

Anaplasma phagocytophilum hos hest

En seroprevalensstudie hos islandshest i Grimstad kommune

Av dyrlege Mari C. Lyngholt, Sørlandets Dyrelinikk AS



Summary

Anaplasma phagocytophilum is an intracellular bacterium (1), which is transferred via ticks (1, 2) and can lead to the fever-related disease *Granulocytic Anaplasmosis*. The infection has been shown in a range of different species, but far from all individuals that carry the infection show signs of sickness (1, 2).

In august 2009, a seroprevalence study was carried out on Icelandic horses in Grimstad municipality. The purpose of the study was to get answers to the following questions: Is *Anaplasma phagocytophilum* a problem for islandic horses in Grimstad? How many Icelandic horses have antibodies against the bacterium and how many of the seropositive horses have shown symptoms of *Equine Granulocytic Anaplasmosis* (EGA)?

This article also contains information about symptoms, diagnostics, therapy and preventative measures with regard to EGA in horses.

Sammendrag

Anaplasma phagocytophilum er en intracellulær bakterie (1) som overføres via flått (1, 2) og kan føre til den feberrelaterte sykdommen *Granulocytær Anaplasrose*. Infeksjonen har blitt påvist hos en rekke forskjellige arter, men langt fra alle individene som bærer bakterien viser tegn til sykdom (1, 2).

I august 2009 ble det gjennomført en seroprevalensstudie hos islandshest i Grimstad kommune. Hensikten med studiet var å få svar på følgende problemstilling: Er *Anaplasma phagocytophilum* et problem hos islandshest i Grimstad? Hvor mange islandshester har antistoffer mot bakterien og hvor mange av de seropositive hestene har vist symptomer på *Equin Granulocytær Anaplasrose* (EGA)?

Artikkelen inneholder også informasjon om symptomer, diagnostikk, terapi og forebyggende tiltak ved EGA hos hest.

Liste over forkortelser	
DNA	deoxyribonucleic acid
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EGA	equine granulocytær anaplasmose
EGE	equine granulocytær erlichose
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay
HGA	human granulocytær anaplasmose
HGE	human granulocytic agent
IF	indirect immunofluorescence
IFA	indirect immunofluorescence assay
LMI	leukocyte-migration-inhibition
PCR	polymerase chain reaction
p.i.	post inoculation
p.inf.	post infectionem

Innledning

I 1961 ble *Erichia Equi* for første gang beskrevet hos hest. Den forekom som en feberrelatert sykdom overført via flått (3, 4). Sykdommen har blitt påvist hos en rekke forskjellige arter, inkludert menneske. Den har i senere tid fått navnet *Granulocytær Anaplasmose* (2, 5).

Kliniske symptomer er akutt feber (4), letargi, anoreksi (4-7), ødemer i ekstremitetene, petekier, ikterus, ataksi og uvillighet til bevegelse (4, 6-8). Subklinisk infeksjon forekommer også (6, 9-12).

I august 2009 ble det gjennomført en seroprevalensstudie hos islandshest i Grimstad kommune, hvor hensikten med studiet var å finne ut om *A. phagocytophilum* var utbredt i kommunen. Hvor mange islandshester har antistoffer mot bakterien? Og hvor mange av de seropositive hestene har vist symptomer på EGA?

Hensikten med studiet var å få svar på hvilken av følgende hypoteser som representerer virkeligheten for islandshest i Grimstad kommune:

- I. *A. phagocytophilum* er et reelt problem hos islandshest i Grimstad, da mange hester er seropositive og mange av disse viser symptomer på EGA
- II. *A. phagocytophilum* er et reelt problem hos islandshest i Grimstad. På tross av et lavt antall seropositive hester, viser mange av de seropositive symptomer på EGA
- III. *A. phagocytophilum* er ikke et reelt problem hos islandshest i Grimstad. Mange hester er seropositive, men kun få viser symptomer på EGA
- IV. *A. phagocytophilum* er ikke et reelt problem hos islandshest i Grimstad. Få hester er seropositive og kun enkelte viser symptomer på EGA

Historisk bakgrunn

I over 200 år har flåttborne sykdommer hos ruminanter vært kjent i Europa (5). Det var først i 1932 at sykdommen forårsaket av *Rickettsia* ble assosiert med flåttbitt (13-15). Bakterien ble den gang klassifisert som *Rickettsia phagocytophila* (9), men til ære for den tyske bakteriologen Paul Erlich, byttet bakterien navn til *Erlichia phagocytophilum* (16). Hos hest ble den kalt *Erlichia Equi* (17, 18).

