

Slutrapport

Flertalet "laborativa" moment har gjorts i tidigare faser av projektet. Detta anslag avser tid att få möjlighet att slutföra projektet och redovisa resultaten i form av vetenskapliga artiklar.

Bakgrund

Det är välkänt att infektion med den fästingöverförda bakterien *Anaplasma phagocytophilum* (namnändrad–tidigare *Ehrlichia equi*) kan ge upphov till akuta febertillstånd hos hästar –även i Sverige. Kronisk infektion hos häst med denna organism finns inte beskriven i litteraturen. Hos andra djurslag har närbesläktade infektionsämnen setts orsaka persistent infektion t.ex. *Ehrlichia phagocytophila* hos får och *Ehrlichia canis* hos hund. Huruvida kronisk infektion förekommer hos häst är oklart. I Sverige idag är det inte ovanligt att hästar med olika kroniska och/eller diffusa symtom på sjukdom såsom trötthet, diffusa hältor, neurologiska symtom, ovilja till ridning, stelhet och olika betendeförändringar provtas med frågeställningen antikropps-förekomst mot ehrlichia. En del veterinärer tycker sig se ett samband mellan antikropps-förekomst och symptom enligt ovan och ett antal hästar behandlas idag mot misstänkt kronisk ehrlichios med tetracykliner. Vanlig behandlingsregim är daglig intravenös injektion av oxytetracykliner (6 mg/kg) under 3-7 dagar.

Vår forskargrupp har tidigare publicerat en studie av seroprevalensen av *Ehrlichia equi* hos 2018 svenska hästar med demografiska och kliniska data i samarbete med ATG:s hästkliniker. Studien visade att exposition för infektionsämnet är vanligt förekommande och många hästar hade antikroppar utan att ha varit akut sjuka. Totalt hade 16,7% av hästarna i denna studie antikroppar mot ehrlichia. Det var ingen skillnad i seroprevalensen mellan de friska hästarna (400 st) och hästarna som hade olika symptom på sjukdom. Seroprevalensen varierade avsevärt i olika delar av landet. I Mälardalen och östra mellansverige sågs de högsta frekvenserna där var fjärde till var tredje häst var antikroppspositiv. Forskargruppen har även utvecklat en PCR-metod för att påvisa bakterie-DNA direkt, t.ex. i blod och den används numer i rutindiagnostiken vid Statens Veterinärmedicinska Anstalt i Uppsala. Bakterien som lever intracellulärt är mycket svår att odla och vanlig bakterieodling är inte användbar för rutindiagnostik.

Material och metoder

Experimentell infektion med *Anaplasma phagocytophilum* utfördes hos sex hästar i syfte att studera dels den akuta infektionsfasen med en svensk anaplasma-stam (som tidigare visat sig skilja sig i några basparspositioner vid sekvensering av 16S rRNA-genen från den tidigare oftast rapporterade amerikanska, californiska stammen), dels om det förekommer persistens av bakterien i kroppen under en längre tid, och dels att i så fall undersöka om en ev. persistens var förknippad med kliniska symptom på sjukdom.

Sex kliniskt friska och ehrlichia-seronegativa hästar ingick i studien som utfördes under vinter och tidig vårsäsong. Hästarna stallades upp i en försöksdjursavdelning vid Sveriges lantbruksuniversitet (SLU) åtskilda från andra hästar. De tilläts vistas utomhus i sandpaddock dagtid. Hästarna inokulerades med blod från en svensk häst som var naturligt infekterad och med konstaterad akut ehrlichios. Infektionsdosen för 2 av hästarna var ca 20×10^6 infekterade neutrofiler och för de övriga 4 hästarna ca 6×10^6 infekterade neutrofiler. Inokulatet sekvenserades avseende generna 16S rRNA (1428 baspar), *groESL* (1339 baspar) och *anka* (1735 baspar). 16S rRNA-genen visade sig vara identisk med motsvarande gen från tidigare beskrivna svenska isolat. Hästarna studerades kliniskt, serologiskt, kliniskt-kemiskt (Hb, vita, diff, morfologisk bedömning av förekomst av ehrlichia-inklusioner i neutrofilernas cytoplasma, trombocyter, ALP,) och med PCR-teknik på helblod. Varje dag utfördes på varje häst en fullständig klinisk undersökning inkluderande även kontroll av rörelser och ev. neurologisk påverkan. Förloppet följdes under ca 4 månader. Olika åtgärder utfördes i konvalescensfasen i syfte att immunosupprimera hästarna, såsom upprepade injektioner av av

