



Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

**Fakulteten för veterinärmedicin
och husdjursvetenskap**
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

Serologi vid diagnostik av subkliniska smittbärare av *Streptococcus equi*

Tove Trelsmo

*Uppsala
2014*

Examensarbete 30 hp inom veterinärprogrammet

*ISSN 1652-8697
Examensarbete 2014:27*

Serologi vid diagnostik av subkliniska smittbärare av *Streptococcus equi*

Serology as a diagnostic method for detecting subclinical carriers of *Streptococcus equi*

Tove Trelsmo

Handledare: *Miia Riihimäki, institutionen för Kliniska Vetenskaper*

Biträdande handledare: *Gittan Gröndahl, Statens Veterinärmedicinska Anstalt
Viveca Båverud, Statens Veterinärmedicinska Anstalt*

Examinator: *John Pringle, institutionen för Kliniska Vetenskaper*

Examensarbete i veterinärmedicin, kliniska vetenskaper

Omfattning: *30 hp*

Nivå och fördjupning: *Avancerad nivå, A2E*

Kurskod: *EX0736*

Program/utbildning: *Veterinärprogrammet*

Utgivningsort: *Uppsala*

Utgivningsår: *2014*

Delnummer i serie: *Examensarbete / Sveriges lantbruksuniversitet, Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap, Veterinärprogrammet 2014:27*

ISSN: *1652-8697*

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

Nyckelord: *kvarka, subkliniska smittbärare, serologi*

Keywords: *strangles, subclinical carriers, serology*

Sveriges lantbruksuniversitet
Swedish University of Agricultural Sciences

Fakulteten för veterinärmedicin och husdjursvetenskap
Institutionen för Kliniska Vetenskaper

SAMMANFATTNING

Målet med denna studie var att undersöka om serologi, med hjälp av en iELISA kan användas som diagnostiskt hjälpmedel vid diagnostik av subkliniska smittbärare av *S. equi*. Genom upprepade provtagningar studerades det serologiska svaret efter en naturlig infektion med *S. equi* hos 93 hästar, från sex besättningar drabbade av kvarka. Förekomsten av antikroppar studerades även hos en kontrollgrupp bestående av 64 kliniskt friska hästar. Den iELISA som användes i detta försök är utvecklad av Animal Health Trust, Newmarket, Storbritannien (AHT) och påvisar två för *S. equi* unika antikroppar riktade mot antigen A och antigen C. Förutom att studera förekomsten av antikroppar undersöktes även förekomsten av *S. equi* genom PCR undersökning av nässvabb, nässkölj och/eller prov från luftsäckarna hos samtliga hästar vid varje provtagningstillfälle. Denna studie visade på att förekomsten av serologiskt positiva hästar sjönk över tid efter besättningens insjuknande, vilket även förekomsten av PCR positiva hästar avseende *S. equi* gjorde. Studier av antikroppskurvorna visade att de två antikroppar som undersökts med denna iELISA uppvisade ett liknande mönster. Man kunde även se att en av de två studerade antikropparna låg högre. Vilken antikropp som låg högst hos en individ varierade både inom och mellan de studerade besättningarna. Baserat på materialet i denna studie erhöles en sensitivitet på 61 % för denna iELISA att påvisa subkliniska smittbärare av *S. equi* och ett negativt prediktivt värde (NPV) på 81%.

SUMMARY

The objective of this study was to investigate if serology by means of an iELISA could be a potential aid in diagnose of subclinical carriers of *S. equi*. Through multiple samples, the serological response after a natural infection of *S. equi* was studied in 93 horses from six premises diagnosed with strangles. The presence of antibodies was also studied in a reference group of 64 clinically healthy horses. The iELISA used in this study is developed by Animal Health Trust (AHT), Newmarket, Great Britain and it detects two antibodies unique to *S. equi* directed to antigen A and antigen C. Also, the presence of *S. equi* through testing nasal swabs, nasal lavage and/or material from the guttural pouches by PCR was studied, in all horses at every testing time. This study showed that the percentage of serological positive horses declined over time as did the percentage of *S. equi* PCR positive horses. Studies of the antibody graphs showed that the two antibodies tested in this study exhibited similar patterns. Also it was discovered that one of the two antibodies showed a higher titer. Which antibody that showed a higher titer varied both within and between different premises. Based on the material in this study the iELISA had a sensitivity of 61 % for detecting subclinical carriers of *S. equi* and a negative predictive value of 81%.

INNEHÅLL

Inledning.....	1
Litteraturoversikt.....	2
Infektion med <i>S. equi</i>	2
Diagnostik av infektion med <i>S. equi</i>	3
Behandling	3
Smittspridning	4
Subkliniska smittbärare	4
Serologi som diagnostik av subkliniska smittbärare av <i>S. equi</i>	5
Serologi som diagnostiskt hjälpmedel.....	5
Serologi vid diagnostik av <i>S. equi</i>	6
Material och metoder.....	8
Provtagningar	8
Analyser	9
Besättningar sjuka i kvarka	9
Friska kontroller	11
Jämförelse mellan friska kontroller och besättningar sjuka i kvarka	12
Resultat.....	13
Friska kontroller	13
Friska kontroller med positivt serologiskt svar	13
Hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka	15
Resultat för samtliga hästar i försöket.....	21
Diskussion	22
Provtagningar i besättningar drabbade av kvarka	22
Friska kontrollhästar.....	24
Resultat för samtliga hästar i försöket.....	24
Konklusion	25
Referenser.....	26

INLEDNING

Kvarka är en bakteriell luftvägsinfektion hos häst där den orsakande bakterien är en betahemolyserande streptokock, *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*). Sjukdomen kvarka finns beskriven redan år 1251 (Sweeney *et al.*, 2005). Idag förekommer kvarka i hela Sverige och är en sjukdom som kan orsaka allvarliga konsekvenser dels för den drabbade besättningen och för den enskilda hästen men dels även ekonomiskt för hästägaren. Enligt Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA) drabbas i Sverige i genomsnitt 71 besättningar årligen av kvarka (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2013). Ett bekymmer som man idag brottas med inom smittspridningen av kvarka är att en häst, efter genomgången infektion kan bli bärare av *S. equi*. Dessa hästar utgör en viktig smittokälla då de utsöndrar *S. equi* intermittent samtidigt som de är kliniskt friska. Det finns idag ingen snabb, eller annan enkel och billig metod för att identifiera dessa hästar. Den diagnostik som man idag använder sig av är bland annat upprepade provtagningar med nässvabb eller nässköljning. Man kan även använda sig av endoskopering och provtagning av luftsäckarna. Provtagning av luftsäckarna kräver dock att man har speciell utrustning samt att hästen sederas, vilket innebär att detta är en provtagningsmetod som är både kostsam och tidskrävande. Det är dock den idag säkraste metoden för att identifiera subkliniska smittbärare (Newton *et al.*, 1997). Det finns i andra länder, bland annat i England, serologiska tester där man har som indikation att diagnostisera infektion med *S. equi*. Ingen av dessa metoder finns dock tillgängliga i Sverige idag.

Syftet med detta försök är att studera en av dessa serologiska tester för att utvärdera om den skulle kunna användas som ett diagnostiskt hjälpmedel vid subkliniskt bärarskap av *S. equi*. Eftersom syftet med detta försök är att undersöka om man genom ett blodprov och serologisk undersökning kan påvisa hästar som är subkliniska smittbärare av *S. equi* är det önskvärt med ett test som har hög sensitivitet eftersom vi inte vill missa hästar som är bärare av bakterien. Det är även önskvärt att man kan friskförklara hästen, om ett negativt serologiskt svar erhålls. Detta innebär således att det även är önskvärt med ett högt negativt prediktivt värde (NPV).

I detta försök studeras förekomsten av antikroppar hos 93 hästar från sex olika besättningar vid en naturlig infektion av *S. equi*. Hos dessa hästar har det gjorts uppföljande provtagningar vilket innebär att antikroppskurvor har kunnat studeras över tid. Utöver dessa hästar från drabbade besättningar har förekomsten av antikroppar undersökts hos 64 kliniskt friska hästar. Förutom att studera antikroppsförekomst har även förekomsten av *S. equi* och *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) hos samtliga hästar vid samtliga provtagningsstillfällen analyserats. Utifrån det insamlade materialet kunde ses, att förekomsten av serologiskt positiva hästar i en drabbad besättning sjunker över tid. Vidare studier av antikroppskurvor hos de enskilda hästarna i drabbade besättningar har visat att den ena av de två undersökta antikropparna riktade mot antigen A eller C, ofta ligger högre. Vilken av de två undersökta antikropparna som ligger högst varierar både inom och mellan besättningar. Det kan även ses ett fördröjt antikroppssvar där hästen är PCR positiv avseende *S. equi* en tid innan den är serologiskt positiv. Hur lång tid det tar innan ett serologiskt svar utvecklas kan man, på grund av ojämna provtagningsintervall, ej svara på. Det blev även observerat att man, om man endast tar prov med nässvabb eller nässköljning missar förekomst av *S. equi* vilket även andra studier visat (Newton *et al.*, 1997). Baserat på material i detta försök erhålls en

sensitivitet på 61 % för denna iELISA att påvisa subkliniska smittbärare av *S. equi*. Det negativa prediktiva värdet (NPV) i denna studie ligger på 81%.

Ett antal fallgröpar förekommer i denna studie bland annat ojämna provtagningsintervall och varierande provtagningsmaterial för PCR analys, en annan faktor som kan påverka resultaten är den att, om en häst är provtagen vid fler än ett tillfälle förekommer resultat från den hästen vid mer än ett tillfälle i resultatsammanställningen. Trots kännedom om dessa felkällor betraktas resultaten som lovande och vidare studier på serologi som diagnostiskt hjälpmedel vid undersökning av subkliniskt bärarskap bör genomföras.

LITTERATURÖVERSIKT

Infektion med *S. equi*

Kliniska symptom som man ser vid kvarka varierar, främst beroende på hästens ålder där de yngre hästarna oftare drabbas av allvarligare kliniska symptom. Karakteristiskt för sjukdomen är att det börjar med en febertopp som efter 24-48 timmar övergår i hosta och näsflöde. Näsflödet kan till en början vara tunt men övergår inom kort till att vara purulent. Andra karakteristiska symptom man kan se vid kvarka är abscessbildning i lymfknutor, då vanligen i de submandibulära och retrofaryngeala lymfknutorna. Cirka en vecka efter infektion ses svullna och ömmande lymfknutor och serumutsvettning från lymfknutorna kan förekomma i flera dagar innan abscessen i lymfknutorna mognat och tillslut öppnat sig ut i huden. Då även de djupare belägna lymfknutorna är påverkade kan det ta längre tid innan abscessen öppnar sig ut i huden vilket kan ge upphov till bland annat andningssvårigheter i de fall då de angripna lymfkörtlarna är belägna i anslutning till andningsvägarna. I de fall då de retrofaryngeala lymfknutorna är påverkade kan de istället för att dräneras ut i huden öppna sig in till luftsäckarna och ge upphov till luftsäcksempyem, pus i luftsäckarna. Hosta är inte alltid förekommande men i de fall då det finns pus i luftsäckarna kan hosta förekomma samtidigt som stora mängder pus kommer från munnen och/eller nosen. Det är dock inte alla hästar som utvecklar dessa typiska symptom vid en infektion med *S. equi*. (Sweeney *et al.*, 2005). Det förekommer en atypisk form av kvarka, som främst drabbar äldre hästar. Dessa individer får endast en lindrig infektion och utvecklar således mildare symptom. Det man kan se hos dessa individer är ett lindrigt näsflöde, hosta och feber. Abscessbildning i lymfknutorna förekommer men det är inte lika vanligt som hos de individer som drabbas av mer allvarliga symptom (Reed, *et al* 2004).

