

Slutrapport Stiftelsen Svensk Hästforskning

NY PCR-DIAGNOSTIK FÖR KVARKA Projekt nr 0447061

Bakgrund

Kvarka är en mycket smittsam och allvarlig infektionssjukdom hos hästar. Sjukdomen orsakas av bakterien *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*). Den klassiska symtombilden för kvarka är feber, varigt näsflöde (som i början kan vara tunt och genomskinligt men blir sedan tjockt och gult), hosta och svullna lymfknutor i huvud/halsregionen (submandibular och retropharyngeallymfknutorna). I dessa lymfknutor utvecklas ofta bölder som kan spricka och tömma sig på stora mängder var. I Sverige är kvarka en anmälningspliktig sjukdom redan på kliniska symptom.

Inkubationstiden för kvarka är vanligen ca en vecka. Utsöndring av bakterien sker via näsan och börjar inte förrän 2-3 dagar efter att feber har utvecklats och pågår under 2-3 veckor hos de flesta hästar, men kan variera mycket. Under senare år rapporteras att kvarka också kan diagnosticeras på hästar med mycket milda symptom. Näsflödet kan vara tunt och genomskinligt och är då omöjligt att skilja från en virusinfektion. Ibland finns heller ingen lymfknuteansvällning eller hosta.

Den närbesläktade *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) som kan förekomma hos friska hästar utan att orsaka sjukdom är associerad till inflammatorisk luftvägsinfektion och nedre luftvägsinflammation hos häst. Det har i Sverige föreslagits att dessa bakterier i vissa fall kan växa till och orsaka sjukdom med kvarkaliknande symptom och smittbarhet till andra hästar (ej vetenskapligt publicerat).

Diagnos ställs ofta med ledning av kliniska symptom, men kan konfirmeras genom att odla fram *S. equi* från prov taget från neshåla, svalg, luftsäckar eller en böld. På laboratoriet odlas provet på olika agarplattor där bakterien växer fram. Bakterien, som tillhör Lancefield grupp C, typas sedan med hjälp av koloniutseende, Gramfärgning och biokemiska tester. Minimitid för odling och typning på laboratoriet är två dygn, ibland kan det ta fler dygn pga. riklig växt av annan bakterieflora och/eller helg.

I en svensk studie av Olsson *et al.* (1994) och även i internationella studier har, trots omfattande provtagningar vid kvarkautbrott, som mest 50% av hästar med symptom varit odlingspositiva. Infekterade hästar har visats normalt kunna bära *S. equi* ca en månad efter insjuknandet och även symptomlösa smittbärare med kvarkabakterien i luftsäckarna har observerats. Dessa hästar kan bära på smitta i årtal (Newton *et al.*, 2000). Då kvarka orsakar stora problem och kostnader för hästnäringen och lidande för hästarna är det viktigt att erhålla snabb och känslig PCR diagnostik och ökad kunskap om vilken provtagningsmetodik som är optimal för att på sikt kunna begränsa spridningen av sjukdomen. På grund av den låga andelen positiva prover upplever många veterinärer det som mindre värdefullt att provta en häst med misstänkt kvarka. För att förhindra smittspridning och långdragna sjukdomsutbrott är det dock av stor betydelse att kunna fastställa en diagnos.

Målsättningen med detta projekt var att förbättra diagnostiken av *S. equi* och *S. zooepidemicus* genom:

1. Sekvensering och konstruktion av realtids-PCR-system som både kan detektera och differentiera *S. equi* och *S. zooepidemicus*.
2. Realtids-PCR för snabb identifikation av streptokockbakterier från agarplatta

3. Utvärdering av provtagningsmetoder och realtids-PCR för att detektera *S. equi* från svabbprover och andra provmaterial
4. Införlivning av den framtagna PCR med SVAs multi-PCR-analys av luftvägs-patogener på häst.
5. Klassificering av *S. zooepidemicus*-stammar efter förmåga att framkalla sjukdom eller ge olika symptom

Material och metoder

Fem delprojekt har ingått i studien:

Delprojekt 1. Sekvensering och konstruktion av realtids-PCR-system

I denna delstudie användes kliniska stammar isolerade från hästar med kvarka och andra luftvägssymtom, *S. equi* ($n=24$) och *S. equi* subsp. *zooepidemicus* ($n=24$). Dessa stammar karakteriserades på molekylär nivå genom sekvensering av 16S rRNA och *sodA* generna. Baserat på dessa resultat konstruerades ett realtids PCR system som kan detektera och skilja *S. equi* och *S. zooepidemicus* åt. Den utvecklade realtids PCR baserades på *sodA* and *seel* generna.

Delprojekt 2. Realtids-PCR för snabb identifikation av streptokockbakterier från agarplatta

Den utvecklade realtids-PCR jämfördes med konventionell odling på 103 odlade prov från hästar med misstänkt kvarka eller annan övre luftvägssjukdom. Nässvabbar eller trachealsköljprover odlades på agarplattor. Typiska β -hemolyserande streptokock-kolonier växte på plattan och en koloni valdes för renodling. Nästa dag typades denna koloni biokemiskt för att påvisa *S. equi*, *S. zooepidemicus* eller *S. equisimilis*. Från varje primärodling gjordes en DNA preparation direkt från primärstryket på plattan och också från samma koloni som renodlade för biokemisk typning. Dessa två DNA preparationer analyserades med realtids PCR för att jämföra om det fungerade tillfredsställande att påvisa *S. equi* och *S. zooepidemicus* med realtids PCR istället för biokemisk typning.

