraftigt inflammation med tydligt förhöjda SAA-värden, dock behövs ytterligare studier och statistiska analyser för att ge ett tydligt svar.

SAA-värdet och PCR-status för *S. zooepidemicus* hade ett positivt samband med signifikant fler PCR-positiva som hade ett förhöjt (>5mg/L) och måttligt-kraftigt förhöjt (>250mg/L) SAA vid båda provtagningarna. Dock hade den största andelen av de PCR-positiva normalt eller lindrigt-måttligt förhöjt SAA.

Som man kan förvänta var det signifikant fler med förhöjt SAA men med normala titrar för antigen A vid provtagningen i november, Detta eftersom det tar en tid innan hästar serokonverterar vid en kvarkainfektion (Galan & Timoney, 1985; Timoney *et al.*, 2007). I december var det signifikant fler som serokonverterat för antigen A och som samtidigt hade förhöjt SAA. Vid provtagningen i mars var det fler i den negativa gruppen som hade förhöjt SAA, vilken överensstämmer med flera av de övriga förhöjda variablerna som alla pekat åt att de förhöjda SAA-värdena i mars har andra orsaker än *S. equi*.

I december var det signifikant fler som inte serokonverterat för antigen C som hade ett förhöjt SAA (>5mg/L), dock sågs inte samma samband gällande måttligt-kraftigt förhöjd SAA. Detta var kliniskt ett mycket mildt utbrott och man kan anta att vid andra utbrott med gravare sjukdomsbild och större andel som serokonverterar för antigen C att ett positivt samband mellan SAA och antigen C borde kunna påvisas i någon grad.

#### *SAA som indikator på prognos och inflammationsgrad*

Resultaten från denna studie kan inte visa att SAA går att använda för att bedöma vare sig prognos eller graden av inflammation. Dock var detta ett kliniskt mildt utbrott med inga rapporterade komplikationer under utbrottet. Studiedesignen vad gäller blodprovtagningsfrekvensen i det akuta skedet var inte heller optimal för att kunna utvärdera SAA-värdets överensstämmelse med graden av sjukdomstecken och inflammationsgraden (Westerman *et al.*, 2015). Flertalet studier vars studiedesign varit mer optimal för att undersöka frågan har kunnat visa på SAA:s potential att följa ett sjukdomsförlopp (Hultén *et al.*, 1999a; Hultén & Demmers, 2002; Jacobsen *et al.*, 2005, 2006; Hobo *et al.*, 2007; Belgrave *et al.*, 2013).

## Feber

Andelen som hade feber var högre i den *S. equi*-positiva gruppen vid den första och sista provtagningen ( $p < 0,0001$  och  $p < 0,001$ ) medan vid den andra provtagningen i december hade den negativa gruppen en högre andel individer med feber ( $p < 0,006$ ).

En möjlig förklaring kan vara att nya fall av kvarka tillkommit i den negativa gruppen eftersom klassningen utgick från PCR-provtagningen två veckor tidigare. Att fler hade feber i den positiva gruppen i mars överensstämmer inte med SAA-värdena, då alla låg inom referensområdet. Vad gäller medelvärde och median var de i princip liknande värden i både den positiva och negativa gruppen vid samtliga provtagningar. Som då låg under gränsen för vad som räknades som feber ( $>38,2^{\circ}\text{C}$ ), förutom medelvärdet för den PCR-positiva gruppen i december som då var  $38,5^{\circ}\text{C}$ .

Kvarkainfektion kan i det initiala skedet ge hög feber, över  $40^{\circ}\text{C}$ , men ingen individ hade så hög temperatur i studien. Det högsta maxvärdet var  $39,5^{\circ}\text{C}$  på en individ i den negativa gruppen i november, som det då saknades serologi och SAA-prover för. I december hade den individen serokonverterat för antigen A och SAA var lindrigt förhöjt ( $68,1 \text{ mg/L}$ ) men i mars var antigen titrarna återigen negativa, SAA lindrigt förhöjt ( $24,3 \text{ mg/L}$ ) och den testade aldrig positivt för *S. equi*. LPK var inom referensområdet vid alla provtagningarna, däremot testade den positivt för *S. zooepidemicus* på nossvabb och nossköljning i mars.