Komplikationer som kan uppkomma efter infektion med *S. equi* är bland annat kastad kvarka som innebär att det bildas bölder i kroppens inre organ. Lungsäcksinflammation, immunmedierad vaskulit och myosit samt lunginflammation är andra komplikationer som kan förekomma (Reed, *et al* 2004). Hästar kan, efter genomgången infektion, även bli bärare av *S. equi* utan att visa kliniska symptom, det vill säga subkliniska smittbärare. Hos dessa individer finns bakterien vanligen i luftsäckarna (Sweeney *et al.*, 2005). Bakterien kan spridas till luftsäckarna genom att närliggande lymfknutor (retrofaryngeala lymfknutor) spricker och introducerar pus innehållande bakterier in till luftsäckarna varvid det bildas ett luftsäcksempyem. Hos vissa av de drabbade hästarna kommer luftsäcksempyemet att torka upp och utvecklas till så kallade kondroider (intorkat slem) som innehåller *S. equi*. Hos dessa

hästar kan bakterien utsöndras intermittent vilket innebär att dessa individer utgör en viktig smittkälla då de är kliniskt friska men samtidigt utsöndrar bakterien (Sweeney *et al.*, 2005).

Diagnostik av infektion med *S.equi*

Diagnos ställs utifrån den kliniska bilden tillsammans med påvisande av bakterien. Då bakterien kan vara svår att påvisa utesluter ett negativt provsvar inte diagnosen. Det finns olika metoder man kan använda sig av när man vill påvisa bakterien, bland annat kan man använda sig av odling eller Polymerase Chain Reaktion (PCR). Det material som man kan använda sig av vid påvisande av bakterien är till exempel svabbprover från näshålan, nässköljprover, prov från luftsäckarna eller böldsekret (Reed *et al.*, 2004). Vilket provtagningsmaterial man använder sig av beror på i vilket sjukdomsskede som hästen befinner sig i och vilka kliniska symptom som hästen uppvisar. Om hästen befinner sig i tidigt sjukdomsskede är den bästa analysmetoden ett nässköljprov som analyseras med PCR (Lindahl *et al.*, 2013), förekommer böldsekret kan man med fördel analysera detta genom ett prov taget med en svabb (Sweeney *et al.*, 2005). Vid misstanke om subkliniskt bärarskap är idag den bästa provtagningsmetoden prov taget från luftsäckarna genom endoskopering. Detta är dock en provtagningsmetod som kräver att hästen är sederad, vidare krävs det särskild utrustning samt kompetens hos provtagaren (Newton *et al.*, 1997). Förutom detta är det viktigt med noggrann rengöring och desinfektion av utrustningen mellan hästar. Sammantaget innebär det att denna provtagningsmetod inte alltid är genomförbar i fält.

Behandling

Behandling av kvarka beror på hur allvarliga symptom hästen uppvisar samt vilka symptomen är. De allra flesta fallen av kvarka behöver inte antibiotikabehandlas. I de fall som antibiotikabehandling krävs rekommenderas penicillin. Det finns idag inga tecken på resistensutveckling mot penicillin hos *S. equi* (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2013). Man kan överväga att sätta in antibiotika i ett tidigt sjukdomsskede för att förhindra uppkomst av bölder eller om hästen uppvisar mycket allvarliga kliniska symptom. Behandling utöver antibiotika beror på vilka symptom som hästen uppvisar. Man kan behöva behandla med antiinflammatoriska läkemedel så som NSAID om hästen har hög feber. Om hästen har svårt att få i sig näring kan man behöva ge dropp samt underlätta födointag genom att utfodra högt.

En annan viktig del i behandlingen är att förhindra spridning av bakterien. Besättningen bör spärras så att inga hästar får lämna anläggningen och inga nya hästar bör introduceras till besättningen. Hästar som är positiva för *S. equi* bör isoleras inom besättningen. Hästarna bör undersökas dagligen inklusive kontroll av temperatur för att man snabbt skall kunna identifiera smittade individer (Sweeney *et al.*, 2005). I Sverige finns det olika rekommendationer för agerande vid ett utbrott av kvarka, SVA rekommenderar att stallet hålls isolerat i fyra till sex veckor efter att sista hästen uppvisat symptom (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2013) och Svensk Travsport rekommenderar att stallet skall hållas isolerat i 20 dygn efter att sista hästen uppvisat symptom så som feber och/eller näsflöde (Svensk Travsport, 2013). En svårighet med att förhindra smittspridning är de hästar som är subkliniskt infekterade eftersom dessa ofta förbises då det ej finns någon snabb och enkel metod för att identifiera dem, samt att de ej uppvisar några kliniska symptom.

Smittspridning

S. equi är en mycket smittsam bakterie som smittar både direkt och indirekt så som genom kontaminerad utrustning, gemensamma utrymmen med mera. Kliniskt sjuka hästar utsöndrar stora mängder bakterier från bland annat näsflöde och böldsekret. *S. equi* kan även smitta från subkliniska smittbärare som inte visar kliniska symptom på sjukdom (Sweeney *et al.*, 2005).

Subkliniska smittbärare

Vid diagnostik av subkliniska smittbärare använder man sig idag av upprepade nässvabbprover eller nässvalgsköljprover alternativt provtagning från luftsäckarna (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2013). Provtagningen bör ske minst 30 dagar efter genomgången infektion då man annars kan få falskt positiva prover avseende bärarskap eftersom de flesta hästar utsöndrar bakterien i två till tre veckor (Sweeney *et al.*, 2005). Om man väljer att ta upprepade nässvabbprover eller nässköljprover rekommenderar SVA att man tar tre prover med fem till sju dagars mellanrum (Statens Veterinärmedicinska Anstalt, 2013).

I en studie av Newton *et al.*, (1997) har man studerat ett naturligt utbrott av kvarka hos 1500 hästar. Man har i denna studie undersökt hästarna med bland annat nässvabbar för att identifiera smittbärande individer och genom detta kunna kontrollera spridningen av sjukdomen. Förutom att man utvärderat hästarna med nässvabbar har man även undersökt luftsäckarna genom endoskopering samt provtagning av dessa genom sköljprover. Samtliga prover har analyserats genom bakteriologisk odling. Samtliga nya hästar som kom till anläggningen sattes i karantän och fick komma in till besättningen först efter tre nässvabbprover med en veckas intervall där samtliga var negativa avseende *S. equi*. De hästar som befann sig på anläggningen och som var sjuka sattes även de i karantän och efter att de tillfrisknat från de kliniska symptomen togs även hos dessa tre nässvabbar, hos dessa hästar var intervallen mellan provtagningarna dock längre än en vecka. Genom dessa kontrollmetoder kunde man identifiera sex subkliniska smittbärare varav två av dessa kom från hästar utifrån och som skulle in i besättningen. Hos de hästar som klassades som subkliniska smittbärare kunde man endast intermittent finna *S. equi* i nässvabbproverna och nässvabben kunde vara negativ samtidigt som man vid provtagning från luftsäckarna erhöll ett positivt resultat. I detta försök fick man sensitiviteten vid en provtagning med nässvabb till 45% och sensitiviteten för ett prov taget från luftsäckarna till 88%. Däremot så kunde man upptäcka alla utom en av de subkliniska smittbärarna genom nässvabbar tagna varje vecka under tre månaders tid. Hos hästarna i denna studie varierade bärarskapet i 7 till 39 månader och den huvudsakliga anatomiska lokaliseringen för bärarskapet var luftsäckarna. Det man fick fram i detta försök var att man kunde, genom upprepade provtagningar med nässvabbar finna alla utom en av de subkliniska smittbärarna men, om man följer rekommendationerna om tre provtagningar med nässvabbar var det ett flertal subkliniska smittbärare som man ej identifierade.

Andra studier har fått fram andra siffror på hur många hästar som efter ett naturligt utbrott av kvarka blir subkliniska smittbärare. Bland annat så har Newton *et al.*, (2000) gjort en studie i vilken de följt tre utbrott av kvarka. Syftet med detta försök var inte att undersöka hur vanligt det är med subkliniska smittbärare utan att utveckla en PCR för att påvisa *S. equi*, men för att göra det har man noggrant följt dessa tre utbrott och därigenom har man fått uppgifter på

förekomsten av subkliniska smittbärare i dessa utbrott. Man screenade samtliga individer med nässvabbar, och provtagning skedde varje vecka under flera veckor. Hos de hästar där man fann *S. equi* efter att de kliniska symptomen inte längre var synliga gick man vidare med endoskopering av luftsäckarna. Hur många av hästarna som man fann *S. equi* hos efter det att de kliniska symptomen ej längre var synliga varierade mellan 9 och 44% i de tre besättningarna. I detta försök var det vanligast att man fann bakterien i luftsäckarna hos de kliniskt friska hästarna och man fann att bakterien kunde finnas i luftsäckarna hos kliniskt friska hästar i upp till åtta månader. Eftersom hästarna i detta försök behandlades kan man inte uttala sig om hur länge ett bärarskap skulle kunna persistera utan behandling.

Verheyen *et al.*, (2000) har gjort en studie om hur man kan behandla subkliniska smittbärare. I detta försök har man genom upprepade nässvabbprover och PCR-undersökning av detta material identifierat 14 subkliniska smittbärare. Utöver dessa 14 hästar tillkom två hästar som blivit remitterade för subkliniskt bärarskap vilket innebär att man undersökt och behandlat totalt 16 hästar. Vid endoskopering av luftsäckarna fann man att 15 hästar hade kondroider och/eller empyem i en eller båda luftsäckarna. Behandlingen av dessa 16 subkliniska smittbärare gick ut på att kombinera antimikrobiell behandling med sköljning av luftsäckarna för att få bort allt främmande material. Om det fanns kondroider i luftsäckarna försökte man först ha sönder dessa så att man enklare kunde avlägsna dem. Hos vissa individer krävdes förutom oral systemisk behandling med Trimetoprim-Sulfonamid även lokal antibiotikabehandling i luftsäckarna. Författarna till denna studie diskuterar att man bör rikta behandlingen mot att eliminera inflammatoriskt material i luftsäckarna då det i de flesta fallen är detta som är orsak till det subkliniska bärarskapet. En inflammation kan även påverka lokal antimikrobiell behandling negativt. Även Sweeney *et al.*, (2005) menar att behandling av subkliniskt bärarskap bör utföras genom sköljning av luftsäckarna för att eliminera inflammatoriskt material som kan innehålla bakterier samt systemisk och/eller lokal antibiotikabehandling. Denna kombination av sköljning och antibakteriell behandling är enligt författaren, i de allra flesta fallen tillräcklig för att eliminera ett subkliniskt bärarskap.

Serologi som diagnostik av subkliniska smittbärare av *S. equi*

Serologi som diagnostiskt hjälpmedel

Serologi är en vanligt förekommande diagnostisk metod både när det gäller ställande av diagnos samt sjukdomsövervakning av både bakteriella infektioner och viroser. Det finns två olika metoder genom vilka man kan diagnostisera en sjukdom med hjälp av serologi. Man kan leta direkt efter antigen eller så kan man mäta specifika antikroppar riktad mot den sjukdom man vill undersöka. Det vanligaste provtagningsmaterialet som man använder sig av när man letar efter antikroppar är serum. Den mest frekvent använda metoden inom veterinärmedicin är enzyme-linked immuno sorbent assay (ELISA) och man letar vanligen efter specifika antikroppar. Metoden går ut på att man bekläder brunnar på en platta med det antigen som man vill undersöka. Dessa antigen skall då vara de samma som man vill leta antikroppar emot. Dessa beklädda brunnar kan man sedan spara till dess att man har serum som man vill undersöka. När man har serum som skall underökas för förekomst av antikroppar tillsätter man detta serum till brunnarna. Om det finns antikroppar i det serum man tillsatt kommer dessa att binda till de antigen som man beklätt brunnarna med. För att sedan kunna mäta om

det finns bundna antikroppar tillsätter man en lösning innehållande antiglobulin med ett enzym länkat till sig. Detta antiglobulin kommer i sin tur att fästa till de bundna antikropparna. Man tillsätter sedan ett substrat till det enzym, som genom antiglobulinet är bundet till antikropparna, och får då en färgförändring som man i sin tur kan mäta. På detta sätt kan man mäta om och i så fall hur mycket antikroppar som finns i det serum man tillsatt till brunnarna (Tizard 2009). I de studier som finns publicerade om den iELISA som mäter antikropp A och C finns inga siffror publicerade på dess precision.