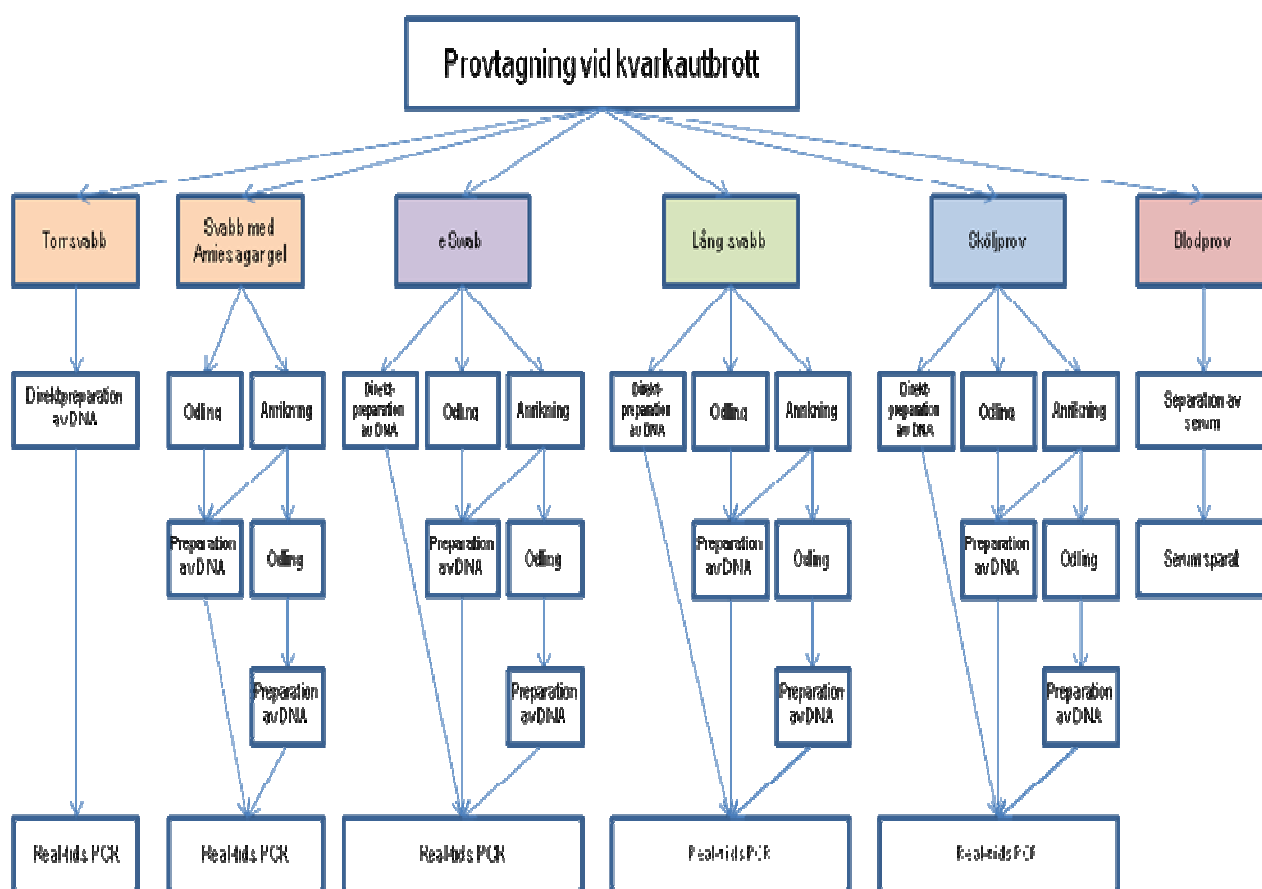
Delprojekt 3. Utvärdering av provtagningsmetoder och realtids-PCR för att detektera S. equi från svabbprover och andra provmaterial

Här undersöktes olika provtagningsmetoder i fält och olika analysmetoder på laboratoriet från hästar provtagna vid akuta kvarkautbrott. En pilotstudie utfördes våren 2008 där 23 hästar i tre olika stall provtogs. Från denna pilotstudie valdes provtagningsmetoder och provtagningsmaterial ut till huvudstudien hösten 2008. Provtagningsmaterialen som använts är tre olika korta svabbar för provtagning i näshålan; eSwab med flytande amies transportmedium (Copan), steril tops utan transportmedium (SelfaTrade), provtagningssvabb för analys av bakterier med amies agar gel transport medium (Copan), en lång svabb för provtagning i näshåla och svalg; steril engångs uterussvabb utan transportmedium (EquiVet), ett nässköljprov med steril koksaltlösning och ett blodprov i rör utan tillsats (serumrör, BD Vacutainer). Hästarna i huvudstudien visade tydliga kliniska symptom på kvarka och minst ett verifierat fall av infektion med *S. equi* fanns i stallet. Ingen av hästarna var under behandling med antibiotika vid provtagningstillfället. Ingen av hästarna hade någon annan känd infektionssjukdom vid provtagningstillfället.