Sensitiviteten och specificiteten avseende *S. equi* vid de tre provtagningarna varierade mellan 20–46,7 % och 65,1–84,9 % respektive. Att feber är så ospecifikt kan dels förklaras av att febern kan vara intermitterant och variera under olika tider på dygnet (Smith, 2014) men alla kvarkapositiva hästar uppvisar inte heller alltid feber (Duffee *et al.*, 2015).

Något att notera är att cirka hälften av de PCR-positiva vid den sista provtagningen i mars 2015 som klassades som subkliniska smittbärare hade normal kroppstemperatur. Och de flesta av dem med en förhöjd kroppstemperatur hade endast en lindrig feber. De två subkliniska smittbärarna med högst temperatur hade  $38,9^{\circ}\text{C}$  och  $39,1^{\circ}\text{C}$ . Av dessa observationer tillsammans med de siffror denna studie fick fram gällande sensitivitet och specificitet kan slutsatsen dras att avsaknad av feber och kliniska tecken på kvarka inte kan utesluta en potentiell kvarkainfektion. Vilket ytterligare pekar på problematiken kring de subkliniska smittbärarna och vilken utmaning de skapar i en smittreningsprocess vid ett känt utbrott men framförallt vad det innebär för ett nationellt och eller internationellt utrotningsarbete.

## **Resultatsammanfattning**

### Sammanfattningsvis

- 15,3 % av hästarna i studien var i mars 2015 subkliniska smittbärare.
- Normalt LPK kan inte utesluta en potentiell kvarkainfektion.
- I det akuta sjukdomsskedet finns ett samband mellan SAA och *S. equi* på gruppnivå. Dock kan det variera på individnivå.
- Normalt SAA-värde kan inte utesluta kvarka trots relativt hög specificitet.
- Höga SAA-värden kan användas som ett beslutsstöd för riktad kvarkadiagnostik vid kvarkamisstanke eller i ett screeningsammanhang under pågående utbrott.
- SAA är inte förhöjt hos subkliniska smittbärare och kan därmed inte användas som ett diagnostiskt verktyg att hitta dessa i screeningsyfte.
- SAA-värdet överensstämmer delvis med övriga markörer för inflammation och infektion, men det är den sammantagna bilden som bör undersökas för att få en bra analys.
- SAA kan inte utifrån denna studie användas som ett verktyg för att säga något om vare sig prognos eller infektionsgrad, ytterligare större riktade studier krävs.
- Vid PCR-provtagning för att upptäcka subkliniska smittbärare får man det säkraste resultatet om man kombinerar nossvabb, nosskölj och luftsäckssköljning.
- Avsaknad av feber är inte specifikt nog för att ensamt utesluta en potentiell kvarkainfektion.

### **Metoddiskussion**

Denna studie har utgått från insamlad data från en redan utförd studie av Tscheschlok *et al.* (2018) där analysen av SAA har gjorts i efterhand på frysta serumprover. Denna utgångspunkt är grunden till de styrkor och begränsningar som studien har.

En av de främsta styrkor studien har är att ett stort datamaterial redan var insamlat, som sträckte sig över en längre tidsperiod med uppföljande data på en relativt stor grupp av individer. Inom ramen av ett examensarbete i veterinärmedicin hade författaren aldrig på egen hand rent praktiskt kunnat få ihop ett så stort datamaterial. Ursprungsstudiens syfte var att kliniskt, serologiskt och mikrobiologiskt undersöka en grupp immunologiskt naiva unghästar vid ett naturligt kvarkautbrott. Ur perspektivet att undersöka SAA och hur det förändras under ett kvarkautbrott så hade det varit önskvärt att vid studiedesignen planera en mer frekvent blodprovstagning fram för allt i det akuta sjukdomsskedet, till exempel en extra provtagning mellan den i november och december samt en till cirka två veckor efter den i december. Det är möjligt att en mer frekvent blodprovstagning i det akuta skedet hade kunnat ge en mer