Serologi vid diagnostik av *S.equi*

Den serologiska metod som är mest beskriven angående diagnostik av infektion med *S. equi* är en ELISA för SeM antikroppar. SeM är ett fibrinogen bindande protein (FgBP) (Davidson *et al.*, 2008). Anledningen till att denna ELISA utvecklades var bland annat att man behövde ett diagnostiskt hjälpmedel vid komplikationer till följd av kvarka så som purpura hemorrhagica och kastad kvarka. En annan anledning till att denna ELISA utvecklades är att, förekomst av höga nivåer av SeM antikroppar kan ge upphov till komplikationer vid vaccination mot kvarka (Pusterla *et al.*, 2003). Även om den inte utvecklades för detta ändamål så har man använt sig av denna ELISA för att diagnostisera kvarka. Studier gjorda på denna ELISA visar att infektionen inte nödvändigtvis måste vara pågående, inte heller behöver hästen vara bärare av *S. equi* utan positivt serologiskt svar med denna metod indikerar endast att hästen nyligen genomgått infektion med *S. equi* (Sweeney *et al.*, 2005). Sheoran *et al.*, (1997) har visat att serumnivåerna av SeM antikroppar stiger fem veckor efter infektion och fortsätter att vara höga minst sex månader efter genomgången infektion.

Bland annat Davidson *et al.*, (2008) har undersökt om man skulle kunna använda ELISA riktad mot SeM antikroppar som hjälpmedel vid diagnostik av subkliniska smittbärare av *S. equi*. Studiematerialet bestod av 30 ponnier, fyra till sex månader gamla som tidigare ej varit utsatta för smitta med *S. equi*. Dessa studerades under ett naturligt utbrott med kvarka. Man samlade in serum vid tre olika tillfällen, två månader innan utbrottet, en månad efter tillfrisknande samt fyra månader efter tillfrisknande. Förutom att samla in serum för serologisk undersökning togs prover för påvisande av *S. equi*. Dessa prover togs en, fyra respektive sex månader efter tillfrisknande och bestod av nässvabb och nässköljprover som undersöktes med odling och PCR. Sex månader efter tillfrisknande utfördes endoskopering av luftsäckarna där man förutom en visuell bedömning även tog prover för PCR-undersökning avseende *S. equi*. I denna studie ansågs en häst vara subklinisk smittbärare om den vid testet som utfördes sex månader efter tillfrisknande var positiv avseende *S. equi* på odling eller PCR på nässvabb/nässköljprov/prov från luftsäck och/eller om de hade avvikande utseende i luftsäckarna vid endoskopering. Baserat på dessa premisser fann man att fem hästar var subkliniska smittbärare, dock kunde man inte se något samband med bärarskap och positiva serologiska nivåer. Tre av dessa fem hästar som betraktades som subkliniska smittbärare hade antikropps nivåer som sjönk mellan en och fyra månader efter tillfrisknande. Man kunde inte se något samband mellan bärarskap och skillnaden i antikroppssvar jämfört med de hästar som ej betraktades som subkliniska smittbärare. Författarna till denna studie menar att det kan vara möjligt att subkliniska smittbärare uppvisar ett annorlunda antikroppssvar jämfört med de som blir av med smittan. Detta annorlunda antikroppssvar skulle kunna vara både att de uppvisar högre nivåer av antikroppar och/eller att antikroppsvaret kvarstår under en längre

period. Det är dock inget som de i denna studie kunnat bevisa. I detta försök kunde man varken genom antikropps-nivån eller en titerstegring av antikropps-nivån identifiera de subkliniska smittbärarna.

Kelly *et al.*, (2006) har gjort en studie i vilken de studerat genomet i N-terminalen av SeM hos *S. equi*. Man har studerat 60 isolat av *S. equi* från 27 av varandra oberoende utbrott av kvarka. I materialet i denna studie fann de 21 förändringar i DNA mellan de olika isolaten av *S. equi*. Förutom detta kunde de även finna en homolog hos *S. zooepidemicus* (SzM) som är näst intill identisk med delar av SeM hos *S. equi*. Detta utgör ett problem vid serologisk undersökning avseende SeM antikroppar då man kan få falska positiva värden om det serum man undersöker innehåller antikroppar riktade mot SzM.

År 2008 kom Animal Health Trust (AHT) ut med en ny iELISA som påvisar IgG antikroppar mot två för *S. equi* unika antigen, antigen A och C. Antigen A är ett fragment av SEQ2190 och AgC är den del av SeM som är unik för *S. equi*. Enligt tillverkarna av denna iELISA är syftet med dessa två antigen att man vill undvika falska positiva värden hos hästar som har antikroppar riktade mot SzM vilket är en reell risk då man använder sig av serologi riktad mot endast SeM. Ett positivt svar på denna iELISA indikerar, enligt tillverkarna, att hästen har ett serologiskt svar riktat mot *S. equi*, detta behöver dock inte vara det samma som att hästen är en subklinisk smittbärare. Ett negativt serologiskt resultat skall dock, enligt tillverkarna, innebära att hästen med största sannolikhet inte är bärare av *S. equi*. Denna iELISA marknadsförs som ett test vilket man skall kunna använda för att screena av besättningar för att fånga upp subkliniska smittbärare, som uppföljande provtagning efter ett utbrott av kvarka samt som diagnostik för atypiska fall av kvarka. (Knowles 2011). I en studie av Robinson *et al.*, (2013) har man jämfört denna nya iELISA som påvisar antikroppar riktade mot antigen A och C med den ELISA som påvisar antikroppar mot SeM som funnits på marknaden internationellt sedan en tid tillbaka. Syftet med detta försök var att undersöka om en iELISA som kombinerar två antikroppar, riktade mot antigen unika för *S. equi*, skall kunna användas inom kvarkadiagnostik. I denna studie beskriver författaren hur man kommit fram till antigen A och C. Det har skett genom studier av genomet hos *S. equi* och *S. zooepidemicus* för att identifiera genomsekvenser som är unika för *S. equi*. Man har sedan använt två av dessa unika genomsekvenser för att utveckla en iELISA som inte skall reagera på antikroppar riktade mot *S. zooepidemicus*. I detta försök ingick 89 hästar som hade *S. equi* diagnostiserat antingen genom nässvabb eller genom prov från luftsäckarna. Dessa hästar ingick i försöket som positiva kontroller. Som negativa kontroller ingick 139 hästar från Island, ett land som aldrig haft kvarka. På samtliga hästar utfördes ELISA riktad mot SeM antikroppar, (den som funnits på marknaden en längre tid), samt denna nya iELISA som påvisar antikroppar riktade mot antigen A och C. SeM ELISA identifierade 80 av de 89 positiva hästarna korrekt och 107 av de negativa hästarna, vilket ger en sensitivitet på 89,9% och en specificitet på 77%. iELISA för antikropparna A och C kombinerat identifierade 83/89 av de positiva kontrollerna och 138/139 av de negativa kontrollerna vilket ger en sensitivitet på 93,3% och en specificitet på 99,3%, för denna iELISA ansågs en häst vara positiv om minst en av antikropparna var positiv. Författarna till denna studie hävdar att denna iELISA där man kombinerar antikroppar riktade mot antigen A och C idag är den bästa kommersiellt tillgängliga serologiska metod för att utvärdera hästars exponering för *S. equi*.

MATERIAL OCH METODER

Provtagningar

På samtliga hästar som ingick i detta försök, dvs. både friska kontroller samt hästar från besättningar drabbade av kvarka, togs blodprov för serologisk undersökning. Blodproverna togs med vacutainer och blodet samlades upp i ett serumrör. Vi undersökte förekomsten av antikroppar riktade mot antigen A och antigen C i serum med en iELISA utvecklad av Animal Health Trust (AHT).

Hos de friska kontrollerna togs förutom blodprover för serologisk undersökning nässvalgsköljprover, hädanefter benämnt nässköljprover, för PCR undersökning avseende förekomst av *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Om någon av de friska kontrollhästarna uppmätte antikropps nivåer över cut-off värdet på en eller båda av de undersökta antikropparna utreddes hästen vidare med provtagning och endoskopering av luftsäckarna. Vid detta tillfälle gjordes även en ny provtagning med nässköljprov. Vid den eventuella andra provtagningen av de friska kontrollhästarna undersöktes både nässköljprovet samt de prover som togs från luftsäckarna med PCR avseende *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Hos de hästar som kom från besättningar sjuka i kvarka togs prover för PCR undersökning avseende *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Provtagningsmaterialet hos dessa hästar varierade mellan nässvabb, nässkölj och sköljprov från luftsäckarna. Samtliga nässköljprover, både på de friska kontrollhästarna och i de fall nässköljprover togs från hästar från sjuka besättningar, utfördes genom att en 50cm lång steril fölsond fördes upp in i ena näsborren i höjd med mediala ögonvinkeln. Näshålan spolades sedan med koksalt som samlades upp i en ren plastpåse. Koksaltvätskan som spolades upp i näshålan kom ut genom bägge näsborrarna och båda näshålorna samt nasofarynx där luftsäckarna mynnar har således spolats. Uppsamlingspåsen fick ej röra vid hästen, detta för att undvika kontamination. Uppsamlingspåsen hölls av en medhjälpare ett par centimeter nedanför nosen. Vätskan som samlades upp i plastpåsen fördes sedan över i ett 50 ml Falconrör® för transport till laboratorium. Nässvabbproverna togs med E-swab® genom att provtagningspinnen fördes upp i hela dess längd, ca 12 cm, i ena näsborren. Provtagningspinnen förvarades i Amies medium under transport till laboratoriet. Vid endoskopering och provtagning från luftsäckarna sederades samtliga hästar med Detomidin (Domosedan®, Orion Pharma Animal Health) eller Romifidin (Sedivet®, Boehringer Ingelheim Vetmedica) i kombination med Butorfanol (Butator®, Vetoquinol). Vid endoskoperingen studerades svalg samt båda luftsäckarna och fynden dokumenterades. Båda luftsäckarna provtogs där 40ml koksalt spolades igenom luftsäckarna och samlades upp för analys av *S. equi* både genom odling och PCR.

Vid samtliga provtagningar användes engångshandskar som byttes mellan de olika hästarna. Allt provtagningsmaterial var engångsförpackat och användes endast till en häst. Om någon häst behövdes bremsas desinficerades handtaget och snöret byttes mellan hästarna. Endoskopet desinficerades emellan hästarna (Cidex opa ®). Samtliga prover har analyserats av Statens Veterinärmedicinska Anstalt (SVA).

Analyser

PCR

Samtliga prover tagna med nässvabb, nässköljning eller genom endoskopering och provtagning i luftsäckarna har analyserats med en real-tids PCR på SVA. Denna PCR är baserad på *SodA* och *seeI* gener och kan skilja mellan *S. equi* och *S. zooepidemicus* (Båverud *et al.*, 2006). I denna studie var samtliga prover analyserade för förekomst av både *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Samtliga prover var analyserade på SVA. I de fallen där *S. equi* påvisades kunde denna PCR ej samtidigt påvisa *S. zooepidemicus*, detta beror på att denna PCR-metod använder en gemensam markör för både *S. equi* och *S. zooepidemicus* och en som är unik för *S. equi*.

Serologi

I detta försök användes en iELISA utvecklad av Animal Health Trust (AHT). Brunnarna innehåller antigen A eller antigen C och avläsning skedde vid OD_{450 nm} (optical density). Ett positivt resultat erhålls om OD_{450nm} > 0,45 vilket gäller för både antikropp A och antikropp C, ett negativt resultat erhålls om OD_{450nm} < 0,300. Svar som ligger mellan dessa två värden anses vara en gråzon. För detta försök användes cut-off värdet 0,45 vilket innebär att om OD för antikropp A och/eller antikropp C är >0,45 klassas det som ett positivt resultat. Därmed är de hästar som har serologiska värden mellan OD 0,3 och 0,45 i denna studie klassade som negativa. Om någon häst har exakta värdet 0,45 på serologin så har denna klassats som positiv i detta försök. För de serologiska testerna har serum använts, i denna studie har både färskt och fryst serum använts.