dexametazon (0,1 mg/kg i.m. dagligen i tre dagar), stresspåverkan i form av att springa i snabbt trav på rullmatta samt 4 timmars resa i hästtransport. Dessa åtgärder vidtogs i syfte att detektera eventuell dold persistens av infektionen med hypotesen att detta lättare skulle kunna detekteras vid supprimerat immunsystem. Efter observationsperioden avlivades hästarna och obduceras vid institutionen för patologi, SLU. Prov från inre organ analyserades bakteriologiskt, histologiskt samt med PCR-teknik på vävnad från samtliga inre organ för ev. förekomst av ehrlichia-arvsmassa. (Specifikation av metodologi, analysmaskiner, infärgning av utstryk och morfologisk bedömning, PCR-metodik och övrig metodik har beskrivits mer utförligt i artikel publicerad i *Journal of Veterinary Internal Medicine* 2005;19:232-239. Studien har beviljats etiskt tillstånd från Försöksdjursetiska nämnden i Uppsala.

Resultat

Akut fas:

Samtliga hästar utvecklade klassiska symtom på akut ehrlichios 6-9 dagar efter inokulationen. Symptomen överensstämde väl med de som tidigare beskrivits för den Californiska stammen av *Anaplasma phagocytophilum*. Högre infektionsdos medförde kortare inkubationstid. En av hästarna som fick den högre infektionsdosen dog plötsligt och oväntat efter 2 dygns klinisk sjukdom. Fram till dess hade hästen uppvisat identiska symtom med de övriga hästarna. Den andra hästen med hög infektionsdos uppvisade samma förlopp som de övriga 4 hästarna. Hästen med det oväntade dödsfallet har beskrivits i en separat artikel ([Vet Rec.](#) 2007 Jan 27;160(4):122-5) pga av det högst ovanliga förloppet och hästen exkluderades ur sammanställningen av de övriga hästarnas förlopp. Alla kvarvarande hästar utvecklade en mild till måttlig övergående leukopeni, neutropeni, lymfopeni, trombocytopeni och anemi (figur 1). Symptomens inträdande och duration beskrivs i figur 2. Feber var det första symtomet. Påvisbara inklusionskroppar i blodutstyck (som utgör ett diagnostiskt kriterium) detekterades i medeltal först 2 dagar efter feberns inträdande. PCR-testen var positiv redan några dagar före första symptomdebuten och förblev så flera dagar efter det att de kliniska symptomen vid den akuta fasen avklingat (figur 3). Samtliga hästar serokonverterade dag 12-16 efter inokulationen och nådde maximala titrar inom 3-7 dagar. Två av hästarna hade fortfarande kliniska symtom vid tidpunkten för serokonversion.