nyanserad bild av varje enskild individs sjukdomsförlopp. Westerman *et al.* (2015) diskuterade de ökade möjligheter en upprepad SAA-provtagning kan ge vad gäller att övervaka ett sjukdomsförlopp och potentiellt kunna ställa prognos. Flera studier har framfört SAA:s potential som markör för sjukdom men även att kunna följa förloppet (Hultén *et al.*, 1999a; Hultén & Demmers, 2002; Jacobsen *et al.*, 2005, 2006; Hobo *et al.*, 2007; Belgrave *et al.*, 2013), dock går SAA-värdet ned inom sju dagar till fyra veckor när den akuta sjukdomen är över (Pepys *et al.*, 1989; Nunokawa *et al.*, 1993). Vilket innebär att det är detta fönster man måste förhålla sig till vid provtagning. Sedan är ju frågan om en mer frekvent provtagning hade varit praktiskt genomförbart i denna studie då det rörde sig om en så pass stor grupp relativt ohanterade unghästar.

Som jämförelse i studien hade det varit intressant att analysera andra kända serologiska inflammationsmarkörer på häst. Till exempel fibrinogen, albumin och serumjärn. För haptoglobin finns i dag ingen tillgänglig tillförlitlig kommersiell analysmetod i Sverige. Fibrinogen är en vedertagen parameter vid inflammationsdiagnostik (Thomas, 2000; Grondin & Dewitt, 2010) och albumin har i andra studier (Ijaz *et al.*, 2012; Neamat-Allah & El-Damaty, 2016) visat sig ha signifikant lägre värden vid kvarkainfektion. Flera studier har pekat på att näst efter SAA är serumjärn den tillförlitligaste inflammationsmarkören hos häst (Jacobsen *et al.*, 2005; Borges *et al.*, 2007; Hooijberg *et al.*, 2014).

Vid den första provtagningen i november har ursprungsförfattarna valt djup nössvabb som provtagningsmetod inför PCR-analysen av *S. equi*. Nössköljning hade varit ett något bättre alternativ eftersom det ökar kontaktytan av slemhinna som blir provtagen, utan att det är en nämnvärt dyrare eller mer komplicerad provtagningsmetod. Just den ökade kontaktytan är speciellt önskvärd i början av en kvarkainfektion innan bakterieutsöndringen kommit igång på riktigt. I den bästa av världar hade det varit intressant att även få med en luftsäckssköljning för att verkligen kunna följa upp vilka som hade kvarka vid studiens början och om det potentiellt kan ha funnits subkliniska smittbärare redan då. Gården som studien utförts på har en historik av kvarkaproblematik så det är inte en omöjlighet att någon av hästarna utsatts för smitta men kunnat vara skyddade av maternella antikroppar fram tills utbrottet. Att endoskopera luftsäckar är en kostsam och resurskrävande undersökning som författaren har all förståelse för att man valt att spara till den avslutande provtagningen i mars.

I mars när den akuta kvarkainfektionen avtagit och då alla kvarkapositiva hästar hade normala SAA-värden var det den kvarkanegativa gruppen som hade förhöjda SAA-värden. Vilket betyder att andra inflammationsskapande faktorer fanns med i studien, confounders eller störfaktorer på svenska. Eftersom det här var en stor grupp unghästar är det mycket vanligt med diverse viroser som cirkulerar, lite som på en förskola i humanvärlden. Det är mycket svårt att designa en studie där man kommer ifrån dessa faktorer, man får acceptera att de finns och ta hänsyn till det när man analyserar sina data.

Vad gäller information om hur lång tid det tog från det att blodproverna togs till dess att de antingen analyserades (LPK) eller centrifugerades och analyserades (serologi) och/eller frystes in (SAA) och hur de förvarades däremellan saknas i denna studie. Det är möjligt att mindre

optimal hantering kan haft en lindrig påverkan på resultaten av de olika laboratorieundersökningarna.

Fysiologisk leukocytos (Grondin & Dewitt, 2010; Welles, 2010) är en möjlig felkälla till förhöjda leukocytvärden i studien, framförallt då man kan anta att dessa unga relativt ohanterade hästar bör ha upplevt undersökningen som stressande.