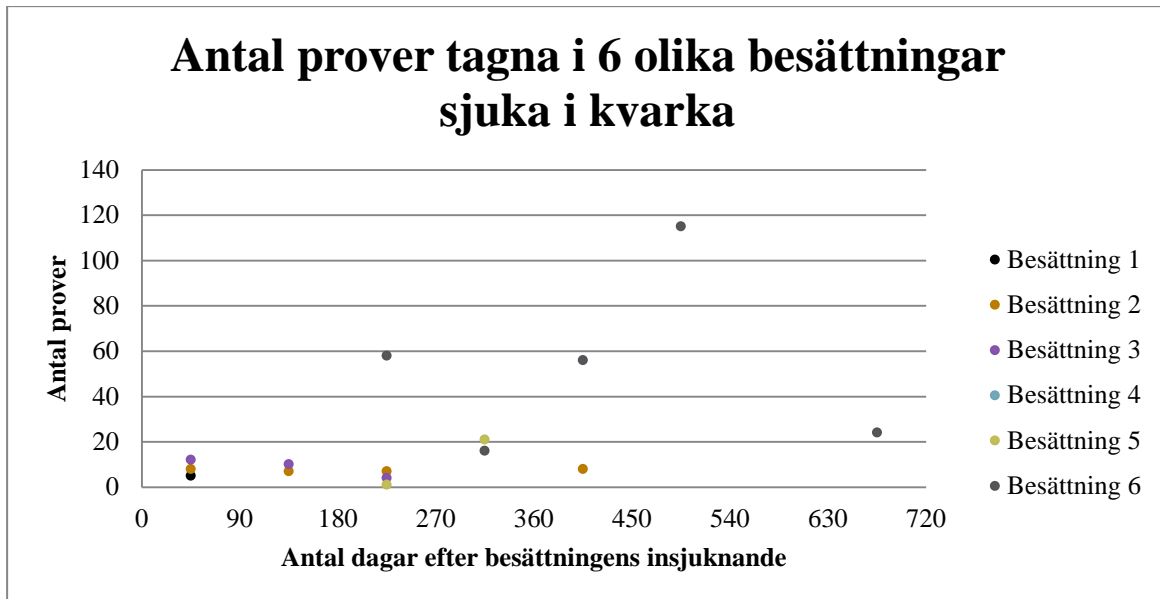
Besättningar sjuka i kvarka

I denna studie studerades sex besättningar drabbade av kvarka. Totalt från dessa besättningar är 93 hästar provtagna med serologi och material för PCR undersökning samtidigt vid minst ett tillfälle, ett flertal av dessa hästar är provtagna vid mer än ett tillfälle. För beskrivning av besättningarna se tabell 1.

Tabell 1 Besättningsbeskrivning av de besättningar sjuka i kvarka som ingår i detta försök

	Besättnings och sjukdomsbeskrivning	Provtagningar
Besättning 1	Besättningen består av fem hästar, av dessa är det tre som är provtagna med material för serologi och PCR undersökning vid samma tillfälle minst en gång.	4 provtagningsstillfällen, 28, 40, 47 och 62 dagar efter besättningens insjuknande
Besättning 2	I denna besättning är det fyra hästar som är provtagna.	13 provtagningsstillfällen, 65, 71, 80, 95, 99, 109, 203, 217, 224, 253, 378, 406 och 427 dagar efter besättningens insjuknande.
Besättning 3	I denna besättning är sex hästar provtagna. Denna besättning köpte in en ny häst som var sjuk när hon kom till besättningen. Då hon endast var snuvig och ej hade feber misstänkte inte ägarna att det var något allvarligt. Hon fick senare intorkat pus mellan ganascherna varvid ägarna misstänkte kvarka vilket även kunde konfirmeras.	8 provtagningsstillfällen, 49, 56, 62, 70, 82, 111, 138 och 234 dagar efter besättningens insjuknande.
Besättning 4	I denna bsättning finns det 12 hästar, det är dock endast en häst som är provtagen med PCR och serologi vid samma tillfälle	Provtagningsstillfälle okänt
Besättning 5	Denna besättning består av 16 hästar och samtliga hästar är provtagna.	3 provtagningsstillfällen, 241, 280 och 338 dagar efter besättningens insjuknande
Besättning 6	Besättning bestående av 68 hästar, antalet hästar varierar dock något under studieperioden. Totalt är det 63 hästar som är provtagna med PCR och serologi vid samma tillfälle minst en gång. Besättningen drabbades av kvarka i december 2011 varvid nästan alla hästar i besättningen uppvisade symptom på kvarka. Sista hästen uppvisade symptom i slutet av januari 2012. Under våren sanerades stallet samt målades om. Under mars-april 2012 anländer cirka nio nya hästar till besättningen och besättningen uppvisar ännu en gång symptom på kvarka, dessa symptom läker ut under april 2012. Under juni 2012 tas prover för PCR undersökning avseende <i>S. equi</i> . Vid denna provtagning är ett flertal individer positiva och man isolerar de positiva hästarna. I augusti 2012 togs nya prover och fortfarande testas ett flertal hästar positivt. Många hästar uppvisar även förstörade lymfknutor och slem i luftsäckarna. Under resten av 2012 samt under 2013 tas upprepade provtagningar varvid ett flertal hästar testas positivt, även flera hästar som antibiotikabehandlas. I skrivande stund, december 2013, är besättningen ännu ej friskförklarad.	9 provtagningsstillfällen, 187, 254, 297, 325, 424, 459, 466, 501 och 677 dagar efter besättningens första insjuknandedatum

Hos hästar från drabbade besättningar varierar provtagningsmaterialet som använts för PCR undersökning. De provtagningsmetoder som förekommer i detta försök är nässvabb, nässköljprov samt provtagning från luftsäckarna. För denna sammanställning har skildes ej de olika provtagningsmetoderna från varandra. Detta innebär att om en häst är positiv vid PCR-undersökning avseende *S. equi* i någon av de tidigare angivna provtagningsmetoderna anses denna häst vara positiv. Totalt förekommer 353 provtagningsstillfällen där hästarna är provtagna för både serologisk- och PCR-undersökning vid samma tillfälle. Detta medför att en häst kan förekomma vid mer än ett tillfälle i den totala sammanställningen. För fördelningen av dessa provtagningar se figur 1.



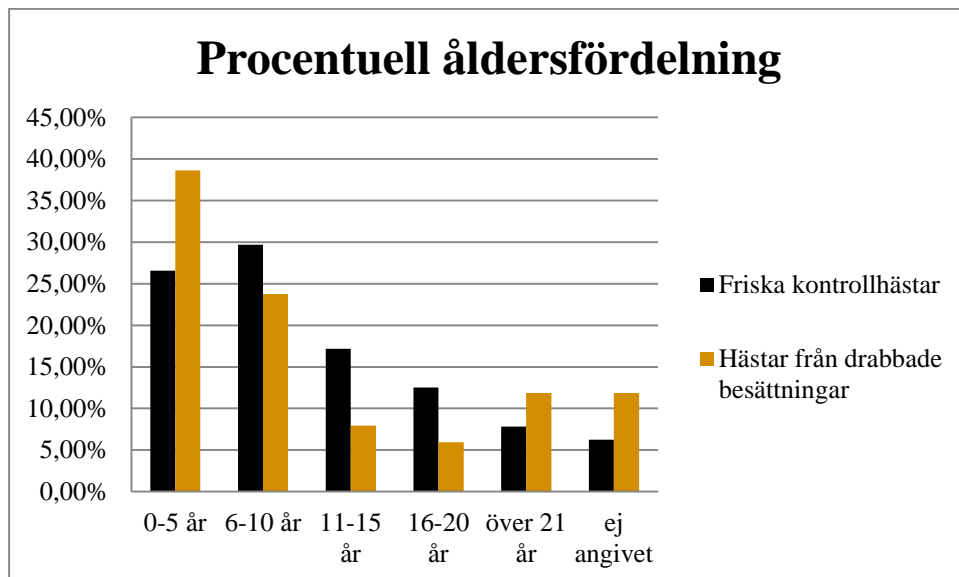
Figur 1 Antal prover tagna per besättning inom tidsintervallen 90 dagar. Proverna inom intervallen är tagna vid olika tidpunkter men är i denna figur förlagda till intervallets mittpunkt

Friska kontroller

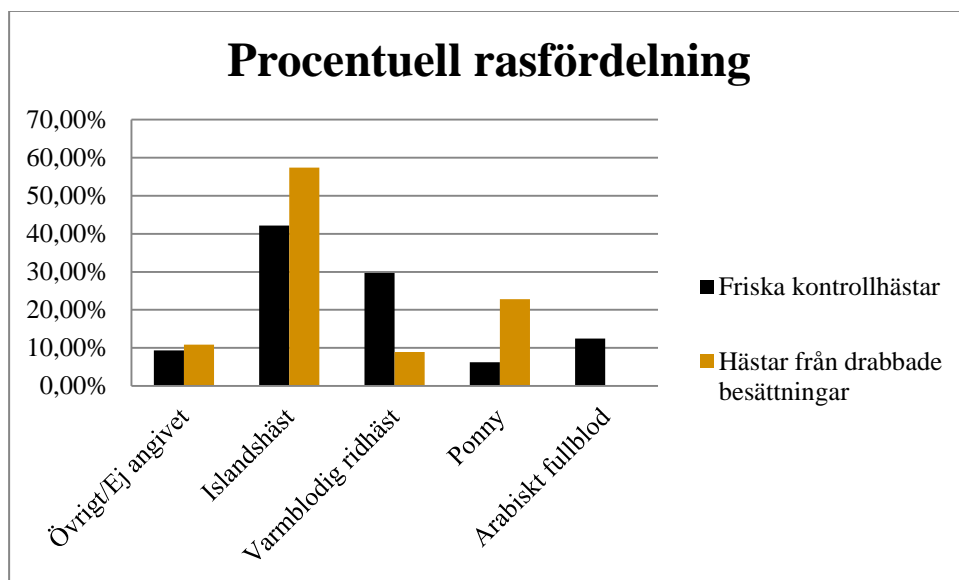
Totalt ingick 64 hästar som friska kontroller i detta försök fördelat på 8 olika besättningar. Vid urval av de friska kontrollerna valdes besättningar som skulle avspegla de besättningar som är drabbade av kvarka, för en jämförelse mellan kontrollerna och de hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka se figur 2-4. Samtliga ägare till de hästar som ingick som friska kontroller fick svara på en webbaserad enkät. Frågor som var inkluderade i denna var bland annat frågor gällande ålder, ras, kön på hästen och hur länge nuvarande ägare haft hästen samt frågor gällande besättningsstorlek. Andra frågor de fick besvara var om hästen någon gång haft misstänkt eller konstaterad kvarka, de fick även svara på om hästen någon gång varit i kontakt med någon annan häst som haft misstänkt eller konstaterad kvarka. Beroende på svar följde ett antal följdfrågor där ägarna kunde utveckla svaret med bland annat symptom, provtagningar och resultat av dessa provtagningar. Detta för att kunna följa upp samt få bakgrundsinformation om hästar som eventuellt skulle uppvisa positiva antikroppstitrar vid serologisk undersökning och/eller ett positivt svar på PCR gällande *S. equi*.

Jämförelse mellan friska kontroller och besättningar sjuka i kvarka

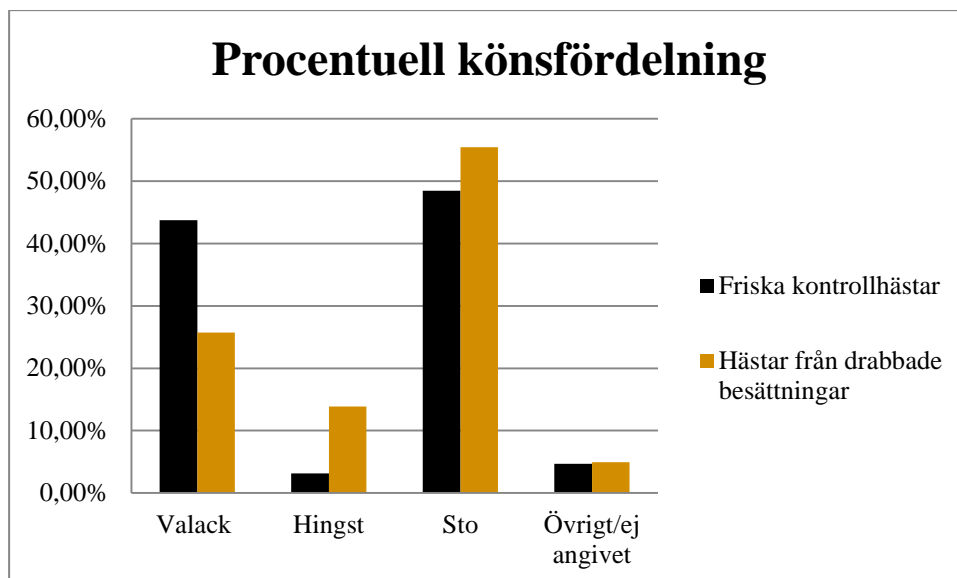
För en jämförelse mellan hästarna som kommer från drabbade besättningar och de friska kontrollhästarna se figur 2-4. Man kan utifrån dessa figurer se att, även om det ej valts ut en kontrollhäst per enskild häst i besättning drabbad av kvarka, är de två grupperna relativt lika fördelade vad det gäller ålder, ras och kön.