Provtagningarna har utförts av veterinär. Hästar som provtagits har hanterats med brems eller sedering (Detomidin) eller både brems och sedering. Hästens näsborrar har torkats ur med en steril kompress fuktad med steril NaCl innan provtagningarna påbörjats. Svabbar för provtagning i näshåla har tagits ur ena näsborren medan svabbar för provtagning i både näshåla och svalg har tagits ur den andra näsborren. Kateter för nässköljprov har lagts in i samma sidas näsborre som svabbarna för provtagning i både näshåla och svalg. Samtliga prover förvarades i rumstemperatur under transporten från provtagningsorten till laboratoriet.

Proverna förvarades i rumstemperatur över natten innan analyser påbörjades för att simulera den tid ett prov normalt befinner sig i rumstemperatur under transport till laboratoriet.

För svabbprover togs tre exemplar av varje prov och sköljvätskan från nässköljprovtagningen delades upp för användning i olika analyser. Varje provmaterial i studien har analyserats i tre parallella analyser; 1) direktpreparation av DNA, 2) odling med påföljande DNA preparation samt 3) anrikning i Todd Hewitt buljong över natten följt av a) direktpreparation av DNA från anrikningsbuljong respektive b) odling av anrikningsbuljong med påföljande DNA preparation från odling. DNA från samtliga metoder ovan analyserades med realtids-PCR enligt Båverud *et al.* (2007). Resultatet för prover analyserade med realtids-PCR från odling verifierades med biokemisk typning. Blodprov i serumrör centrifugerades och serum avskiljades och sparades i -70°C .



Figur 1. Flödesschema för provtagningar i fält och analyser på laboratoriet för varje häst. Analys 1 är direktpreparation av DNA från provmaterial (svabb med amies agar gel ersattes av torr svabb), analys 2 är odling följt av DNA preparation och analys 3 är ett anrikningssteg i Todd Hewitt buljong över natten följt av analys 1 respektive analys 2. DNA från samtliga metoder ovan analyserades med realtids-PCR enligt Båverud *et al.* (2007).

Delprojekt 4. Den framtagna PCR införlivas med multi-PCR-analys av luftvägs-patogener
 Vid SVA erbjuds sedan många år ett s.k. luftvägs-paket för luftvägsviroser hos häst. Här analyseras för fem virus (EAV, EHV-1, EHV-4, ERBV samt influensa) från samma provtagningspinne. Eftersom kvarka kan vara en differentialdiagnos vid vissa av dessa infektioner, särskilt i tidigt infektionsstadium då näsflödet fortfarande är tunt, kan en kvarkainfektion bedömas som trolig virusinfektion. Vårt mål var att kunna analysera både för virus och kvarka från samma provtagningsmaterial för att underlätta hästveterinärernas arbete.

Olika provtagningspinnar har därför testats inom delprojekt 3 för att utvärdera om den provtagningspinne som idag används för virologisk undersökning inom luftvägs paketet fungerar väl också för kvarkadiagnostik.

Delprojekt 5. Klassificering av S. zooepidemicus-stammar efter förmåga att framkalla sjukdom eller ge olika symptom

För vårt stammamaterial med kliniska stammar av *S. equi* (n=24) och *S. zooepidemicus* (n=24) isolerade från hästar med kvarka och andra luftvägssymtom, samt för typstammar av *S. equi*, *S. zooepidemicus* och *S. equi* subsp. *ruminatorum* (*S. ruminatorum*) har vi nu sekvenserat följande gener; 16S rRNA, *sodA*, *tuf*, HSP60, SeM (endast *S. equi*, eftersom denna gen inte finns hos de andra två underarterna) och SzP/SzPse och dessutom analyserat alla stammarna med pulsfälts gel elektrofores (PFGE). PFGE är en metod som används rutinmässigt för s.k. subtypning av många bakteriearter och nyttjas för s.k. molekylär epidemiologi, dvs i smittspårningssyfte.

Resultat

Delprojekt 1. Sekvensering och konstruktion av Realtids-PCR-system och

Delprojekt 2. Realtids-PCR för snabb identifikation av streptokockbakterier från agarplatta

I dessa delstudier har vi konstruerat ett Realtids-PCR-system för att detektera och skilja *S. equi* och *S. zooepidemicus* och sedan använt detta för att konfirmera misstänkta kolonier av *S. equi* och *S. zooepidemicus* från kliniska prover som odlats ut och fått växa över natt på agarplattor.

Vi valde ut svenska isolat av *S. equi* och *S. zooepidemicus* och från dessa sekvenserade vi gener som vi ansåg kunde vara lämpliga kandidater att använda för att basera ett PCR-system på. För en PCR som skulle kunna skilja *S. equi*-komplexet (*S. equi* subsp *equi* och *S. zooepidemicus* och *S. ruminatorum*) från andra streptokocker valde vi gener som använts vid fylogenetiska studier, dvs att kunna skilja mellan arter inom *Streptococcus*.