Konvalescensfas:

Tjugoen dagar efter inokulationen var samtliga 5 hästar fria från symtom. Ingen häst hade behandlats med antibiotika. Resultaten från PCR-analyserna i blod ses i figur 4. Under dag 22-66 var enstaka hästar PCR-positiva under enstaka dagar. Det kunde också noteras att vissa men inte alla av hästarna slog om och blev PCR-positiva i anslutning till eller strax efter dexametazonbehandling samt att båda de hästar som utsattes för stressmoment i form av längre vägtransport tillfälligt slog om och blev PCR-positiva (figur 4). Rullmattestress gav dock inte någon sådan effekt. Ingen häst visade i konvalescensfasen inklusionskroppar i neutrofilerna oavsett pcr-positivitet eller inte. Det var heller inte möjligt att se några kliniska symtom på sjukdom i konvalescensfasen i samband med stress eller pcr-positiv period. En häst var pcr-positiv dag 128 och 129 efter inokulation dvs de två sista dagarna i försöket. Serologiskt sågs en successiv sänkning av antikroppstitrar från maximal titer på vanligen 1:1280 till som regel 1:160 vid studiens slut.

Hos två av hästarna sågs en försöksteknisk relaterad komplikation till den permanentkateter som användes för att slippa sticka hästarna dagligen. I ett fall uppstod en tromboflebit lokalt i jugularvenen och i ett fall uppstod en bakteriell sådd från en kateter resulterande i en pneumoni med feber (med växt av *Staf.aureus* i bakt.odling av trakealinspirat) som svarade kliniskt på penicillinbehandling (*Anaplasma phagocytophilum* är resistent mot penicillin). I övrigt så var hästarna i stort sett fria från symtom på sjukdom under hela konvalescensperioden.

Obduktion:

Två av hästarna hade förändringar relaterade till långtids intravenös katerisering enligt ovan; i det ena fallet miliära lungabscesser med bakteriologisk växt av *Staph. aureus* och i det andra fallet en trombos i vena jugularis. Övriga makroskopiska eller mikroskopiska fynd vid undersökning av samtliga organ och vävnader på samtliga hästar var milda och ospecifika och av den karaktär som ofta ses som bifynd vid en detaljerad obduktion av vuxna hästar, oavsett dödsorsak och bedömdes utan klinisk signifikans. Rutinbakteriologisk odling från inre organ var samtliga negativa frånsett den ovan nämnda lunginflammationen. Prov från samtliga inre organ från samtliga hästar var alla negativa vid PCR-analys för ehrlichia-DNA.

Beträffande det oväntade dödsfallet så var huvudfyndet utbredda blödningar i flera organ och vävnader. Peteciella blödningar och echymoser sågs i nässlemhinnan liksom intramuskulära och subcutana blödningar i främre muskelpartier, fritt blod i brösthålan, multifokala, petechiella blödningar i brösthåla, diafragma och i lungparenchym och i myocardiet samt ödem i preputiet. Mikroskopiskt mest framträdande förändringar sågs i njurrana där glomeruli var svullna och igensatta och i njuren sågs vidare nekrotiserade inflammation i kärlväggar ofta i kombination med perivaskulära mononukleära cellinfiltrat och blödningar. Dessutom sågs hyalina tromber i lumen på flera kärl.

Diskussion

Akut ehrlichios med svenskt isolat uppvisar i stort sett identisk symtombild med tidigare beskriven sjukdom med amerikansk stam av bakterien även om det skiljer i några baspar i 16S rRNA-genen. En viktig skillnad från tidigare sjukdomsbeskrivning av Gribble är att i vår studie kunde vi inte säkert se inklusionskroppar (morulae) i neutrofila granulocyter förrän några dagar in i sjukdomsförloppet. Detta är en viktig skillnad. Det är vanligt att man för diagnostik förlitar sig på påvisande av inklusioner i blodutstryk. Om hästar insjuknar snabbt och akut med hög feber, ofta över 41 grader och påtagligt påverkat allmäntillstånd vilket är vanligt, så kan diagnosen missas de första dagarna av akut sjukdom enligt resultaten i denna studie. Sannolikt beror diskrepansen från Gribbles resultat på att han tolkade även mycket lindriga och enstaka förändringar i cytoplasman som inklusioner och han beskriver dessa förändringar som de initialt förekommande. I vår studie bedömdes enstaka förändringar i cytoplasman vilka ännu inte utvecklats till för ehrlichiainfektionen typiska och patognomoniska morulae som alltför ospecifika och osäkra för att ange som ehrlichiainklusioner eftersom andra cytoplasmatiske förändringar kan förekomma som kan misstolkas som inklusioner om de inte är typiska morulae. I denna studie sågs morulae först några dagar in i sjukdomsförloppet.