Figur 2 Jämförelse mellan friska kontrollhästar och de hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka gällande ålder



Figur 3 Jämförelse mellan friska kontrollhästar och de hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka gällande raser



Figur 4 Jämförelse mellan friska kontrollhästar och de hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka gällande kön

RESULTAT

Friska kontroller

På nässköljproverna var samtliga 64 kontrollhästar negativa avseende *S. equi*, däremot var 24 av hästarna positiva på PCR undersökning avseende *S. zooepidemicus*. Ingen av de hästar som var positiva för *S. zooepidemicus* vid PCR-undersökning av nässköljvätskan hade vid serologisk undersökning antikroppstitrar över cut-off värdet 0,45.

Tio av de friska kontrollerna hade, enligt enkätsvaren under det senaste året visat tecken på luftvägssjukdom. Hos en utav dessa individer togs det prover avseende kvarka. Vilka prover som togs framgår ej av enkätsvaret, ägaren har dock svarat att denna häst var negativ avseende kvarka. Hos de övriga nio hästarna har samtliga ägare svarat att det ej fanns misstänkt eller konstaterad kvarka i samband med luftvägssymptomen. Vid den provtagning som skedde för detta försök var samtliga av dessa tio hästar negativa vid PCR undersökning avseende *S. equi*, tre hade positiva resultat för *S. zooepidemicus*.

Friska kontroller med positivt serologiskt svar

Fyra av de friska kontrollhästarna hade antikropps nivåer över cut-off värdet (0,45) på antingen antikropp A eller antikropp C, dock hade ingen av dessa hästar positiva värden både på antikropp A och C. En av dessa fyra hästar föll bort på grund av flytt men de övriga tre hästarna undersöktes vidare genom endoskopering där prover togs från båda luftsäckarna för PCR-undersökning avseende *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Av dessa prover var samtliga negativa avseende *S. equi* men två hästar hade positiva PCR resultat för *S. zooepidemicus* vid provtagning i luftsäckarna. De två hästar som hade positiva resultat på *S. zooepidemicus* i luftsäckarna var dock negativa för *S. zooepidemicus* vid PCR-undersökning av nässköljvätskan både vid den första provtagningen samt vid den nässköljprovtagningen som skedde i samband med endoskoperingen, se tabell 2.

Häst 1

Islandshäst, sto, 14 år som har varit hos samma ägare i över tre års tid och står på en gård med 16 andra hästar. Hon har inte under de senaste 12 månaderna uppvisat några tecken på luftvägssjukdom och hon har heller inte under den tiden som ägaren haft henne haft misstänkt eller konstaterad kvarka. Hon har inte heller varit i kontakt med någon häst som haft konstaterad/misstänkt kvarka under den tiden som ägaren haft henne. För provtagningsresultat se tabell 2.

Häst 2

Solid Paint, sto, 8 år som har varit hos samma ägare i över tre års tid och står på en gård med 14 andra hästar. Hon har inte under de senaste 12 månaderna uppvisat några tecken på luftvägssjukdom och hon har heller inte under den tiden som ägaren haft henne haft misstänkt eller konstaterad kvarka. Hon har heller inte varit i kontakt med någon häst som haft konstaterad/misstänkt kvarka under den tiden som ägaren haft henne. För provtagningsresultat se tabell 2.

Häst 3

Varmblodigridhäst, valack, 12 år som har varit hos nuvarande ägare i ett år och står på en gård med sju andra hästar. Han har under de senaste 12 månaderna inte uppvisat några tecken på luftvägssjukdom och han har under den tiden som ägaren haft honom inte haft misstänkt eller konstaterad kvarka. Han har heller inte varit i kontakt med någon häst som haft konstaterad/misstänkt kvarka under den tiden som ägaren haft honom. För provtagningsresultat se tabell 2.

Tabell 2 Friska kontrollhästar med antikropps nivåer över cut-off värdet 0,45

	AkA	AkC	PCR analys av nässkölvätska	PCR analys av prov från luftsäckar
Häst 1	Pos (0,840)	Neg (0,280)	Negativ för både <i>S.equi</i> och <i>S.zooepidemicus</i>	<i>S.zooepidemicus</i> påvisad i vänster luftsäck, negativ för <i>S.equi</i>
Häst 2	Neg (0,040)	Pos (0,850)	Negativ för både <i>S.equi</i> och <i>S.zooepidemicus</i>	Negativ för både <i>S.equi</i> och <i>S.zooepidemicus</i>
Häst 3	Pos (2,000)	Neg (0,250)	Negativ för både <i>S.equi</i> och <i>S.zooepidemicus</i>	<i>S.zooepidemicus</i> påvisad i vänster luftsäck, negativ för <i>S.equi</i>

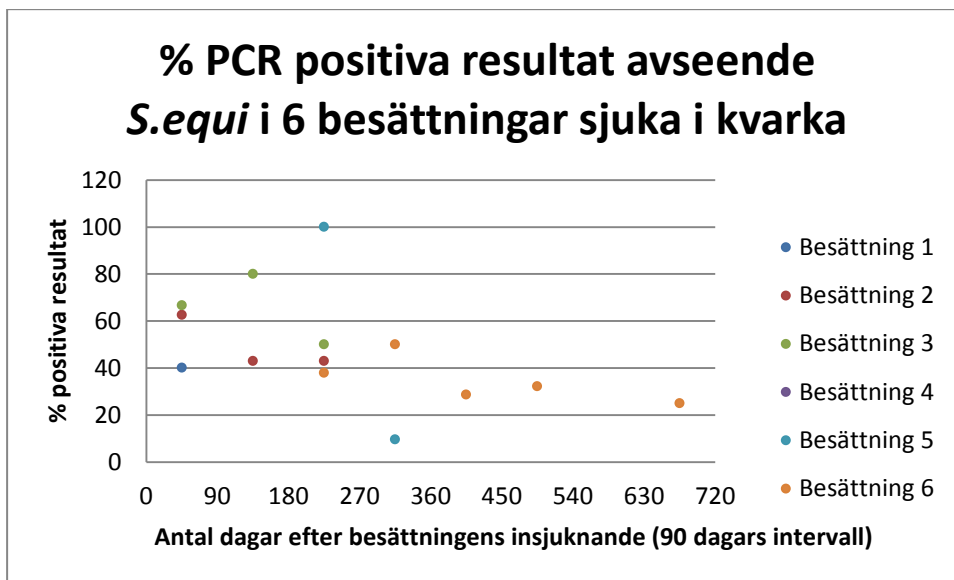
Om man istället för 0,45 skulle använt sig av cut-off värdet 0,3 på serologin var det nio av de friska kontrollerna som var positiva på serologin. Av dessa nio hästar var det två som var positiva för *S. zooepidemicus*, samtliga var negativa för *S. equi* vid PCR undersökning av nässkölvätskan. Av de två som var positiva för *S. zooepidemicus* och som hade antikropps nivåer över 0,3 var en islandshäst och den andra var ett halvblod, de kom från olika

besättningar och ingen av dessa hästar har under de senaste 12 månaderna haft tecken på luftvägsinfektion.

En av hästarna som ingick som kontroll, en valack på 4 år har vid ett tillfälle haft misstänkt kvarka. Han hade då näsflöde samt sprucken böld under ganachen. Provtagning vid sjukdomstillfället visade på *S. zooepidemicus*. Denna häst var vid nässköljprov positiv för *S. zooepidemicus* och den var negativ för både antikropp A och C vid serologisk undersökning.

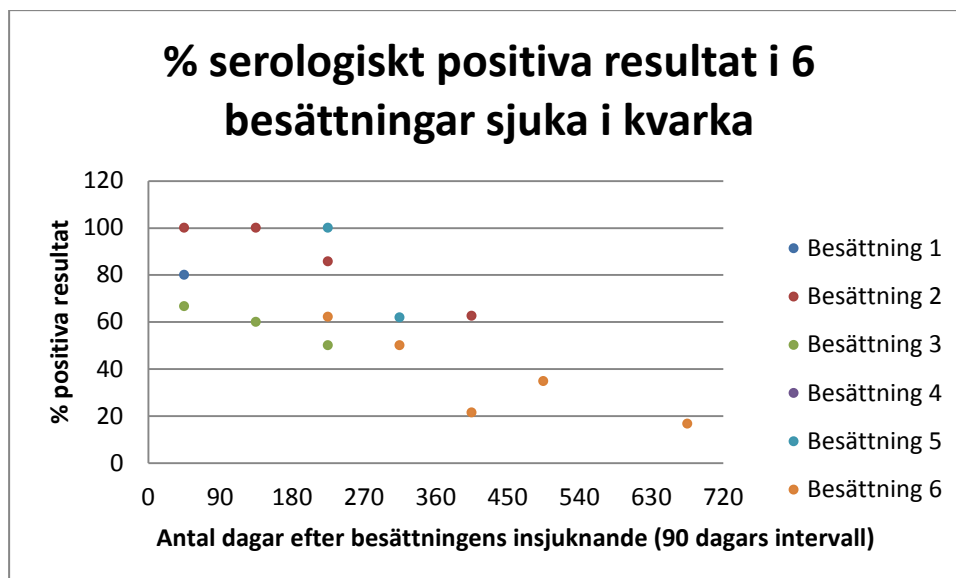
Hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka

Från de 93 hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka förekommer 353 provtagningstillfällen. För fördelning av PCR resultaten vid dessa provtagningar se figur 5.



Figur 5 PCR resultat avseende *S. equi* vid provtagningar i besättningar drabbade av kvarka fördelat på 90 dagars intervall. Proverna inom intervallen är tagna vid olika tidpunkter men är i denna figur förlagda till intervalllets mittpunkt. Om en besättning är provtagen vid mer än ett tillfälle inom intervallet är samtliga de provtagningarna samlade i en punkt.

Sammanställning av de serologiska resultaten har skett på bland annat besättningsbasis där sammanställningen har skett på samma sätt som för PCR resultaten, se figur 6. Man kan här se en trend där procenten hästar med positiva serologiska svar sjunker över tid efter besättningens insjuknande.



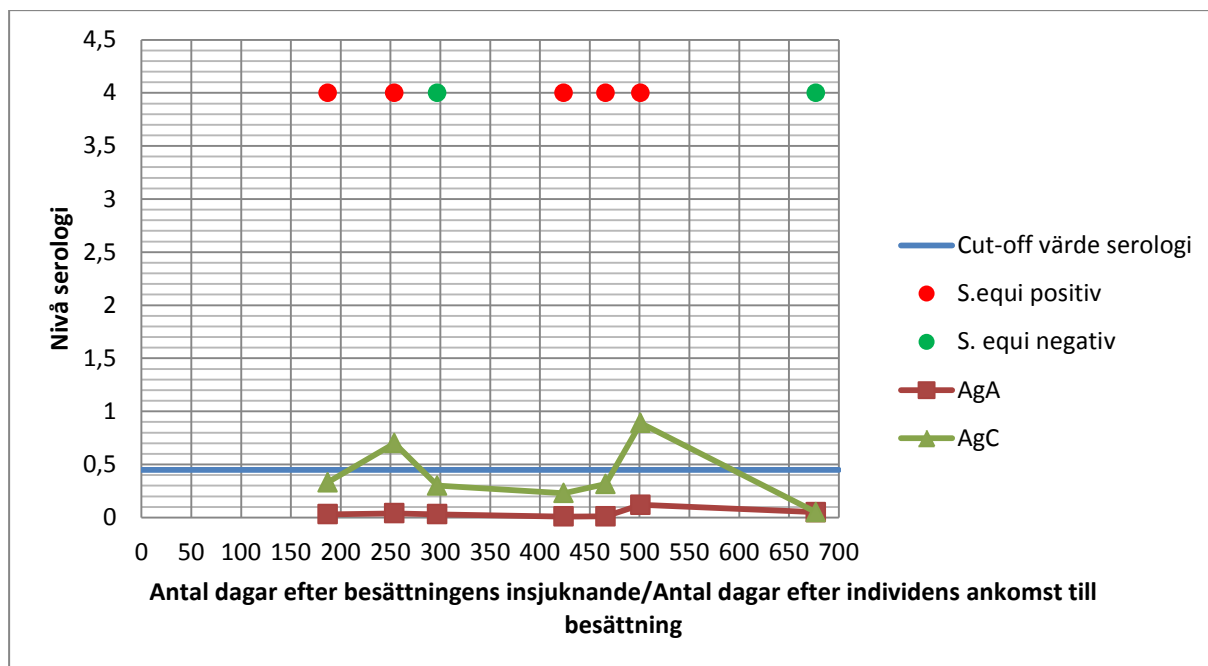
Figur 6 Serologiskt svar, kombination antikropp A och C i besättningar drabbade av kvarka fördelat på 90 dagars intervall. Proverna inom intervallen är tagna vid olika tidpunkter men är i denna figur förlagda till intervalllets mittpunkt.