Vi valde att studera 16S rRNA och *sodA* generna. Vi fann då att alla *S. equi* hade identisk sekvens för båda generna medan variationen hos 16S rRNA inom *S. zooepidemicus* var ganska stor och att det var svårt att finna regioner som är gemensamma för *S. equi*-komplexet och samtidigt skiljer mot alla andra streptokocker. *SodA* genen var här ett bättre alternativ och vi kunde konstruera en Realtids-PCR som detekterar *S. equi*-komplexet men inga andra streptokocker.

Vi ville sedan kunna skilja mellan *S. equi* och *S. zooepidemicus* och här var det M-liknande proteinet SeM en lämplig kandidat enligt litteraturen eftersom den enbart har kunnat hittas hos *S. equi*. Vid användning av konserverade delar av genen kan amplifiering av andra gener som delar dessa konserverade regioner också ske, t ex gener som finns även hos *S. zooepidemicus*. Används däremot de mer specifika delarna av genen finns det isolat av *S. equi* som har förlorat en del av genen och dessa skulle därför inte detekteras med ett system som bygger på dessa mer specifika genregioner. Vi valde därför att rikta vårt PCR system mot en annan gen som kodar för ett toxin, SeeI. Detta toxin har hittills bara beskrivits för *S. equi* samt från *S. pyogenes*. Det betyder alltså att ett prov som innehåller *S. pyogenes* skulle ge en positiv signal med vårt Realtids-PCR system. *S. pyogenes* skulle däremot inte fångas upp av PCR riktad mot *sodA* och på detta sätt kan *S. pyogenes* ändå skiljas ut från *S. equi* komplexet. Realtids PCR bygger på att en sond binder till det amplicon som bildas i PCR reaktionen och därvid avger fluorescens vid en viss våglängd. Om ett prov innehåller *S. zooepidemicus* fås en fluorescenssignal och om ett prov innehåller *S. equi* fås två fluorescenssignaler, en för *sodA* genen och en för genen som kodar för toxinet SeeI.

I nästa delstudie utvärderade vi vår duplex- realtids-PCR med hjälp av prover som analyserades inom Enhet för bakteriologisk rutinverksamhet, där vi regelmässigt får in prover från hästar med misstänkt kvarka eller andra luftvägsproblem. Dessa prover odlas på agarplattor och bakteriologiska fynd konfirmeras biokemiskt. Proverna odlas ut på agarplattor enligt ett system där första tredjedelen av plattan får tjock växt (primärstryk), nästa tredjedel ger glesare växt (sekundärstryk) och på den sista tredjedelen är växten så gles att det går att plocka ut enskilda kolonier (tertiärstryk). Förutom vår rutinmetod tog vi från dessa plattor både från den tjocka växten och från enskilda kolonier med typiskt utseende av Lancefield grupp C streptokocker och analyserade dessa med vår realtids-PCR.

Vi fann då att vår realtids-PCR fångade upp något fler av *S. equi*-komplexet än vår konventionella odling/biokemisk typningsmetod. Det var ffa *S. equi* som gömde sig i den tjocka växten på plattan som var svåra att hitta med vår konventionella metod, men där vår PCR kunde påvisa att bakterien fanns i växten. Genom att göra renodling från primärstryk lyckades vi isolera *S. equi* även från dessa plattor och därmed konfirmera att realtids-PCR verkligen påvisat närvaro av *S. equi*. Dessa resultat finns nu publicerade (Båverud et al., 2007).

Tabell 1: Jämförelse av realtids PCR från agarplatta för detektion och subspecies typning/differentiering av *Streptococcus equi* subsp. *equi* och *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, jämfört med konventionell odling i kombination med biokemisk typning för nässvabbar eller trachealsköljprov från 103 hästar med misstänkt kvarka eller annan övre luftvägsinfektion

Resultat från konventionell biokemisk typning	Resultat från realtids PCR analys från primärstryk från agarplattan	Resultat från realtids PCR analys från en koloni från agarplattan	Antal prov
<i>S. zooepidemicus</i>	<i>S. zooepidemicus</i>	<i>S. zooepidemicus</i>	74
<i>S. zooepidemicus</i>	Negativ	<i>S. zooepidemicus</i>	3
<i>S. zooepidemicus</i>	Negativ	Negativ	2*
<i>S. equi</i>	<i>S. equi</i>	<i>S. equi</i>	15
<i>S. equisimilis</i>	<i>S. equi</i>	Negativ	1
<i>S. equisimilis</i>	<i>S. zooepidemicus</i>	Negativ	3
<i>S. equisimilis</i>	Negativ	Negativ	1
Negativ	<i>S. equi</i>	<i>S. equi</i>	1
Negativ	<i>S. zooepidemicus</i>	Negativ	1
Negativ	Negativ	Negativ	2
Total			103

*Ytterligare en primer för *sodA* genen designades och lades till vårt realtids PCR system. Efter detta blev de två proven positiva med PCR (Båverud et al., 2007)