SAA-proverna i denna studie hade vid tiden för analys förvarats cirka 35-39 månader i -20°C. SAA anses stabilt vid frysförvaring, men några specifika studier på ekvint SAA och dess stabilitet vid frysförvaring över en längre tid finns inte. En studie på bovint SAA visade signifikant lägre SAA-koncentrationer efter frysförvaring (Tóthová *et al.*, 2012), och studier på ekvint SAA och dess stabilitet vid förvaring har gett motstridiga resultat (Rendle *et al.*, 2009; Hillström *et al.*, 2010). Jacobsen *et al.* (2006) använde sig i sin studie av frysta SAA-prover som förvarats i upp till ett år med godtagbara resultat. Mest troligt har den långa frysförvaringen påverkat resultaten i denna studie, men hur mycket lägre SAA-koncentrationen blivit går inte att uttala sig om. Det har förmodligen haft störst påverkan på de provsvar som endast var lindrigt förhöjda från referensvärdet, medan de med måttligt-kraftigt förhöjda värden ändå har gett tydligt utslag på analysen.

#### *Analysmetodernas reliabilitet och validitet*

SAA är här analyserad med en immunologisk analysmetod. De immunologiska metoderna har alltid en relativt hög imprecision. Inomkörningsvariationen och mellankörningsprecisionen, variationskoefficienten (CV %) för hästprover är oftast mellan 5–10 % för värden över 5mg/L. Medan mycket låga värden kan ha betydligt högre imprecision (Lilliehöök, I., Professor vid Institutionen för kliniska vetenskaper; enheten för klinisk kemi, pers.medd., 2018-03-28). Detta innebär i praktiken att ett och samma prov från samma individ kan få olika testresultat vid upprepade mätningar. Vid tolkning av SAA-värdet är det därför viktigt att se på resultatet som en flytande skala och dela in resultaten i lindrigt-kraftigt förhöjd snarare än att övertolka enskilda numeriska mätvärden.

Automatiska hematologiinstrument har den begränsningen att de kan riskera att klassificera blodkroppar fel i analysen, vilket kan få störst påverkan vid analys av de olika fraktionerna av blodkropparna. I denna studie har endast total leukocytpartikelkoncentration analyserats så detta borde vara en mindre risk till felaktigt resultat.

Tidigare har korsreakens av *S. zooepidemicus* protein SzM varit ett möjligt fel vid serologisk undersökning för kvarka (Kelly *et al.*, 2006) men detta har lösts genom att kombinera två ytantigen specifika för *S. equi* i analysen (Robinson *et al.*, 2013) vilket är den metod som använts i denna studie. Andra faktorer som påverkar är till exempel vart man drar sitt cut-off värde i analysen, vilket påverkar den sensitivitet och specificitet analysen får.

Faktorer som kan påverka resultaten av kroppstemperaturmätning är vilken termometer som använts. Har samma termometer använts vid alla provtagningar på alla individer? Det är troligt att anta att olika termometrar kan skilja sig någon hundra- eller tiondel i det resultat de visar. Sedan kan det praktiska handhavandet vid själva mätningen spela in, hur långt in har man fört termometern i rektum, har den förts mot tarmslemhinnan eller kan det ha funnits träck i vägen.

Detta bör inte heller ha påverkat mer än någon tiondel. Tiden på dygnet som provtagningen skett spelar in då hästarna kan ha haft intermittent feber samt att febertoppar oftast kommer på eftermiddag eller kväll och att den lägsta temperaturen oftast kan uppmätas på morgonen (Smith, 2014).

### *Statistisk analys*

I denna studie har enklare statistiska analyser utförts. Kalkyleringen av sensitivitet och specificitet får anses mest exakt gällande marsprovtagningen då PCR-statusen var baserad på de tre provtagningsmetoderna sammantaget och minst tillförlitlig i december så PCR-statusen var baserad på novemberprovtagningen. McNemar-test kan bara svara på frågan om en signifikant skillnad mellan två grupper föreligger, den anger ingen riktning och ger inget svar på frågan hur sambandet förhåller sig. Mann-Whitney-test används för medelvärdesjämförelse mellan två grupper när data inte är normalfördelade. Valet av hur man grupperar variabelernas resultat, till exempel dikotom eller polytom, påverkar vilka statistiska analyser som är möjligt och vilka sorters frågor och svar man kan få.

