

-Prosjektet ble kun tildelt midler fra Norges forskningsråd (NFR)

-Sluttrapport er levert og godkjent i NFR, og siste utbetaling mottatt

-Teksten nedenfor representerer rapporten som ble levert til NFR. Tilleggsopplysninger som er etterspurt ved sluttrapportering til Stiftelsen Lantbruksforskning (SLF) er lagt til med sporendringer i dokumentet.

Resultatrapport 218962 H1147117

## **Karkanalenes rolle i leddinfeksjoner hos føll**

*(SLF: Bakgrunn) Bakgrunn og målsettinger*

Blodforgiftning (septikemi) og påfølgende leddinfeksjon er en av de vanligste årsakene til avlivning blant føll. Det er ikke kjent hvordan bakterier forbundet med blodforgiftning binder seg til ledd og skaper infeksjon der, framfor i andre vev der infeksjoner er lettere å behandle.

Vekstbrusken hos unge dyr har en egen blodtilførsel som løper i såkalte karkanaler. Leddinfeksjoner hos grisunger og kyllinger oppstår ved at bakterier som befinner seg i blodstrømmen kommer i kontakt med og binder seg fast til vekstbrusk via åpninger eller porer i veggene på de minste blodårene i karkanalene. Prosjektets hovedmål var å undersøke om det samme kan være tilfelle hos føll.

Første delmål var å undersøke om det finnes porer i karkanalene hos føll. Andre delmål var å undersøke om det finnes noen tegn på bakteriebinding via karkanaler hos føll med leddinfeksjon. Tredje delmål var å undersøke om forekomsten av løse biter i ledd var høyere blant hester som hadde overlevd blodforgiftning eller leddinfeksjon som føll, sammenlignet med øvrige hester.

*SLF: Material og metoder*

*Det er et uttalt mål for prosjektet at problemstillingen skal besvares uten bruk av forsøksdyr, altså på patologisk innsamlet materiale eller ved hjelp av teknikker som kan benyttes på levende hest med minimale konsekvenser for hesten. Forskningsspørsmålene tenkes på det nåværende stadiet besvart gjennom innledende, kvalitative og deskriptive studier. Disse studiene kan danne grunnlaget for etterfølgende større kvantitative og epidemiologisk-statistiske studier.*

*DELMÅL 1:*

*-Patologisk materiale: med tillatelse fra eieren samles det inn material fra leddene til ca 10 føll under rutineobduksjon av disse føllene enten ved NVH eller SLU i 2011. Føllene skal være mindre enn 6 måneder gamle og fri for sykdom i skjelett og ledd.*

*-Material hentes ut fra ledd etter en systematisk protokoll. Materialet fikseres og snittes i ultratynne snitt for transmisjons- og scanning elektronmikroskopisk undersøkelse. Undersøkelsen gjennomføres som en kvalitativ, deskriptiv beskrivelse av observasjoner. Det vil fokuseres på kapillær morfologi i karkanalene, med særlig vekt på å beskrive kontinuiteten i kapillærenes vegger. Ettersom det vil være tilgjengelig materiale fra føll av varierende alder vil det være mulig å undersøke om kapillærenes vegger endrer karakter over tid, da særlig med karkanalenes dokumenterte tilbakedannelse gjennom gradvis og systematisk chondrifisering med økende alder.*

## DELMÅL 2:

-Patologisk materiale: med tillatelse fra eieren samles det inn material fra leddene til ca 20 føll under rutineobduksjon av disse føllene enten ved NVH eller SLU. Det siktes mot å samle 5 føll i hver av følgende 4 kategorier: føll uten sykdom i ledd (kontroll), føll med akutt infeksjon i ledd (varighet 1-2 dager), føll med subakutt infeksjon i ledd (varighet ca 3-7 dager) og føll med kronisk infeksjon i ledd (varighet over 7 dager). Gruppene må muligens justeres etter hva som er tilgjengelig. Føllene skal være mindre enn 6 måneder gamle. Kontrollgruppen skal være av samme aldersspenn som de affiserte føllene.

-Materialet snittes og farges med hematoxylin og eosin for morfologi, og med forskjellige spesialfarginger for bakterier. Aktuelle fargeteknikker inkluderer gram-farging for gram-positive bakterier og Brown og Brenn farging for gram-negative organismer. Det kan bli aktuelt å farge for koagulering, for eksempel i form av spesifikk farging for fibrin slik som Massons Trichrome, Weigerts Hematoxylin eller MSB. Med referanse til delmål 1 kan det bli aktuelt å undersøke deler av materialet med elektronmikroskopi.

## DELMÅL 3:

-Levende hest: I årene 2006-2008 ble det gjennomført en studie med sepsis-scoring av til sammen ca 50 unge føll behandlet for neonatal sepsis ved NVH. Materialet har resultert i at det finnes en database over føll som har overlevd en episode med neonatal sepsis. Databasen brukes til rekruttering av levende hester som i 2011 vil være fra 3-5 år gamle.