Bakterien har en predileksjon for granulocytter, hvor man i blodutstryk fra infiserte dyr kan gjenkjenne den i granulocytens cytoplasma. Dette gav sykdommen navnet *Granulocytær erlichose* (1).

Gjennom de siste 40 årene har infeksjonen blitt påvist hos mange spesies - som både har vært seropositive og PCR positive (4, 5, 19-21) - og i 1961 ble sykdommen for første gang beskrevet hos hest (3, 4, 17, 19-21). Senere ble det oppdaget en liknende febril sykdom hos mennesker (17, 18). Den utløsende faktoren ble kalt "the human granulocytic erlichiosis-agent", den såkalte HGE-agenten.

Anaplasma phagocytophilum

Anaplasma, *Erlichia*, *Cowdria*, *Neorickettsia* og *Wolbachia* er intracellulære bakterier som infiserer eukariote celler. Historisk sett er de plassert i taksa basert på morfologiske, epidemiologiske og kliniske egenskaper (1). Nye genetiske analyser av 16S rRNA, groESL og enkelte overflateproteiner har ført til ny inndeling av taksonomien (22). Dette har resultert i nye navn på enkelte bakterier, basert på deres genetiske likheter (1). Dermed ble *Erlichia Equi*, *Erlichia phagocytophila* og HGE-agent slått sammen til en "ny" spesies kalt *Anaplasma phagocytophilum* (se tabell nr. 1).

Tabell nr. 1. Bakterier, som i følge Rikihisa (23), tidligere tilhørte “*Ehrlichia* gruppen”:

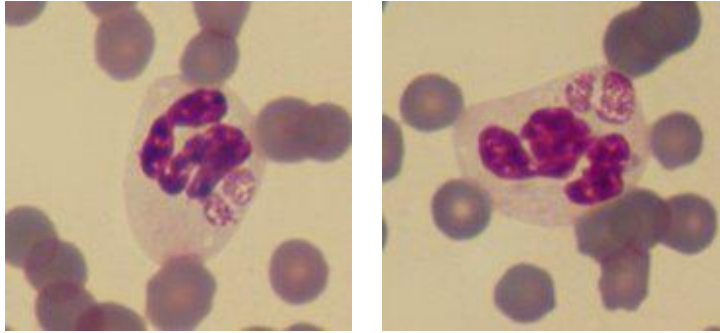
<i>Ehrlichia</i> gruppe	Dyr	Sykdom	Målcelle
1. <i>Ehrlichia canis</i>	Hund, mennekse	Canine ehrlichiosis Kliniske symptomer sjeldent	Monocyttter
1. <i>E chaffensis</i>	Menneske Hund	Human monocytic erlichiose Ikke navngitt	Monocyttter
1. <i>E ewingi</i>	Geit	Ikke navngitt	Monocyttter
	Menneske Hund	Human erlichiosis Canine granulocytic erlichiosis	Granulocyttter
2. <i>Anaplasma phagocytophilum</i> (tidligere HGE-agent) (tidligere <i>Ehrlichia equi</i>) (tidligere <i>Ehrlichia phagocytophila</i>)	Menneske	Human granulocytic erlichiosis	Granulocyttter
	Hest	Equine granulocytic erlichiosis	
	Hund Katt Ruminant	Canine granulocytic erlichiosis Feline granulocytic erlichiosis Tick-borne fever	
2. <i>Anaplasma platys</i> (tidligere <i>Ehrlichia platys</i>)	Hund	Canine cyclic thrombocytopenia	Thrombocyttter
2. <i>Anaplasma marginale</i>	Ku	Anaplasmose	Erythrocyttter
3. <i>Neorickettsia sennettsu</i> (tidligere <i>Ehrlichia sennetsu</i>)	Menneske	Sennetsu-feber	Mononuclære leukocyttter
3. <i>Neorickettsia risticii</i> (tidligere <i>Ehrlichia risticii</i>)	Hest	Potomac horse fever	Monocyttter

Avhengig av geografisk lokalisasjon foreligger flere varianter av bakterien. En undersøkelse fra 2001 viser at det eneste som skiller dem er gensekvensene *ank* og *groESL* (24, 25).

A. Phagocytophilum er en liten (0,2-2µm i diameter) (8, 18, 26), gram negativ, kokkoid, ellipseformet eller pleomorf bakterie som enten kan være stor og retikulær eller liten og inneholde kondensert protoplasma (1, 22).

Bakterien er en obligat intracellulær organisme som infiserer blodceller, i hovedsak neutrofile granulocyttter (8). Når bakterien har festet seg til målcellen gjennomfører den, til fordel for seg, en rekke mekanismer for å forandre målcellens miljø (21) og en vakuole dannes.