Eftersom att det finns uppföljande prover från samma individer och över olika variabler över tid bör det ha varit möjligt att göra en mer avancerad sambandsanalys och eller gruppjämförelse. Då data enligt Shapiro-Wilks test var snedfördelad bör något icke-parametrisk test kunnat vara lämpligt. När det kom till att välja rätt statistisk metod brast det på författarens bristande statistikkunskaper vilket blev begränsningen i detta fall.

De statistiska resultaten i studien har inte blivit validerade genom en statistisk analys som undersökt rimligheten i resultaten, vilket innebär att vid tolkning av de resultat denna studie fått ska en viss försiktighet tillämpas då resultaten kan vara slumpmässiga även om de tycks peka åt ett håll.



## REFERENSER

- 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(4), pp 277–286.
- Belgrave, R. L., Dickey, M. M., Arheart, K. L. & Cray, C. (2013). Assessment of serum amyloid A testing of horses and its clinical application in a specialized equine practice. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 243(1), pp 113–119.
- Benditt, E. P. & Eriksen, N. (1977). Amyloid protein SAA is associated with high density lipoprotein from human serum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), pp 4025–4028.
- Borges, Ai. S., Divers, T. J., Stokol, T. & Mohammed, O. H. (2007). Serum iron and plasma fibrinogen concentrations as indicators of systemic inflammatory diseases in horses. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 21(3), pp 489–494.
- Boyle, A. G., Sweeney, C. R., Kristula, M., Boston, R. & Smith, G. (2009). Factors associated with likelihood of horses having a high serum *Streptococcus equi* SeM-specific antibody titer. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 235(8), pp 973–977.
- Boyle, A. g., Timoney, J. f., Newton, J. r., Hines, M. t., Waller, A. s. & Buchanan, B. r. (2018). *Streptococcus equi* infections in horses: Guidelines for treatment, control, and prevention of strangles—revised consensus statement. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, p n/a-n/a.
- 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(3–4), pp 219–229.
- Davidson, A., Traub-Dargatz, J. L., Magnuson, R., Hill, A., Irwin, V., Newton, R., Waller, A., Smith, K., Callan, R. J., Meehan, M., Owen, P. & Salman, M. (2008). Lack of correlation between antibody titers to fibrinogen-binding protein of *Streptococcus equi* and persistent carriers of strangles. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 20(4), pp 457–462.
- Duffee, 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*, 247(10), pp 1161–1168.
- Galan, J. E. & Timoney, J. F. (1985). Mucosal nasopharyngeal immune responses of horses to protein antigens of *Streptococcus equi*. *Infection and Immunity*, 47(3), pp 623–628.
- Grondin, T. M. & Dewitt, S. F. (2010). Chapter 106. Normal hematology of the horse and donkey I: Weiss D J. & Wardrop K. J (ed). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. ed., pp 821–828. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-8138-1798-9.
- Hamlen, H. J., Timoney, J. F. & Bell, R. J. (1992). Hematologic parameters of foals during a strangles epizootic. *Journal of Equine Veterinary Science*, 12(2), pp 86–92.
- Hamlen, H. J., Timoney, J. F. & Bell, R. J. (1994). Epidemiologic and immunologic characteristics of *Streptococcus equi* infection in foals. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 204(5), pp 768–775.
- Harrington, D. J., Sutcliffe, I. C. & Chanter, N. (2002). The molecular basis of *Streptococcus equi* infection and disease. *Microbes and Infection*, 4(4), pp 501–510.
- Hillström, A., Tvedten, H. & Lilliehöök, I. (2010). Evaluation of an in-clinic Serum Amyloid A (SAA) assay and assessment of the effects of storage on SAA samples. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 52(1), p 8.
- Hobo, S., Niwa, H. & Anzai, T. (2007). Evaluation of Serum Amyloid A and Surfactant Protein D in sera for identification of the clinical condition of horses with bacterial pneumonia. *Journal of Veterinary Medical Science*, 69(8), pp 827–830.