-Eiere av føllene i databasen som har overlevd neonatal sepsis kontaktes. Dersom eier samtykker i at hesten kan delta i prosjektet går man videre til å undersøke hestens ledd radiologisk. Undersøkelsen gjennomføres uten kostnad for eier. Dersom det allerede har vært tatt røntgenbilder av hesten hentes disse inn fra klinikken der de ble tatt. Eventuelle eksisterende røntgenbilder kompletteres, eller hesten undersøkes fra grunnen av til man har tilegnet seg et komplett bilde av hestens tåledd, kodeledd, framkneledd, haseledd, albuledd, bakkneledd og skulderledd. Røntgenbildene vurderes så for tegn på forstyrret enchondral forbeining og løse biter i leddene. Eventuelle biters lokasjon og distribusjon dokumenteres, og sammenlignes med den distribusjonen som er kjent for osteochondrosis dissecans. Dersom det blir vurdert som hensiktsmessig kan en gruppe med jevngamle hester av samme kjønn og rase undersøkes og resultatet brukes som kontroll for den enkelte hest med neonatal sepsis.

## (SLF: Resultat) Resultater

Material fra 5 føll har blitt undersøkt med elektronmikroskopi for å lete etter porer. Blodårene har hittil vist seg å være tette, men det er nødvendig å undersøke flere områder enn det som har vært gjort til nå for å være sikker på at blodårer på alle dybdenivåer i vekstbrusken er representert.

Til andre delmål har det vist seg at føll som får påvist leddinfeksjon oftest blir levert til obduksjon kun etter lengre tids behandling med antibiotika som dreper bakterier. Det har derfor vært vanskelig å påvise bakterier direkte i prøvene. Det har imidlertid blitt påvist fibrin, og hos grisunger og kyllinger fører bakteriebinding til tilstopping av blodårene med fibrin, dvs. trombose. Det jobbes videre med dette lovende funnet for å undersøke om påvisning av fibrin er ensbetydende med bakteriebinding via karkanaler hos føll med leddinfeksjon.

I arbeidet med tredje delmål har det vært påvist høy forekomst av løse biter (77,8 %) og beinstallingsfeil (23 %) blant hester som har overlevd blodforgiftning eller leddinfeksjon som føll, sammenlignet med den generelle hestepopulasjonen (henholdsvis 50,7 og 20 %). Dette resultatet er den hittil sterkeste indikasjonen i prosjektet på at bakteriebinding via karkanaler forekommer hos føll, som hos grisunger og kyllinger. Arbeidet fortsetter for å sammenligne om bitene sitter på de samme stedene i leddene som biter som skyldes utviklingsmessig osteochondrose.

#### *Viktigste FoU oppgaver*

De viktigste FoU oppgavene har vært:

-Innsamling og fiksering av materiale. Arbeidet har foregått i Oslo ved prosjektleder Olstad. Olstad har utviklet nytt samarbeid internt på Norges veterinærhøgskole med Anatomen ved Institutt for basalfag og akvamedisin om produksjon av fiksativ til elektronmikroskopi. Eksisterende samarbeid med Veterinærinstituttet om produksjon av dekalsineringsvæske er videreført.

-Transport av biologiske prøver over landegrenser. Transport av biologisk materiale krever en del arbeid i form av merking, forsegling og medfølgende dokumentasjon, men en rutine er nå etablert for dette der Olstad i Oslo kan sende prøver til Ekman i Uppsala via kurer. Rutinen er nyttig både for dette og fremtidige samarbeidsprosjekter.

-Snitting og farging av prøver til vanlig lysmikroskopi har foregått i Uppsala ved prosjektdeltager Ekman. Material fra enkelte føll har også vært farget i Oslo, og fra ett enkeltstående føll hos samarbeidspartner Carlson i USA.

-Preparering av prøver til transmisjonselektronmikroskopisk undersøkelse har foregått i Sverige ved prosjektdeltager Ekman i etablert samarbeid med Hultenby ved Karolinska Institutet. Karkanaler hos gris har tidligere vært undersøkt med elektronmikroskopi, men det nåværende prosjektet er oss bekjent første gang karkanaler fra hest har vært undersøkt på denne måten.

-Røntgenundersøkelse har hovedsakelig foregått i Norge ved prosjektdeltager Dolvik. Dolvik har lang erfaring med slik undersøkelse i samarbeid med hesteeiere og veterinærklinikker over hele landet. Veterinærstanden og travindustrien ved stambok og hesteeiere samarbeider godt i Norge, og samarbeidet blir ytterligere styrket av prosjekter som dette.

-Artikkelskriving foregår i begge land, og det har i prosjektperioden blitt tatt i bruk nye hjelpemidler i form av Skype for direkte kommunikasjon, og DropBox for deling av større dokumenter, da særlig bilder og figurer til bruk i artiklene. Hjelpemidlene gjør at det nå går lettere og raskere å skrive samarbeidsartikler over landegrenser enn det har gjort i tidligere prosjekter.