Symptomen vid den akuta fasen försvann utan antibiotikabehandling efter 7-14 dagar hos samtliga hästar. Trots en mycket noggrann daglig klinisk undersökning så kunde vi inte påvisa några symptom som kunde kopplas till persistent infektion. Någon häst hade enstaka dagar lätt hosta eller näsflöde, någon häst var av och till lätt svullen i en kота eller hade enstaka dagar några tiondelars temperaturförhöjning. Detta bedömdes inte avvika från vad man kan förvänta sig normalt i en population av hästar som studeras noggrant och ingående under en längre tidsperiod och det bedömdes sakna signifikans för den undersökta infektionen. Detta överensstämmer väl med situationen hos hund där liknande försöksinfektioner genomförts och där persistens via PCR kunnat påvisas under att antal månader utan att kliniska symptom på sjukdom noterats i konvalescensfasen.

Dödsfall i samband med ehrlichios har tidigare rapporterats endast i samband med sekundär komplikation såsom uppblossande av annan latent infektion eller sekundärt till ataxi och där häst snubblat, ramlat och brutit benet. Denna häst visade obduktionsfynd som väl

överensstämmer med vad Gribble beskrivit för akut ehrlichios i sin experimentella studie där han avlivat och obducerat hästar i olika faser av akut sjukdom. Allt talar för att hästen verkligen dog av en ehrlichiainfektion med akut cirkulatorisk chock som den direkta dödsorsaken. Obduktionsfynden antyder att det förekom disseminerad intravasal koagulation (DIC) förekommer vid granulocytär ehrlichiainfektion hos människa, om än ovanligt, och DIC finns även beskrivet vid monocytär ehrlichios hos människa. Hos människa är mortaliten beräknad till 0,5-1 % vid ehrlichiainfektion (human granulocytic ehrlichia agent vilken är identisk med vårt isolat i 16 S rRNA-genen). Eftersom en annan häst också fick samma högre infektionsdos utan att reagera annorlunda än övriga hästar så bedöms infektionsdosen inte vara huvudorsak till att förloppet blev fatalt.

Såvitt vi vet så beskriver denna studie det första molekylära beviset för att ehrlichios kan förekomma som persistent infektion för upp till åtminstone 4 månader hos häst. Det var emellertid endast vid intermittenta tillfällena som det var möjligt att påvisa en positiv PCR-reaktion, och oftare, men inte alltid, efter dexamethasoninjektioner eller stresspåverkan. Det ska noteras att dessa försökshästar inte utsattes för stora fysiska ansträngningar och bedömning av ev. påverkan på prestationsförmåga hos en högpresterande individ går inte att uttala sig om i denna studie.

En av oss tidigare genomförd seroprevalensstudie av 2018 hästar där även information om sjukdomshistoria samt kliniskt status ingick så kunde vid statistisk multivariat analys inget samband påvisa mellan förekomst av antikroppar mot *Anaplasma phagocytophilum* och några kliniska symptom över huvud taget.

Sammanfattningsvis så har denna studie funnit molekylära bevis för att *Anaplasma phagocytophilum* i vissa fall kan finnas kvar persistent hos hästar i upp till åtminstone 4 månader – utan symptom på sjukdom. Det finns såvitt oss bekant fortfarande inga kontrollerade studier som talar för att infektionen förlöper med kronsiska sjukdomssymptom. Studien har också visat att infektionen kan orsaka plötsligt dödsfall hos häst och med tanke på den höga exposition som finns för denna bakterie i vissa delar av Europa så bör akut anaplasmos tas med som differentialdiagnos vid akuta och oväntade dödsfall hos hästar i samband med betesgång.