- Holden, M. T. G., Heather, Z., Paillot, R., Steward, K. F., Webb, K., Ainslie, F., Jourdan, T., Bason, N. C., Holroyd, N. E., Mungall, K., Quail, M. A., Sanders, M., Simmonds, M., Willey, D., Brooks, K., Aanensen, D. M., Spratt, B. G., Jolley, K. A., Maiden, M. C. J., Kehoe, M., Chanter, N., Bentley, S. D., Robinson, C., Maskell, D. J., Parkhill, J. & Waller, A. S. (2009). Genomic evidence for the evolution of *Streptococcus equi*: Host restriction, increased virulence, and genetic exchange with human pathogens. *PLoS Pathog*, 5(3), p e1000346.
- Hooijberg, E. h., van den Hoven, R., Tichy, A. & Schwendenwein, I. (2014). Diagnostic and predictive capability of routine laboratory tests for the diagnosis and staging of equine inflammatory disease. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 28(5), pp 1587–1593.
- Hultén, C. & Demmers, S. (2002). Serum amyloid A (SAA) as an aid in the management of infectious disease in the foal: comparison with total leucocyte count, neutrophil count and fibrinogen. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), pp 693–698.
- Hultén, C., Grönlund, U., Hirvonen, J., Tulamo, R.-M., Suominen, M. M., Marhaug, G. & Forsberg, M. (2002). Dynamics in serum of the inflammatory markers serum amyloid A (SAA), haptoglobin, fibrinogen and  $\alpha$ 2-globulins during induced noninfectious arthritis in the horse. *Equine Veterinary Journal*, 34(7), pp 699–704.
- Hultén, C., Sandgren, B., Skiöldebrand, E., Klingeborn, B., Marhaug, G. & Forsberg, M. (1999a). The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as an inflammatory marker in equine influenza virus infection. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 40(4), pp 323–333.
- Hultén, C., Sletten, K., Foyn Bruun, C. & Marhaug, G. (1997). The acute phase serum amyloid A protein (SAA) in the horse: isolation and characterization of three isoforms. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 57(3), pp 215–227.
- Hultén, C., Tulamo, R.-M., Suominen, M. ., Burvall, K., Marhaug, G. & Forsberg, M. (1999b). A non-competitive chemiluminescence enzyme immunoassay for the equine acute phase protein serum amyloid A (SAA) – a clinically useful inflammatory marker in the horse. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 68(2–4), pp 267–281.
- Husebekk, A., Husby, G., Sletten, K., Marhaug, G. & Nordstoga, K. (1986). Characterization of amyloid protein AA and its serum precursor SAA in the Horse. *Scandinavian Journal of Immunology*, 23(6), pp 703–709.
- Ijaz, M., S Khan, M., Z Dourani, A., H Saleem, M., Chaudhry, A. ., Khattak, M. M. A. K., Mehmood, K. & Shahzad, W. (2012). Prevalence and haemato-biochemical studies of strangles (*Streptococcus equi*) affected horses in Pakistan. *Journal of Animal and Plant Sciences*, 22.
- Jacobsen, S. & Andersen, P. H. (2007). The acute phase protein serum amyloid A (SAA) as a marker of inflammation in horses. *Equine Veterinary Education*, 19(1), pp 38–46.
- Jacobsen, S., Jensen, J. C., Frei, S., Jensen, A. L. & Thoefner, M. B. (2005). Use of serum amyloid A and other acute phase reactants to monitor the inflammatory response after castration in horses: a field study. *Equine Veterinary Journal*, 37(6), pp 552–556.
- Jacobsen, S., Kjelgaard-Hansen, M., Hagbard Petersen, H. & Jensen, A. L. (2006). Evaluation of a commercially available human serum amyloid A (SAA) turbidometric immunoassay for determination of equine SAA concentrations. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, 172(2), pp 315–319.
- Jordbruksverket (2016). *Årsrapport över anmälningspliktiga djursjukdomar 2016* [online]. Enheten för internationella frågor och djurhälsopersonal. (Dnr 6.2.18-696/17).
- Jorm, L. R., Love, D. N., Bailey, G. D., McKay, G. M. & Briscoe, D. A. (1994). Genetic structure of populations of beta-haemolytic Lancefield group C streptococci from horses and their association with disease. *Research in Veterinary Science*, 57(3), pp 292–299.
- Kelly, C., Bugg, M., Robinson, C., Mitchell, Z., Davis-Poynter, N., Newton, J. R., Jolley, K. A., Maiden, M. C. J. & Waller, A. S. (2006). Sequence variation of the SeM Gene of *Streptococcus*