Den serologiska datan blev även sammanställd per individ för att utvärdera hur det serologiska svaret ser ut efter naturlig infektion med *S. equi* se tabell 3. Det datum där första hästen i en besättning uppvisade symptom är satt till besättningens insjuknande datum, om någon häst inkommer till besättningen efter detta datum så är det datum där hästen ankom till besättningen satt som den individens insjuknande datum oavsett om eller när den uppvisade symptom.

Tabell 3 Exempel på hur provtagningsresultaten hos hästarna från de sjuka besättningarna sammanställts på individbasis

Besättningens insjuknandedatum:	2012-02-06					
Individens feberstart:	2012-02-17					
Provtagningsdatum	Dagar efter besättningens insjuknande	Dagar efter individens feberstart	AkA	AkC	<i>S. equi</i> (PCR)	<i>S. zoo</i> (PCR)
2012-04-11	65	54	0,54	0,81	Neg	Pos
2012-04-26	80	69	0,451	1,08	Neg	Neg
2012-05-15	99	88	0,46	0,87	Neg	Pos
2012-05-25	109	98	0,53	0,82	Pos	Neg
2012-10-16	253	242	1,22	0,32	Pos	Neg

Utifrån den data som finns på varje enskild individ har diagram gjorts över antikroppskurvan för antikropp A och antikropp C var för sig, se figur 7. I dessa diagram kan man även utläsa om hästen är positiv eller negativ på PCR avseende *S. equi*. Då provtagningsmaterialet för PCR undersökning varierar har det i detta försök ej särskiljts mellan de olika provtagningsmetoderna utan en häst anses vara positiv avseende *S. equi* om den vid någon av de olika provtagningsmetoderna erhåller ett positivt PCR resultat och man kan ur detta diagram ej utläsa vilket prov som är taget.



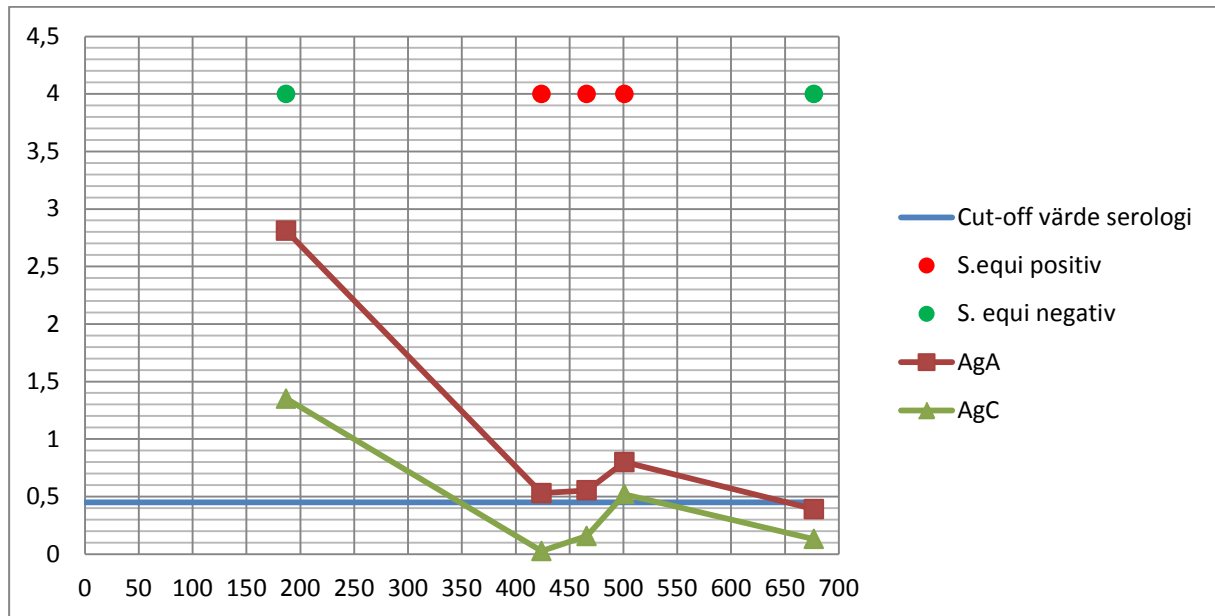
Figur 7 Förklaring över diagram provsvar på individbasis. På X-axeln ses antal dagar efter besättningens insjuknande och på Y-axeln ses det serologiska svaret. Man kan ur denna figur även avläsa om hästen är PCR positiv eller negativ avseende *S. equi*.

Det som bland annat observerats i denna studie är att man inte alltid fångar upp förekomst av *S. equi* om man endast provtar med nässvabb eller med nässköljprov. Exempel på detta ses i tabell 4.

Tabell 4. Häst från besättning sjuk i kvarka med negativa PCR resultat på nässvabb/nässkölj samtidigt som positiva PCR resultat på prov taget från luftsäckarna

Dagar efter individens feberstart	AntikroppA	AntikroppC	PCR <i>S. equi</i> nässvabb	PCR <i>S. equi</i> nässkölj	PCR <i>S. equi</i> luftsäck
56	0,86	2,3	Neg	Pos	
104	0,46	1		Pos	Pos
147	0,19	0,49		Pos	Pos
274	0,08	0,29		Pos	
316	0,05	0,56		Neg	Pos
351	0,07	1,4	Neg		Pos
527	0,06	0,39		Neg	Pos

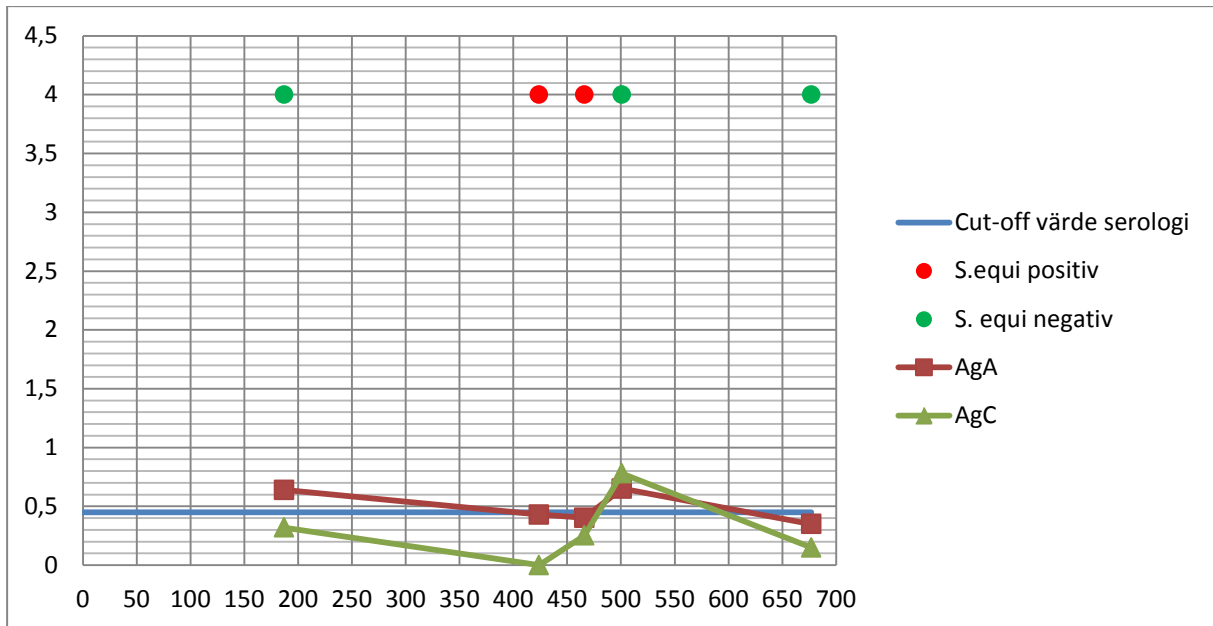
Vad som kunde utläsas ur diagrammen med antikroppskurvorna är bland annat att antikropp A och C uppvisar liknande kurvor, se figur 8. Dock ligger antikropp A och C ofta på olika nivå. Det man kan se hos de olika individerna är att den antikropp som ligger högst är den som kommer att vara högre hela studieperioden. Vilken antikropp det är varierar mellan de olika individerna.



Figur 8 Antikropps nivåerna för antikropp A respektive C uppvisar liknande kurvor där hos denna häst AKA ligger högst och fortsätter att vara den som ligger högst hela studieperioden

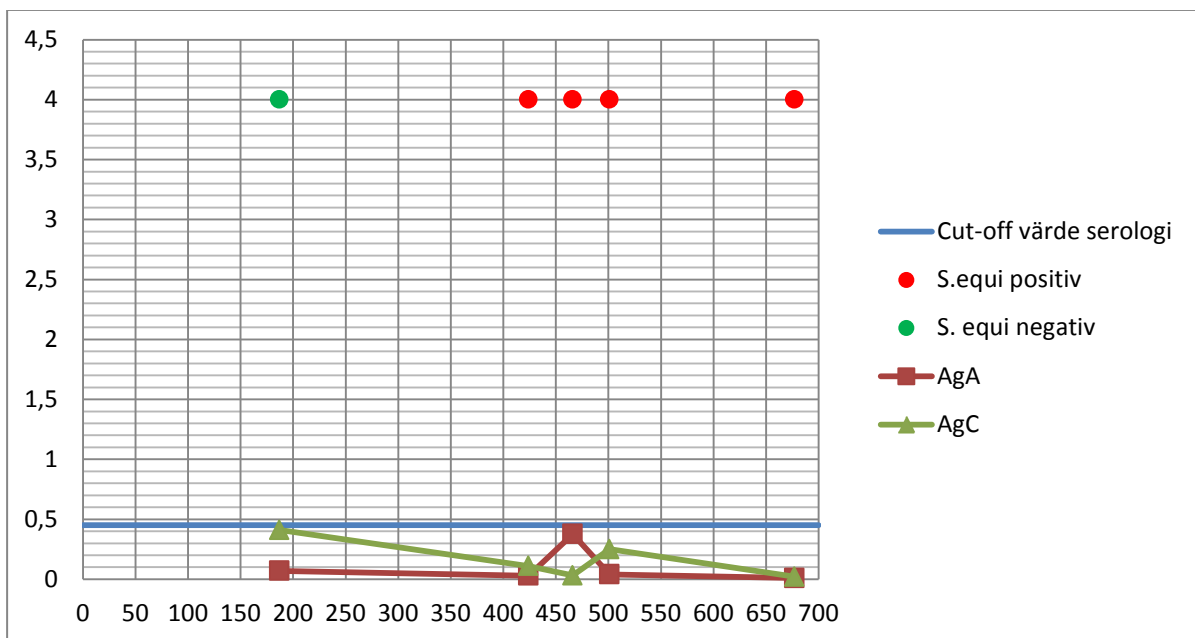
I figur 8 ses ett högt antikroppssvar vid den första provtagningen hos denna individ, vid detta provtagningstillfälle var hästen negativ avseende *S. equi* vid PCR undersökning. Man ser även att efter det första provtagningstillfället sjunker antikroppstiter. Hästen kan vid den första provtagningen vara falskt negativ på PCR undersökningen, ett annat möjligt scenario är det att hästen innan den första provtagningen var positiv avseende *S. equi* och därmed utvecklat ett högt serologiskt svar men att den vid första provtagningen var fri från bakterien men att det serologiska svaret ej hunnit sjunka ännu.