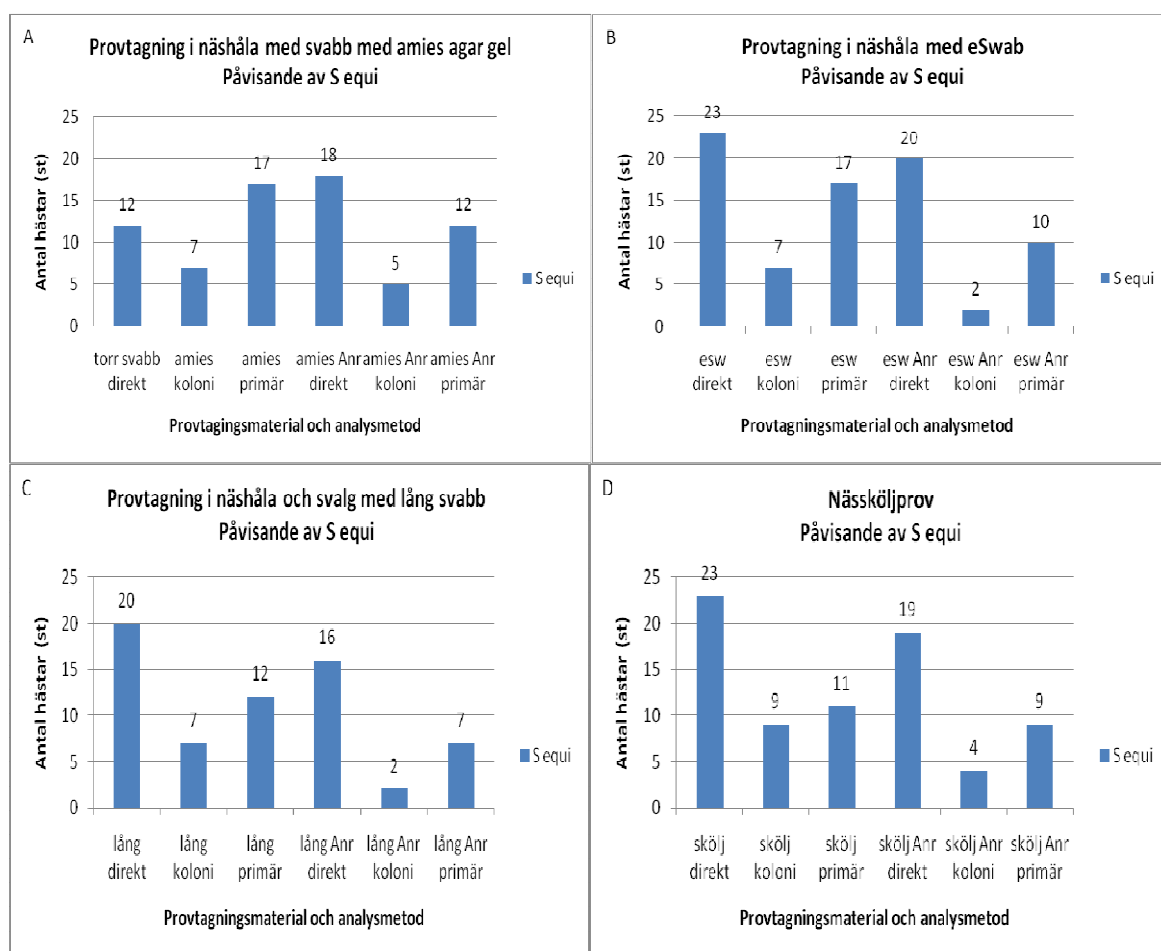
Delprojekt 3. Utvärdering av provtagning och realtids-PCR för att detektera *S. equi* från svabbprover och andra provmaterial

I huvudstudien var mer än 85% av hästarna positiva för *S. equi* i minst ett prov. Högst antal positiva prov sågs i provtagningsmetoderna nässvabbprovtagning med eSwab och nässköljprov med koksaltlösning. För de olika analysmetoderna på laboratoriet sågs lovande

resultat för direktpreparation av DNA för samtliga provmaterial med undantag för den torra sterila svabben.

Preanrikning av olika provtagningsmaterial visade inte högre antal positiva prover av *S. equi* än analys direkt från materialet. Ett undantag var dock att direktpreparation av DNA från preanrikning av provtagningsmedium visade högre antal positiva prover för *S. equi* jämfört med direktpreparation av DNA från torr svabb. Däremot visade preanrikade prover högre förekomst av *S. zooepidemicus* i samtliga materialgrupper. PCR-analyser med DNA direkt preparerat från provmaterialen, förutom den torra svabben, visade ett större antal positiva prover än PCR-analyser med DNA preparerat från prover som odlats på agarplatta först.

Serologiska studier i kvarkaforskningen är ett nytt och mycket intressant område och de serumprover som tagits under denna studie har sparats för att kunna användas i framtida studier med serologisk inriktning.