- equi allows discrimination of the source of strangles outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(2), pp 480–486.
- Kent, J. E. & Goodall, J. (1991). Assessment of an immunoturbidimetric method for measuring equine serum haptoglobin concentrations. *Equine Veterinary Journal*, 23(1), pp 59–66.
- Ladlow, J., Scase, T. & Waller, A. (2006). Canine strangles case reveals a new host susceptible to infection with *Streptococcus equi*. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(7), pp 2664–2665.
- Lindhahl, S. B., Aspán, A., Båverud, V., Paillot, R., Pringle, J., Rash, N. L., Söderlund, R. & Waller, A. S. (2013a). Outbreak of upper respiratory disease in horses caused by *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* ST-24. *Veterinary Microbiology*, 166(1–2), pp 281–285.
- Lindhahl, S., Båverud, V., Egenvall, A., Aspán, A. & Pringle, J. (2013b). Comparison of sampling sites and laboratory diagnostic tests for *S. equi* subsp. *equi* in horses from confirmed strangles outbreaks. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 27(3), pp 542–547.
- Neamat-Allah, A. N. F. & El-Damaty, H. M. (2016). Strangles in Arabian horses in Egypt: clinical, epidemiological, hematological, and biochemical aspects. *Veterinary World*, 9(8), pp 820–826.
- 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(6), pp 515–526.
- Newton, J. R., Wood, J. L. N., Dunn, K. A., DeBrauwere, M. N. & Chanter, N. (1997). Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Veterinary Record*, 140(4), pp 84–90.
- Nunokawa, Y., Fujinaga, T., Taira, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N. & Hagio, M. (1993). Evaluation of serum amyloid A protein as an acute-phase reactive protein in horses. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 55(6), pp 1011–1016.
- Pepys, M. B., Baltz, M. L., Tennent, G. A., Kent, J., Ousey, J. & Rossdale, P. D. (1989). Serum amyloid A protein (SAA) in horses: objective measurement of the acute phase response. *Equine Veterinary Journal*, 21(2), pp 106–109.
- Petersen, H. H., Nielsen, J. P. & Heegaard, P. M. H. (2004). Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry. *Veterinary Research*, 35(2), pp 163–187.
- Piché, C. A. (1984). Clinical observations on an outbreak of strangles. *The Canadian Veterinary Journal*, 25(1), pp 7–11.
- Ramey, D. (2010). Does early antibiotic use in horses with ‘strangles’ cause metastatic *Streptococcus equi* bacterial infections? *Equine Veterinary Education*, 19(1), pp 14–15.
- Rendle, D. I., Heller, J., Hughes, K. J., Innocent, G. T. & Durham, A. E. (2009). Stability of common biochemistry analytes in equine blood stored at room temperature. *Equine Veterinary Journal*, 41(5), pp 428–432.
- Robinson, C., Frykberg, L., Flock, M., Guss, B., Waller, A. S. & Flock, J.-I. (2018). Strangvac: A recombinant fusion protein vaccine that protects against strangles, caused by *Streptococcus equi*. *Vaccine*, 36(11), pp 1484–1490.
- Robinson, C., Steward, K. F., Potts, N., Barker, C., Hammond, T., Pierce, K., Gunnarsson, E., Svansson, V., Slater, J., Newton, J. R. & Waller, A. S. (2013). Combining two serological assays optimises sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure. *The Veterinary Journal*, 197(2), pp 188–191.
- Ruffus, J. (1251). *De Medicina Equorum*.
- Smith, B. P. (2014). *Large Animal Internal Medicine*. 5. ed. St. Louis, MO: Mosby Elsevier. ISBN 978-0-323-08839-8.
- Solleysel, J. (1664). *Le Parfait Mareschal*. Paris: chez Gervais Clovsier Tillgänglig: <http://books.google.se/books> [2018-11-01].