Man kan även se ett fördröjt antikroppssvar hos flera individer, se figur 9. Detta innebär att ett positivt serologiskt svar inte uppträder samtidigt som hästen är positiv på PCR avseende *S. equi*. Hur lång tid det serologiska svaret dröjer efter att en häst uppvisar positiva PCR värden kan man, med detta material ej svara på då både provtagningsintervallet och antal provtagningar varierar både inom en besättning samt mellan de olika besättningarna.



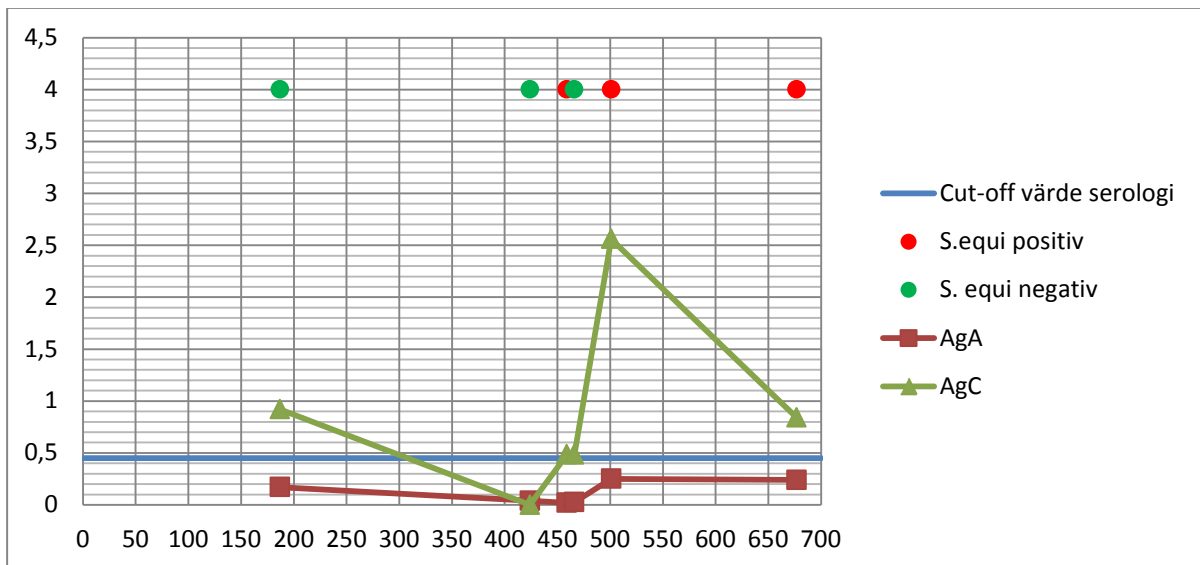
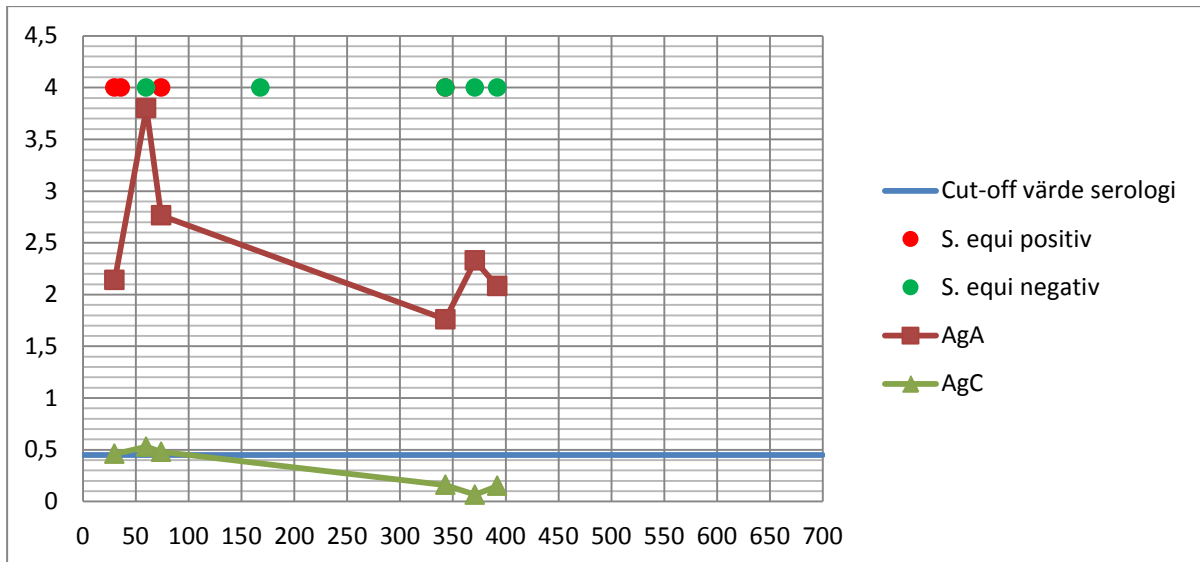
Figur 9 Fördröjt serologiskt svar efter det att en häst testas positivt avseende *S.equi* med PCR

Man kan se att hos ett flertal hästar finns det enstaka provtagningstillfällen där hästen har ett positivt resultat på PCR undersökning men att båda antikropparna ligger under cut-off värdet. Om PCR resultatet fortsätter att vara positivt så stiger även det serologiska svaret över cut-off värdet hos de flesta individer, se figur 9. Det finns dock vissa individer som aldrig stiger i antikroppstiter trots att de har positiva PCR resultat under en längre period, se figur 10.



Figur 10 Exempel på häst som trots positiva PCR resultat avseende *S.equi* aldrig uppvisar ett serologiskt svar över cut-off värdet 0,45

Det högsta serologiska svaret som uppmättes var på antikropp A 3,8 och på antikropp C 2,56, se figur 11.



Figur 11. *Högsta uppmätta svar på serologin var på antikropp A 3,8 och på antikropp C 2,56*

Serologiresultaten har sammanställts från samtliga 353 provtagningsstillfällen för de hästar som kommer från drabbade besättningar tillsammans med PCR resultaten avseende *S. equi*. Resultaten för antikropparna A och C är sammanställda var för sig samt för kombinationen antikropp A och C. För kombinationen antikropp A och C anses en häst vara positiv om minst en av antikropparna ligger över cut-off värdet 0,45. För PCR resultaten i denna sammanställning har det ej skett någon särskiljning mellan de olika provtagningsmetoderna som förekommer. För resultat hos de hästar som kommer från drabbade besättningar se tabell 5.

Tabell 5 Sammanställning serologiska resultat och PCR resultat avseende *S.equi* hos hästar från drabbade besättningar

	PCR positiv avseende <i>S.equi</i>	PCR negativ avseende <i>S. equi</i>	Totalt antal
<u>Antikropp A</u>			
Positiv	52	52	104
Negativ	72	177	249
Totalt	124	229	353
<u>Antikropp C</u>			
Positiv	54	57	111
Negativ	69	173	242
Totalt	124	229	353
<u>Antikropp A och C</u>			
Positiv	76	85	161
Negativ	48	144	192
Totalt	124	229	353

Resultat för samtliga hästar i försöket

Totalt sett finns det 417 provtagningstillfällen där material för PCR undersökning samt blodprover för serologi är analyserade. Vid sammanställning av samtliga provtagningstillfällen, erhöles följande resultat, se tabell 6.

Tabell 6 Resultat av antikropp A och C kombinerat samt PCR resultat med data från både sjuka besättningar och friska kontrollhästar

	PCR positiv avseende <i>S.equi</i>	PCR negativ avseende <i>S. equi</i>	Totalt antal
<u>Antikropp A och C</u>			
Positiv	76 (76+0)	89 (85+4)	165
Negativ	48 (48+0)	204 (144+60)	252
Totalt	124	296	417

Denna iELISA är tänkt att påvisa subkliniska smittbärare. Om man baserat på det material som finns i denna studie beräknar sensitiviten blir den $76/124 = 61\%$ och specificiteten blir på $204/296 = 69\%$. Det positiva prediktiva värdet (PPV) blir baserat på dessa resultat $76/165 = 46\%$ och det negativa prediktiva värdet (NPV) blir $204/252=81\%$, se tabell 6.

Om man från materialet i detta försök endast studerar de tillfällen där provtagningsmaterial från luftsäckarna förekommer får man kvar 116 provtagningstillfällen där 113 av dessa är från hästar som kommer från besättningar drabbade av kvarka och 3 är från friska kontrollhästar. För resultat av dessa provtagningar se tabell 7.

Tabell 7 Sammanställning resultat av de provtagningar där hästarna, både de från drabbade besättningar ($n=$ och friska kontroller ($n=3$), är provtagna från luftsäckarna

	PCR positiv avseende <i>S.equi</i> där prov från luftsäckar förekommer	PCR negativ avseende <i>S. equi</i> där prov från luftsäckar förekommer	Totalt antal
<u>Antikropp A och</u>			
<u>C</u>	46	25	71
Positiv	24	21	45
Negativ	70	46	116
Totalt			

Om man gör samma beräkningar som ovan baserat på dessa resultat fås en sensitivitet på $46/70 = 65\%$ och en specificitet på $21/46 = 46\%$, PPV $46/71=65\%$ och NPV $21/45=47\%$.

DISKUSSION

Provtagningar i besättningar drabbade av kvarka

Syftet med denna studie var att utvärdera en iELISA och dess möjligheter att diagnostisera subkliniska smittbärare av *S.equi*. För att göra detta har antikroppsvaret efter naturlig infektion med *S. equi* studerats hos 93 hästar. Det material som använts i denna studie kommer till stor del från provtagningar tagna för ett annat försök. Detta har medfört att det inte alltid är provtagningar optimala för denna studie och dess frågeställning, vilket har medfört vissa svårigheter med tolkningen av provsvaren.

Hästarna i detta försök har genomgått upprepade provtagningar i vilka material för förekomst av *S. equi* har undersökts med real-tidsPCR samt att serum undersökts för förekomst av antikropparna A och C. Genom dessa provtagningar har man bland annat kunnat studera hur antalet positiva hästar, både avseende *S.equi* samt förekomst av antikroppar, ter sig över tid. Vid analys av det serologiska svaret, se figur 6, kan man se en tydlig trendlinje där procenten hästar med positiva antikroppstitrar sjunker över tid efter besättningens insjuknande. Liknande observationer har gjorts vid studier av antikroppar riktade mot SeM, dessa antikroppar ligger högt minst 6 månader efter genomgången infektion (Sheoran *et al.*, 1997). Hur länge man ser ett positivt serologiskt svar avseende antikropparna A och C efter infektion med *S. equi* kan man baserat på detta material, ej avgöra då intervallen mellan provtagningarna varierar. Om man studerar besättning 6 i figur 6 kan man se att procenten positiva serologiska svar ökar från 21% i intervallet 361-450 dagar till 35% i intervallet 451-540 dagar. Detta kan förklaras om man går tillbaka till provtagningarna i besättning 6. Det gjordes en provtagning på ca 40 hästar 459 dagar efter besättningens insjuknande, vid detta tillfälle var fem hästar PCR positiva avseende *S. equi*. Bara en vecka senare, 466 dagar efter besättningens insjuknande, togs prover på ca 55 hästar, vid detta tillfälle var 16 hästar PCR positiva. Nya prover togs även 501 dagar efter besättningens insjuknande, det vill säga inom samma 90 dagars intervall. Vid denna provtagning påvisades *S. equi* vid PCR undersökning hos 18 hästar. Hos två av dessa fann man bakterien enbart i nässköljprov. Hos dessa individer utfördes även provtagning i luftsäckarna, och hos 16 av dessa påvisades bakterien i ena eller båda luftsäckarna. Om man även studerar hur fördelningen av PCR positiva/negativa i besättning 6 ser ut i detta tidsintervall, se figur 5, kan man se samma ökning, dock ej lika

tydlig. Det som man kan misstänka skett i denna besättning under detta intervall är, en ny spridning av *S. equi*. En anledning till att man ser en större procentuell ökning av det serologiska svaret jämfört med frekvensen PCR positiva hästar skulle kunna vara att det serologiska svaret kvarstår även efter att hästen blivit fri från bakterien vilket avspeglar sig i fler serologiskt positiva prover och därmed ett större utslag (Sheoran *et al.*, 1997).