Figur 2. Antal hästar som var positiva för *S. equi* i real-tids PCR fördelat på provtagningsmaterial och analysmetod. Analysmetoderna var PCR från direktpreparation av DNA från provmaterialet (direkt) och PCR från odling med analys av prover från koloniväxt (koloni) och från primärstryk (primär) på agarplattan. Analyserna har utförts på prover som preanrikats i Todd Hewitt buljong (Anr) och på prover som ej genomgått anrikningssteg. A) svabb från näshåla med amies agar gel transportmedium och torr svabb (endast direktpreparation av DNA), B) eSwab från näshåla, C) lång svabb från svalget utan transportmedium och D) nässköljprov från båda sidors näshålor.

Delprojekt 4. Den framtagna PCR införlivas med multi-PCR-analys av luftvägs-patogener
Vi fann att den provtagningspinne (kort, torr pinne) som i dag rutinmässigt används och fungerar bra för virus-luftvägspaketet inte är optimal för kvarka-diagnostiken. Endast hälften av proven blev positiva med denna jämfört med tex eSwab som tas på samma sätt och från samma del av näsan. Därför kommer utvärdering av hur eSwab och eventuellt även nässköljprover fungerar för DNA extraktion med påföljande virusanalys. Detta kommer att göras dels på sparade DNA-prover från de hästar som analyserats hittills, samt på prover från de hästar som kommer att analyseras under våren.

Delprojekt 5. Klassificering av S. zooepidemicus-stammar efter olika förmåga att framkalla sjukdom eller ge olika symptom

För vårt stammamaterial samt för typstammar av de subspecies som ingår i *S. equi*-komplexet har vi nu sekvenserat följande gener; 16S rRNA, *sodA*, *tuf*, HSP60, SeM (endast *S. equi*, eftersom denna gen inte finns hos den andra två underarterna) och SzP/SzPSe och dessutom analyserat alla stammarna med pulsfältsgel elektrofores (PFGE). Syftet var att undersöka om några av våra *S. zooepidemicus* isolat är mer genetiskt relaterade till *S. equi* eller *S. ruminantium* som ju båda beskrivits som sjukdomsframkallande bakterier. Återigen fann vi att alla *S. equi*-isolat är identiska när generna som ofta används för fylogenetiska studier (16S rRNA, *sodA*, *tuf*, HSP60) sekvenseras. Däremot sågs skillnader i sekvens för SeM och dessa skillnader stämmer även överens med skillnader i PFGE mönster.

Diskussion

Delprojekt 1-2. Realtids-PCR påvisar S. equi snabbare och säkrare än odling kombinerad med biokemisk typning

I studien togs ett realtids-PCR-system fram som detekterar och skiljer *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Metoden förkortar analysarbetet på laboratoriet och har högre känslighet än den konventionella odlingen kombinerad med biokemisk typning som är standard på de flesta bakteriologiska laboratorier idag. Metoden är publicerad (Båverud et al., 2007) och har ackrediterats vid SVA och används nu rutinmässigt i vår diagnostik. En snabb säker metodik för att detektera *S. equi* har varit en förutsättning för de studier som utförts under delstudie 3 i detta forskningsprogram.

Delprojekt 3. Optimering av både fältprovtagning och laboratoriemetodik för kvarka

Tidigare studier har visat att som mest 50 % av hästar med kliniska symptom på kvarka är positiva för *S. equi* vid provtagning (Olsson et al 1994) Detta innebär svårigheter att fastställa en kvarkadiagnos vilket ger effekter för både den sjuka individen och för förutsättningarna att kunna begränsa smittspridningen. I denna studie ville vi utvärdera olika vanligt förekommande provtagningsmetoder, olika provtagningsmaterial, olika provmaterial och olika analysmetoder på laboratoriet. Intressant nog påvisades *S. equi* hos mer än 85 % av provtagna hästar med kliniska symptom på kvarka i stall där kvarka hade verifierats. Detta är ett mycket bra resultat som vida överträffar tidigare studier. Hästarna var provtagna med flera olika provtagningsmetoder.

Provtagning i luftvägarna, för både bakterier och virus, hos häst utförs ofta med korta provtagningssvabbar i nashålan. Vid kvarkamisstänke kan provtagning också göras i svalget med en lång provtagningspinne. Våra preliminära resultat visar inte att det skulle vara säkrare att provta i svalget jämfört med i nashålan.

För provtagning i nashålan kan olika provtagningssvabbar användas, de vanligaste är provtagningssvabbar med amies agar gel transportmedium med eller utan kol. På marknaden finns även bland annat en provtagningssvabb med flytande amies transportmedium, eSwab

(Copan), som är speciellt framtagen för att göra PCR analyser från. Denna svabb har utvärderats tillsammans med provtagningssvabb med amies agar gel transportmedium utan kol. eSwab är mycket användarvänlig både vid provtagning och vid analys på laboratoriet och har tillsammans med nässköljprov visat de bästa resultaten för påvisande av *S. equi*. eSwab är enligt tillverkarens anvisningar även lämplig för provtagning och analys för påvisande av virus. Ett vanligt provtagningsmaterial för virusanalyser är torra sterila svabbar utan transportmedium. En sådan svabb har använts i studien men har visat svaga resultat för påvisande av *S. equi* vid direktpreparation av DNA för PCR analys.