- Stoneham, S. J., Palmer, L., Cash, R. & Rossdale, P. D. (2001). Measurement of serum amyloid A in the neonatal foal using a latex agglutination immunoturbidimetric assay: determination of the normal range, variation with age and response to disease. *Equine Veterinary Journal*, 33(6), pp 599–603.
- Svensk Travsport (2018). *Svensk Travsport - Smittskyddsregler*. [online]. Available from: <https://www.travsport.se/artikel/smittskyddsregler>. [Accessed 2018-10-15].
- 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 the American Veterinary Medical Association*, 194(9), pp 1281–1286.
- 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(1), p 123.
- Sweeney, C. R., Timoney, P. J., Newton, J. R. & Hines, M. T. (2014). Chapter 28 Streptococcal infections I: Sellon, Debra C. Long, Maureen T. (ed). *Equine Infectious Diseases*. 2. ed, pp 265-277.e4. St. Louis: W.B. Saunders. ISBN 978-1-4557-0891-8.
- 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 the American Veterinary Medical Association*, 191(11), pp 1446–1448.
- Taira, T., Fujinaga, T., Okumura, M., Yamashita, K., Tsunoda, N. & Mizuno, S. (1992). Equine haptoglobin: Isolation, characterization, and the effects of ageing, delivery and inflammation on its serum concentration. *Journal of Veterinary Medical Science*, 54(3), pp 435–442.
- Thomas, J. S. (2000). Chapter 134. Overview of plasma proteins I: *Schalm's Veterinary Hematology*. 5. ed. / Editors Bernard F. Feldman, Joseph G. Zinkl, Nemi C. Jain., pp 891–898. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. ISBN 978-0-683-30692-7.
- Timoney, J. F. & Kumar, P. (2008). Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Veterinary Journal*, 40(7), pp 637–642.
- Timoney, J. F., Qin, A., Muthupalani, S. & Artiushin, S. (2007). Vaccine potential of novel surface exposed and secreted proteins of *Streptococcus equi*. *Vaccine*, 25(30), pp 5583–5590.
- Timoney, J. F., Suther, P., Velineni, S. & Artiushin, S. C. (2014). The antiphagocytic activity of SeM of *Streptococcus equi* requires capsule. *Journal of Equine Science*, 25(2), pp 53–56.
- Todd, A. G. (1910). Strangles. *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics*, 23, pp 212–229.
- Tóthová, C., Nagy, O., Seidel, H. & Kováč, G. (2012). The effect of storage temperature and time on the concentrations of bovine serum amyloid a and its mammary associated isoform. *Veterinary Medicine International*, 2012, p 861458.
- Tscheschlok, L., Venner, M., Steward, K., Böse, R., Riihimäki, M. & Pringle, J. (2018). Decreased clinical severity of strangles in weanlings associated with restricted seroconversion to optimized *Streptococcus equi* ssp *equi* assays. *Journal of Veterinary Internal Medicine*, 32(1), pp 459–464.
- Waller, A. S. (2014). New perspectives for the diagnosis, control, treatment, and prevention of strangles in horses. *The Veterinary Clinics of North America. Equine practice*, 30(3), pp 591–607.
- Webb, K., Barker, C., Harrison, T., Heather, Z., Steward, K. F., Robinson, C., Newton, J. R. & Waller, A. S. (2013). Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *Veterinary Journal (London, England : 1997)*, 195(3), pp 300–304.
- Webb, K., Jolley, K. A., Mitchell, Z., Robinson, C., Newton, J. R., Maiden, M. C. J. & Waller, A. (2008). Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology*, 154(10), pp 3016–3024.
- Weese, J. S., Jarlot, C. & Morley, P. S. (2009). Survival of *Streptococcus equi* on surfaces in an outdoor environment. *The Canadian Veterinary Journal*, 50(9), pp 968–970.

- Welles, E. G. (2010). Chapter 47. Interpretation of equine leukocyte responses. I: Weiss, D J. & Wardrop, K. J. (ed). *Schalm's Veterinary Hematology*. 6. ed., pp 314–320. Ames, Iowa: Wiley-Blackwell. ISBN 978-0-8138-1798-9.
- Westerman, T. L., Tornquist, S. J., Foster, C. M. & Poulsen, K. P. (2015). Evaluation of serum amyloid A and haptoglobin concentrations as prognostic indicators for horses with inflammatory disease examined at a tertiary care hospital. *American Journal of Veterinary Research*, 76(10), pp 882–888.
- Wood, J., Dunn, K., Chanter, N. & de Brauwere, N. (1993). Persistent infection with *Streptococcus equi* and the epidemiology of strangles. *Veterinary Record*, 133(15), pp 375–375.