Publikationer

[Prev Vet Med](#). 2001 May 1;49(3-4):191-208.

Cross-sectional study of the seroprevalence to *Borrelia burgdorferi* sensu lato and granulocytic Ehrlichia spp. and demographic, clinical and tick-exposure factors in Swedish horses.

[Engvall A](#), [Franzén P](#), [Gunnarsson A](#), [Engvall EO](#), [Vågsholm I](#), [Wikström UB](#), [Artursson K](#).

[J Vet Intern Med](#). 2005 Mar-Apr;19(2):232-9.

Acute clinical, hematologic, serologic, and polymerase chain reaction findings in horses experimentally infected with a European strain of *Anaplasma phagocytophilum*.

[Franzén P](#), [Aspan A](#), [Engvall A](#), [Gunnarsson A](#), [Aberg L](#), [Pringle J](#).

[Vet Rec](#). 2007 Jan 27;160(4):122-5.

Death of a horse infected experimentally with *Anaplasma phagocytophilum*.

[Franzén P](#), [Berg AL](#), [Aspan A](#), [Gunnarsson A](#), [Pringle J](#).

[J Vet Intern Med](#). 2006 May-June;20 (3):721 Research abstract and oral presentation: Long term follow up of experimentally induced infection with *Anaplasma phagocytophilum* in horses: Clinical and PCR findings.

[Franzén P](#), [Aspan A](#), [Engvall A](#), [Gunnarsson A](#), [Karlstam E](#), [Pringle J](#).

Manuskript: Clinical follow-up and persistence of PCR product of *Anaplasma phagocytophilum* in horses following recovery from acute experimental infection. Franzén P, Aspan A, Egenvall A, Gunnarsson A, Karlstam E, Pringle J.

Resultatförmedling till näringen

1. Undersökning av Borrelia och Ehrlichia hos svenska hästar. Populärvetenskaplig artikel som ligger på Internet under [travsport.se-hastveterinaren-forsningsinfo-rapporter](http://www.travsport.se/hastveterinaren-forsningsinfo-rapporter) med direktlänken <http://www.travsport.se/svetfraga?kommando=forskningsDokument&typ=FORSKNINGSRAPPORT>
2. Denna undersökning är också publicerad i modifierad form i tidningen Ridsport år 2005.
3. Föredrag Hippocampusdagarna 25-26 oktober 2006 arrangerat av SLU och SVA för avnämare. Artikel finns även på internet ”www.hippocampus.slu.se” under underrubriken ”Hippocampusdagarna 2006”, sidan 11. Populärvetenskaplig redovisning på svenska - se ovan.

Detaljerad populärvetenskaplig beskrivning av resultaten för kroniska studien kan jag inte skriva ännu eftersom resultaten ännu inte publicerats i vetenskaplig tidskrift. Vetenskaplig artikel ligger sgs färdig i manuskriptform.

Figur 1 .

Mean value and 1 standard deviation for total white blood cell, neutrophil, lymphocyte and thrombocyte count, and total hemoglobin in 5 horses experimentally infected with a European (Swedish) derived *A. phagocytophilum* strain. Day 0 is the day of inoculation. (The grey horizontal lines on the graphs represent reference levels for each parameter)