#### *Prosjektgjennomføring og ressursbruk*

Prosjektet var gjenstand for en tidsmessig utfordring: sommeren 2012 ble Hesteklinikken ved Norges veterinærhøgskole stengt pga salmonella. Utfordringen ble løst ved å samle sammen materiale fra tidligere år, i tillegg til den planlagte prospektive (dvs. fremadrettede) innsamlingen av materiale.

Det er mer tidkrevende å lete frem materiale i ettertid enn å samle det inn prospektivt i en travel klinikk, og av et ønske om å samle mest mulig materiale har det vært vanskelig å sette en endelig sluttstrek for innsamling og praktiske oppdrag.

Ressursbruk i forhold til arbeidstimer har vært høy for delmål 3 som omhandler innhenting av informasjon fra hesteeiere. Ressursbruk rent økonomisk er i henhold til budsjett, med det unntak at det pga sein avslutning av praktiske oppdrag har drøyet med å få inn fakturaer for det utførte arbeidet. Det er søkt om overføring av driftsmidler til budsjettåret 2013 for å dekke disse fakturaene når de foreligger.

*(SLF: Diskusjon) Resultatenes betydning og nytteverdi*

Resultatene ansees å ha betydning på to områder innenfor helse og dyrevelferd i hesteindustrien:

-i behandlingen av leddinfeksjoner hos føll. Så mange som 30 % av føll som avlives blir avlivet fordi behandling mot leddinfeksjon ikke lykkes i å kontrollere infeksjonen. Resultatene særlig av delmål 2 i prosjektet kan tyde på at bakteriebinding leder til at blodårene blir tilstoppet med fibrin. Antibiotika i behandlingen av leddinfeksjoner distribueres via blodstrømmen. Hvis blodstrømmen er tilstoppet, vil ikke antibiotika komme frem til stedet der bakteriene befinner seg. Resultatene gir med andre ord grunn til å vurdere nye behandlingsstrategier, som for eksempel bruk av trombolytiske medisiner som løser opp tilstoppinger i blodårene, i forkant av eller samtidig med rutinemessig antibiotikabehandling. Resultatene tyder også på at føll som overlever blodforgiftning eller leddinfeksjon bør følges opp tettere med tanke på løse biter eller beinstillingsfeil sammenlignet med friske føll.

-i vurderingen av løse biter i avlsarbeidet. Det er godt dokumentert at løse biter i ledd, herunder osteochondrose, har en arvelig disposisjon med middels til høye arvegrader. Dersom en kan skille de hestene som får biter på grunn av bakteremi fra de som er arvelig disponert ved for eksempel forskjellig lokalisasjon og/eller dokumentasjon av bakteriesjukdom som føll, kan dette få betydning både for avlsarbeid og forsikring av slike individer.

*(SLF: Publikasjoner)*

*Foreløpige resultater for delmål 3 er sammenfattet i en fordypningsoppgave som ble gjennomført og er tilgjengelig ved biblioteket på Norges veterinærhøgskole, som følger:*

*Sæbø, Vilja Karlsrud og Ålmo, Ingeborg: Overlevelse, helse og prestasjon hos hester referert til Hesteklinikken for behandling av sepsis, Fordypningsoppgave, Norges veterinærhøgskole.*

*Oppgaven er skrevet på norsk, med en engelsk oppsummering på inntil 200 ord.*

*(SLF: Øvrig resultatformidling til næringen) Formidling og utnyttelse av resultater*

Formidlingsplanen er som følger: vitenskapelige artikler vil bli ferdigstilt først, fordi enkelte vitenskapelige tidsskrifter ikke aksepterer artikler der resultatene har vært omtalt i andre fora før innsending. Det planlegges minimum 3 vitenskapelige publikasjoner fra prosjektet, med arbeidstitler:

-Ultra-structural studies of epiphyseal cartilage canals in the distal femur of foals, ved Ekman, Olstad, Hultenby og Dolvik

-The role of epiphyseal cartilage canals in septic arthritis and osteomyelitis in foals, ved Olstad, Ekman og Dolvik

-Prevalence of *osteochondrosis dissecans*-like fragments in the joints of horses that have survived an episode of neonatal sepsis or septic arthritis, ved Olstad, Ekman og Dolvik

For hver vitenskapelige publikasjon vil det bli produsert minimum ett populærvitenskapelig dokument, for publikasjon i medier som Trav- og galoppnytt, Travronden o.l.

Dolvik er involvert i avlsarbeidet for flere av de særnorske hesterasene, og holder i den sammenheng hyppige foredrag for avlslag og hesteeiere der han har anledning til å bekjentgjøre resultatene for disse. Ekman og Olstad ble i 2012 kontaktet av en av lederne for svensk varmbloodsavl, og har muntlig avtale om presentasjon av forskningsresultater ila 2013.

#### *Resultater som forventes ferdigstilt etter prosjektets slutt*

Fra første delmål vil det bli undersøkt et større antall områder slik at blodårer på alle dybdenivåer i vekstbrusken er representert.

Fra andre delmål vil det bli undersøkt et større antall snitt fra det innsamlede materialet.

Fra det tredje delmålet vil det tilføres data som beskriver på hvilke steder i leddene eventuelle løse biter forekommer.