Nässköljprov är en metod där steril koksaltlösning spolats in i ena nashålan upp till svalget varefter koksaltlösningen rinner ut ur båda näsborrarna och kan på det viset skölja ut bakterier ur båda sidors nashålor. Metoden är mindre vanlig bland svenska veterinärer men förekommer i amerikanska studier. Metoden är något mer avancerad än att använda en provtagningssvabb och vissa hästar höjer huvudet vid spolning varvid koksaltlösningen sväljes istället för att rinna ut genom näsan. Nässköljproven i denna studie har visat mycket goda resultat för påvisande av *S. equi* och är trots att den är något mer arbetskrävande vid provtagning en bra provtagningsmetod vid kvarkamisstanke.

Konventionell kvarkadiagnostik med odling och biokemisk typning kan ta flera dygn och upp till en vecka innan en verifierad diagnos kan ges. Denna tid kan förkortas genom möjligheterna till typning av beta-hemolyserande streptokocker via PCR från odlingen på agarplattan (Båverud *et al.*, 2007). Att ytterligare förkorta tiden till diagnos skulle kunna uppnås om provet kan analyseras med PCR direkt från provmaterialet utan odlingssteget. I denna studie är de preliminära resultaten av direktpreparation från provmaterial mycket lovande. eSwab som är utformad för direktpreparation av DNA har tillsammans med direktpreparation av nässköljprov de bästa resultaten. Komplettering med odling av provet är dock viktigt för att kunna isolera en stam för vidare karaktärisering och resistensbestämning.

I kvarkadiagnostik utomlands används ibland ett anrikningssteg innan bakterieodlingen och påföljande analyser utförs (personligt meddelande R Newton, Newmarket). I denna studie har anrikning gjorts för alla provtagningsmetoder från 24 hästar och jämförts med motsvarande analyser utan anrikning. Prover som preanrikats i Todd Hewitt buljong har inte visat bättre resultat för påvisande av *S. equi* hos något provtagningsmaterial eller analysmetod förutom direktpreparationen från svabb med amies agar gel som jämförts med direktpreparation av torr svabb utan transportmedium. Vid direktpreparation av DNA från provmaterial i gruppen svabb med amies agar gel transportmedium ersattes den svabben av en torr svabb utan transportmedium. Detta på grund av att svabben med amies agar gel inte lämpar sig för direktpreparation av DNA då detta transportmedium har en inhiberande verkan i PCR reaktioner. I motsvarande analys med anrikningssteg har svabben med amies agar gel använts och på grund av denna ersättning kan anrikningsresultatet för svabben med amies agar gel inte direkt jämföras med direktpreparation från den torra svabben. Vi kan dock notera med intresse att de prover som preanrikats har en högre förekomst av *S. zooepidemicus* i alla analyser.

Delprojekt 4. Luftvägsproblematik hos häst – ett framtida diagnostikpaket för både virus och bakterier?

Vår studie har visat att den torra korta provtagningspinne som rekommenderas för virusprovtagning i luftvägs paketet för häst inte fungerar bra för analys av kvarka. Det finns en önskan hos hästveterinärer att kunna analysera för både virus och bakterier från samma prov. Vi kommer därför att fortsätta dessa studier för att se om det finns en optimal provtagningsmetod som fungerar väl både för virus och bakterier. Förutom att rekommendera

provtagningssätt bör dock även beaktas när i sjukdomsförloppet provtagningen bör ske. Att kvarka generellt endast odlas fram i ca 50 % av misstänka kvarkfall kan dels bero på suboptimal provtagning men även på när under sjukdomsförloppet provtagning sker. Nya rön visar att bakterien utsöndras i låg grad tidigt i infektionen och att det är större chans att odla fram bakterien 2-3 dagar in i feberfas. Vi har därför också som mål att kunna ge god rådgivning om när prov bör tas för att få bästa möjliga diagnostik och det kan följaktligen leda till olika rekommendationer för virusluftvägs paketet och för kvarka-analyser.

Delprojekt 5. Streptococcus zooepidemicus - en komplex grupp av bakterier

Det finns en hypotes om att det i Sverige skulle kunna förekomma *S. zooepidemicus* med förmåga att framkalla kvarka-liknande symptom. Detta härrör ifrån att i kanske hälften av fallen av misstänkt kvarka kan inte *S. equi* odlas fram medan istället *S. zooepidemicus* hittas i proverna. Denna hypotes skulle kunna få stöd i några nya vetenskapliga publikationer från andra länder där en ny underart tillhörande *S. equi*-komplexet, *S. ruminatorum*, beskrivs. Denna bakterie isolerades först från får och get men har sedan beskrivits från hyenor och zebror där den givit kvarka-liknande symptom. Typstammen av *S. ruminatorum* visar ett något annorlunda biokemiskt jäsningsresultat än typstammarna för *S. equi* och *S. zooepidemicus* och 16S rRNA sekvensen finns publicerad för flera isolat av denna underart. Flera av de svenska isolat av *S. zooepidemicus* som vi karakteriserat har snarlika 16S rRNA sekvens med typstammen av *S. ruminatorum* men inte samma jäsningsmönster som beskrivits för *S. ruminatorum*. På grund av dessa något förbryllande resultat har vi gått vidare med de isolat som vi karakteriserade i syfte att konstruera ett realtids-PCR system ämnat att detektera och skilja *S. equi* och *S. zooepidemicus*. Här kan nämnas att vårt system inte skiljer mellan *S. zooepidemicus* och *S. ruminatorum*, om sådana stammar skulle finnas även i Sverige.