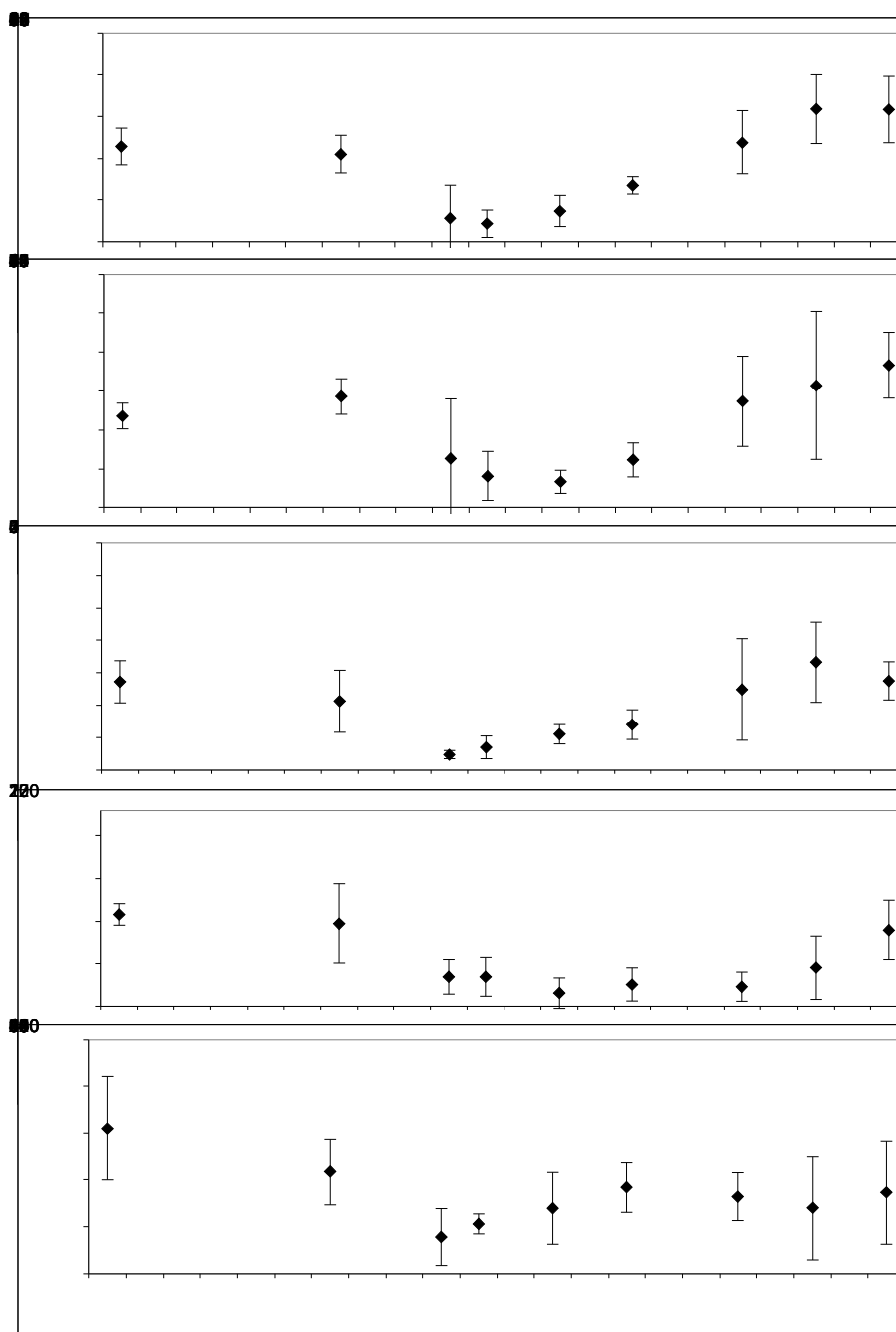


Figure 2

Average onset and duration of clinical signs, compared to inclusion presence and PCR positive signal in 5 horses experimentally infected with a European (Swedish) derived *A. phagocytophilum* strain.

Elev HR =heart rate elevation, Elev RR = respiratory rate elevation, Ataxia/unwillingness = ataxia / unwillingness to move /stumbling.