Eftersom proverna är tagna med ett annat syfte än denna studie, varierar det provtagningsmaterial som använts för undersökning av förekomst av *S. equi*. Provtagning med nässvabb eller nässkölj är metoder som har lägre sensitivitet jämfört med provtagning från luftsäckarna när det gäller att diagnostisera bärarskap av *S. equi* (Newton *et al.*, 1997). Vid flera tillfällen hos hästarna från de drabbade besättningarna finns det endast prover tagna med nässvabb alternativt nässköljprov. Detta kan innebära att man missar en bakterieförekomst i luftsäckarna. Om man missar att hästen är bärare av *S. equi* innebär det även att man tolkar de serologiska resultaten felaktigt. Det finns hästar där man vid ett provtagningsstillfälle har analyserat prov från luftsäckarna vilket är positivt vid PCR undersökning avseende *S. equi* men samtidigt är prov taget med nässvabb eller nässkölj negativt, se tabell 4. Vid nästa provtagningsstillfälle har man endast tagit prov med nässvabb eller nässkölj och dessa prover har då varit negativa vid PCR undersökning avseende *S. equi*. Man kan i dessa fall ej vara säker på att hästen inte bär på *S. equi* eftersom man ej har analyserat material från luftsäckarna. Om man erhåller ett negativt resultat på nässvabb/nässköljprov vid PCR undersökning och samtidigt ett negativt serologiskt resultat kan man inte utesluta att hästen är falskt negativ på både PCR undersökningen avseende *S. equi* och serologin eftersom det kan finnas bakterier i luftsäckarna som man ej kunnat påvisa. Samma problem uppkommer om man vid PCR undersökning av nässvabb/nässkölj erhåller ett negativt resultat men på serologin erhåller ett positivt resultat. Eftersom man inte analyserat material från luftsäckarna vet man inte om hästen är sant eller falskt positiv på serologin.

Vid analys av antikroppskurvorna kan man göra ett antal intressanta observationer bland annat så kan man se att kurvorna för antikropp A respektive C uppvisar ett liknande mönster, se figur 8. Det man även kan se är att hos olika individer ligger den ena av de två antikropparna högre under hela studieperioden. Vilken antikropp som uppvisar det högsta värdet varierar både inom en besättning och mellan de olika besättningarna. Man kan även se ett fördröjt antikroppssvar efter att en häst är positiv på PCR avseende *S. equi*. Hur lång tid det tar innan en häst uppvisar positivt resultat på serologin kan med detta material inte avgöras då provtagningsintervallet varierar. Detta kommer dock att påverka resultaten negativt i denna studie då man får falskt negativa provsvar på serologin. Eftersom syftet med denna iELISA är att identifiera subkliniska smittbärare är det troligt att detta inte kommer att påverka det syftet i lika hög grad eftersom de hästar som är subkliniska smittbärare har burit på bakterien en längre tidsperiod och därmed bör de ha utvecklat ett antikroppssvar som påvisas vid den serologiska undersökningen. Det har däremot observerat ett antal individer som trots förekomst av *S. equi* under en längre period ej uppvisar ett positivt serologiskt svar. Dessa hästar kommer därmed ej att fångas upp om man enbart undersöker dem serologiskt. Möjliga anledningar till att en häst inte svarar med önskvärt serologiskt svar kan vara sjukdomsförloppet, individens immunsystem och/eller ett felaktigt svar på ELISA.

Friska kontrollhästar

Ingen av de friska kontrollhästarna som vid PCR undersökning var positiva för *S. zooepidemicus* hade antikroppstitrar över cut-off värdet 0,45. 64 individer är dock ett litet studiematerial men i denna studie finns det inget som tyder på att antikroppar mot *S. zooepidemicus* skulle ge falskt positiva serologiska svar.

Hos de friska kontrollhästarna genomförde vi, av ekonomiska skäl, endast nässköljprover vid den första provtagningen. Genom resonemanget ovan innebär detta således att man kan ha missat hästar som är bärare av *S. equi*. De kontrollhästar som hade antikroppstitrar över 0,45 utreddes vidare med endoskopering av luftsäckarna. Hos dessa kunde förekomst av *S. equi* ej påvisas i luftsäckarna eller vid nässköljprovet, se tabell 2. Man kan dock fortfarande inte utesluta att det bland de övriga 60 kontrollhästarna, som inte endoskoperades och det finns därmed inget prov från luftsäckarna, är bärare av *S. equi* med ett falskt negativt serologiskt svar.

Resultat för samtliga hästar i försöket

Eftersom man med detta test vill påvisa hästar som potentiellt skulle kunna vara bärare av *S. equi* är det önskvärt att testet har hög sensitivitet då vi inte vill missa hästar som är bärare av bakterien. Förutom att testet bör ha hög sensitivitet är det även önskvärt att testet har ett högt negativt prediktivt värde (NPV) för att med så stor säkerhet som möjligt kunna friskförklara de individer som har ett negativt serologiskt resultat. Baserat på den data vi har i detta försök uppnås en sensitivitet på 61% och ett NPV på 81%. Man kan dock inte dra alltför stora slutsatser av dessa värden då, som diskuterat ovan, är materialet som vi använt oss av i denna studie taget med ett annat syfte vilket innebär att det inte alltid är optimala prover tagna. Det har i dessa beräkningar inte tagits hänsyn till att samma individ förekommer flera gånger vilket innebär att en häst kan påverka resultatet i större utsträckning om den förekommer vid flera tillfällen. Då det totalt finns 420 provtagningstillfällen fördelat på 157 hästar innebär det att en häst förekommer i snitt 2,68 gånger i resultatet vilket påverkar de statistiska beräkningarna. Då en häst förekommer mer än en gång i sammanställningen Vid utvärdering av ett nytt test utgår man från ett test som man kallar gold standard. I detta fall utgicks det från att de individer som är positiva på PCR avseende *S. equi* bär på bakterien och de som är negativa ej bär på bakterien. När man använder sig av PCR kommer man även att kunna påvisa bakterier som är döda. Detta innebär att man kan få falskt positiva hästar och då PCR är en känslig metod kan det även förekomma falskt positiva värden på grund av kontamination från omgivningen eller andra hästar. Eftersom det förekommer ett flertal tillfällen där endast provtagning med nässvabb eller nässköjning gjorts innebär det att det troligen finns ett flertal hästar som är falskt negativa då man om man inte tar prov från luftsäckarna kan missa en bakterieförekomst (Newton *et al.*, 1997). Eftersom man med detta test vill finna hästar som är subkliniska smittbärare är det viktigaste att man inte missar hästar som bär på bakterien. Detta innebär att det är önskvärt att testet har ett högt negativt prediktivt värde. Med ett högt NPV får man få individer som är falskt negativa, det vill säga få individer som är subkliniska smittbärare men som testas negativt. Baserat på materialet i denna studie fås ett NPV på 81%, se tabell 6. Det är även önskvärt att testet har en hög sensitivitet för att inte missa bärare. Nackdelen när man har ett test med hög sensitivitet är att man får ett ökat

antal falskt positiva. I detta fallet innebär det att en häst kan testas positivt för bärarskap trots att den inte är bärare. Det innebär för den enskilda individen att man går vidare med endoskopering och provtagning av luftsäckarna i onödan. Detta är dock för den hela populationen sett bättre än om man missar hästar som är bärare om man har som mål att utrota bakterien ur en population.

Konklusion

Denna studie visar på att serologi som diagnostiskt hjälpmedel vid subkliniskt bärarskap av *S. equi* har stor potential. Det man kan tänka sig för framtida användningsområde för detta test är bland annat att undersöka förekomst av smittbärare i en besättning med okänd smittstatus eller som uppföljande kontroll efter utbrott av kvarka för att finna hästar som blivit kroniskt infekterade. Detta test skulle i framtiden kunna användas som komplement till befintlig diagnostik. Man kan först, genom ett serologiskt prov identifiera hästar som möjligen bär på bakterien och sedan gå vidare med endoskopering av enbart dessa individer. Man har då förhoppningsvis sållat bort de hästar som inte bär på bakterien, det vill säga har ett negativt serologiskt svar, och man har då kvar ett mindre antal hästar som man behöver gå vidare med provtagning i luftsäckarna hos. Det krävs dock vidare studier innan man kan börja använda det i praktiken.

REFERENSER

Animal Health Trust [online] (2013-09-21)

Tillgänglig: http://www.aht.org.uk/skins/Default/pdfs/DefraApr-Jun11_Focus1.pdf.

Båverud, V., Johansson, SK., Aspan, A. (2007). Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zoepidemicus*. *Veterinary microbiology*, 124, 219-229.

Davidson, A., Traub-Dargatz, JL., Magnuson, R., Hill, A., Irwin, V., Newton, R., Waller, A., Smith, K., Callan, RJ., 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, 457-462.

Kelly, C., Bugg, M., Robinson, C., Mitchell, Z., Davis-Poynter, D., Newton, JR., Jolley, KA., Maiden, MCJ., Waller, AS. (2006). Sequence Variation of the SeM Gene of *Streptococcus equi* Allows Discrimination of the source of Strangles Outbreaks. *Journal of clinical microbiology*, 44, 480-486

Knowles, EJ. (2011) *Focus Article: Serological ELISA test for Streptococcus equi (Strangles)*
http://www.aht.org.uk/skins/Default/pdfs/DefraApr-Jun11_Focus1.pdf [2013-11-01]

Lindahl, S., Båverud, V., Egenvall, A., Aspán, A., Pringle, J. (2013). Comparison of Sampling Sites and Laboratory Diagnostic Tests for *S. equi* subsp. *equi* in Horses from Confirmed Strangles Outbreaks. *Journal of veterinary internal medicine*, 27, 542-547.

Newton, JR., Verheyen, K., Talbot, NC., Timoney, JF., Wood, JLN., Lakahni, KH. (2000). Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine veterinary journal*, 32, 515-532

Newton, JR., Wood, JLN., Dunn, KA., DeBrauwew, MN., Chanter, N. (1997). Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *The Veterinary Record*, 140, 84-90.

Pusterla, N., Watson, JL., Affolter, VK., Magdesian, KG., Wilson, WD., Carlson, GP. (2003). Purpura hemorrhagica in 53 horses. *Veterinary record*, 153, 118-121.

Reed, SM., Bayly, WM., Sellon, DC. (2004). *Equine Internal Medicine*. 2. Uppl., Saunders elsevier. 7, 308-312.

Robinson, C., Steward, KF., Potts, N., Barker, C., Hammond, T., Pierce, K., Gunnarsson, E., Svansson, V., Slater, J., Newton, JR, Waller, AS. (2013). Combining two serological assays optimises sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure. *The veterinary journal*, 197, 188-191

Sheoran, AS., Sponseller, BT., Holmes, MA., Timoney, JF. (1997). Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. *Veterinary immunology and immunopathology*, 59, 239-251.

Statens Veterinärmedicinska Anstalt [online] (2013-01-30)

Tillgänglig: <http://sva.se/sv/Djurhalsa1/Hast/Infektionssjukdomar/Kvarka/>. [2013-09-09]

Svensk Travsport [online] (2010-09-21)

Tillgänglig: https://www.travsport.se/polopoly_fs/1.574!/menu/standard/file/smittykyd . [2012-11-25]

- Sweeny, RS., Timoney, JF., Newton, JR., Hines, MT. (2005). *Streptococcus equi* infection in horses: guidelines for treatment, control and prevention of strangles. *Journal of veterinary internal medicine*, 19, 123-134.
- Tizard, IR. (2009). *Veterinary immunology an introduction*. 8. uppl., Saunders elsevier. 38, 513-515.
- Verheyen, K., Newton, JR., Talbot, NC., De Brauwere, MN., Chanter, N. (2000). Elimination of guttural pouch infection and inflammation in asymptomatic carriers of *Streptococcus equi*. *Equine veterinary journal*, 32, 527-532.