För våra kliniska stammar från delstudie 1 har vi nu sekvenserat flera gener, förutom 16S rRNA, och *sodA*, även *tuf*, HSP60, SeM (endast *S. equi*, eftersom denna gen inte finns hos den andra två underarterna) och SzP/SzPSe och dessutom analyserat alla stammarna med pulsfältsgel elektrofores (PFGE). Sekvenseringsresultaten för *S. zooepidemicus* ger ingen klar bild av släktskap mellan stammarna. Beroende på vilken gen som analyserats ser det ut som att olika stammar är mer när besläktade än andra och typstammen av *S. ruminatorum* faller väl in bland våra svenska *S. zooepidemicus* stammar. I en nyligen publicerad artikel (Webb et al., 2008) har sju andra gener sekvenserats från ett stort antal isolat för att studera släktskap mellan *S. zooepidemicus* stammar. Här beskrivs samma bild, de sju generna ger var och en sin egen släktskapsgruppering och vid sammanläggning av data från alla sju generna finns det en liten grupp av stammar av *S. zooepidemicus* som ligger ganska nära *S. equi*. Dessa är dock inte isolerade från hästar med luftvägsproblem utan från fall med livmoderinfektion och med aborter. Vår studie föreligger just nu som manuskript (Aspán et al., manuskript) och vi ämnar fortsätta att studera *S. zooepidemicus* i förhållande till *S. equi* och *S. ruminatorum*. Vi tror att för att förstå skillnader i sjukdomsframkallande förmåga hos stammar inom *S. equi*-komplexet, måste vi gå in mer specifikt och studera förekomst och diversitet hos olika virulensfaktorer. Detta kommer att göras inom ett Formas-finansierat doktorandprojekt.

Vi kan även nämna att vi kunde differentiera olika isolat av *S. equi* med hjälp både av sekvensering av genen för SeM och med PFGE. Detta ser vi som mycket lovande med potential att kunna smittspåra svenska stammar av *S. equi* vid utbrott, vilket skulle kunna leda till att vi lär oss mycket mer om smittvägar och riskfaktorer för kvarkasmita. När vi jämför SeM sekvenserna för våra svenska stammar med publicerade sekvenser i internationell litteratur ser vi att många av våra utbrottsstammar stämmer överens med utbrottsstammar i

England, vilket tyder på att kvarkasmitta rör sig mellan länder och säkert också mellan kontinenter.

Referenser

Newton, J.R., Verheyen, K., Talbot, N.C., Timoney, J.F., Wood, J.L., Lakhani, K.H., Chanter, N., 2000. Control of strangles outbreaks by isolation of guttural pouch carriers identified using PCR and culture of *Streptococcus equi*. *Equine Vet. J.* 32, 515-526.

Olsson, E., Greko, C., Jonsson, P., Lindahl, M., Dartgard, M., Gustafsson-Berger, K., Karlsson, C. och Lindsjö, M. (1994) Diagnostik och patogenes vid kvarka hos häst. *Svensk Veterinär tidning* 46, 269-275.

Webb K, Jolley KA, Mitchell Z, Robinson C, Newton JR, Maiden MC, Waller A. Development of an unambiguous and discriminatory multilocus sequence typing scheme for the *Streptococcus zooepidemicus* group. *Microbiology*. 2008 Oct;154(Pt 10):3016-24.

Publikationer

Publikationer i vetenskapliga tidskrifter med peer-review-förfarande

Båverud V, Johansson SK, Aspan A. Real-time PCR for detection and differentiation of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. *Vet Microbiol.* 2007;124:219-29.

Aspán, A., Frosth, S.K., Lindahl, S., Söderlund, R., Båverud, V. Molecular characterization of clinical isolates of *Streptococcus equi* subsp. *equi* and *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Manuskript.

Lindahl, S., Aspan, A., Pringle, J., Egenvall, A., Båverud, V. Evaluation of sampling technique and of PCR and culture analysis of samples from horses with strangles. Manuskript.

Lindahl, S., Aspan, A., Båverud, V., Egenvall, A., Pringle, J. Enrichment method did not improve detection of *S. equi* in horses with strangles. Abstract kommer att sändas in till konferensen World Equine Airways Symposium i Schweiz den 5-7 augusti 2009.

Övrig resultatförmedling till näringen

SVA's hemsida, www.sva.se

Artikel i *Svensk Veterinärtidning* planeras avseende provtagning och laboratorieundersökning.

Kommentar och behov av vidare studier:

Vi önskar söka mer pengar för att kunna göra uppföljande provtagningar efter utbrott av kvarka för att kunna ta fram rekommendationer för att friförklara hästar och stall från smitta efter utbrott. Det föreligger ett stort intresse från djurägare att kunna friförklara sina stall efter ett utbrott.