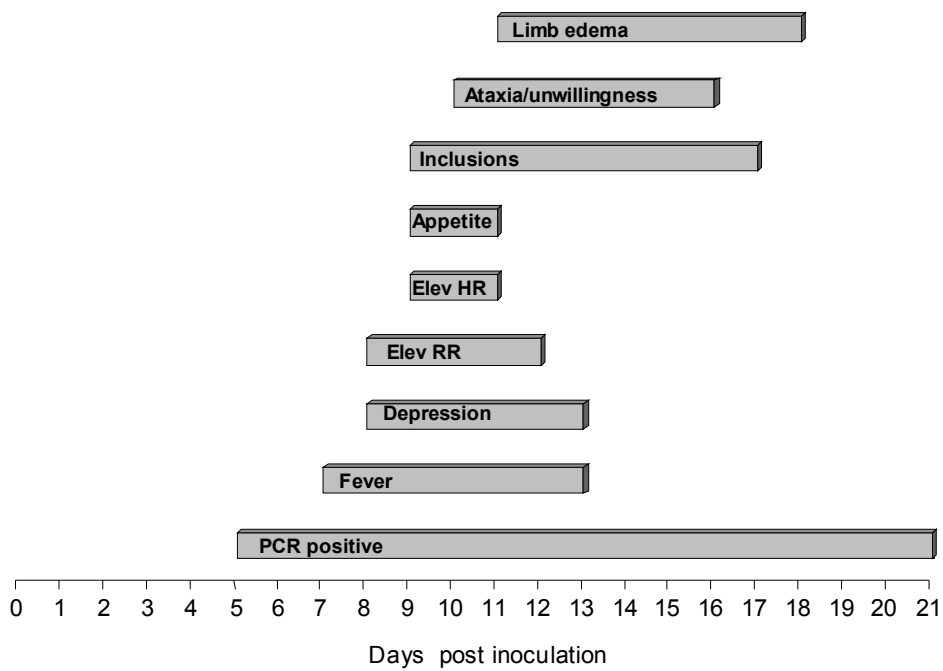


Figure 3

Rectal temperature, reciprocal IFA-titers, PCR-test and ehrlichial inclusions over the initial three weeks following inoculation (day 0) in a representative horse (horse #3) experimentally infected with a European (Swedish) derived *A. phagocytophilum* strain.

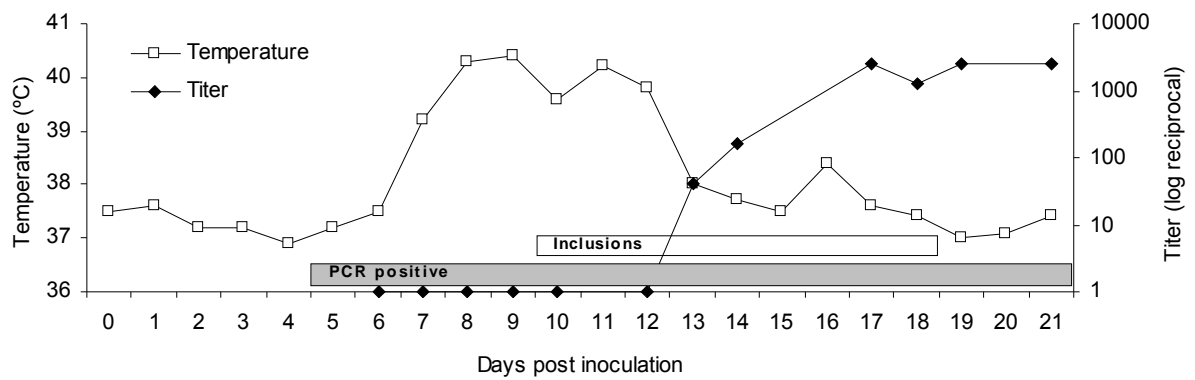


Figure 4.

Results from PCR-test of blood from 5 horses from day 0 (day of inoculation) to day 130. Positive bar means positive PCR and negative bar means negative PCR for each horse. Light arrow indicates dexamethazone treatment, dark arrow indicates 4 hours of truck transportation as a stress moment.