Etter som bakterien formerer seg vokser vakuolen og til slutt dannes separate fagosomer i granulocyttenes cytoplasma, såkalte inklusjonslegemer eller morulae (8, 26, 27) (se figur nr. 1). Hver morula kan inneholde opp til 33 bakterier (3) og ved å hindre fagosomets interaksjon med lysosomene unngår bakteriene degenerasjon (8, 21, 26, 27).



Figur nr. 1.: Blodutstryk med neutrofile celler som inneholder to morulae i cytoplasma (1).

A. phagocytophilum er sensitive mot oxytetracyklin, mens rifampicin, rifabutin og trovafloxasin kun er effektive *in vitro* (1, 28-30).

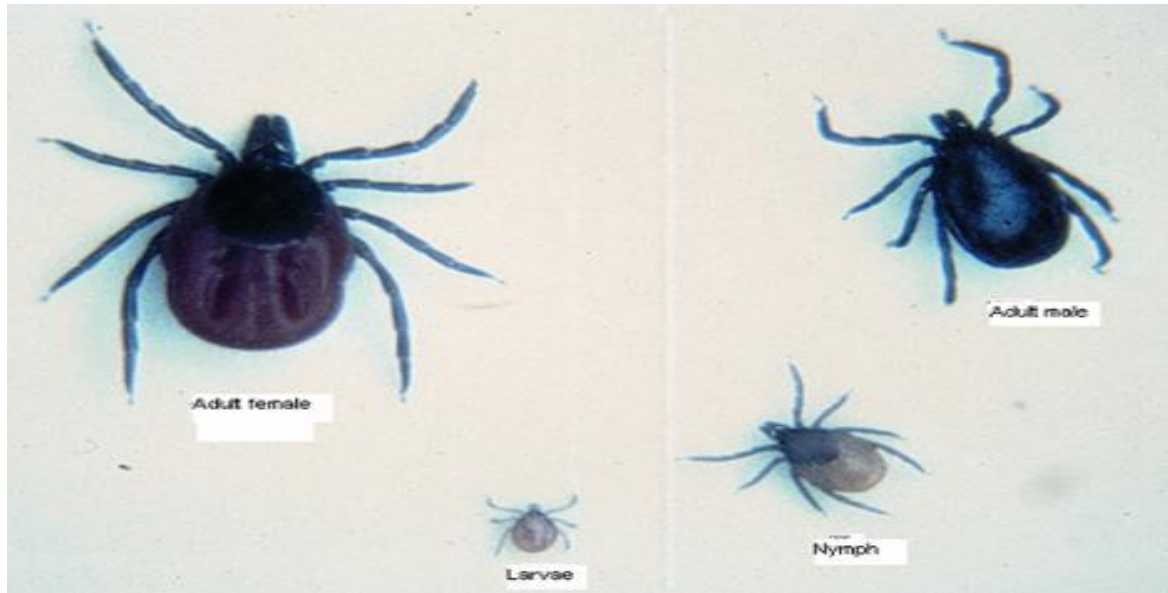
Vektor

A. phagocytophilum overføres via flåttbitt. I Europa representerer *Ixodes ricinus* hovedvektoren (5, 2), mens *I. pacificus* og *I. scapularis* er hovedvektorene i USA (31). Bakterien har også blitt assosiert med andre typer flått, som for eksempel *Haemaphysalis punctata* (32), *I. persulcatus* (33), *I. trianguliceps* (34), og *Rhipicephalus sanguinesu* (35), men den epidemiologiske betydningen av disse vektorene er ukjent (5).

Det har aldri blitt påvist andre vektorer enn flått, men det skal nevnes at *A. phagocytophilum* har blitt funnet i midd, som *Neotrombia autumnalis* (36) og *Syringophilidae*. Nyere studier indikerer at migrerende fugler spiller en viktig rolle for bakteriens overføring til andre arter (37). Bakterien kan smitte ved overføring av infisert blod (31) og ville dyr, som hjort, rådyr, dådyr og dåhjort fungerer som reservoar for bakterien (34).

Flåtten er enten hunkjønn eller hankjønn. Livssyklusen (se figur nr. 2) er delt inn i fire stadier: Egg, larve, nymfe og voksen. For å kunne utvikle seg til det neste stadiet er larven og nymfen avhengige av ett blodmåltid, mens den voksne hunnflåtten trenger et blodmåltid for å produsere egg. Larven og nymfen suger blod fra pattedyr og fugler i tre til fem og fem til syv dager, mens hunnflåtten suger blod fra pattedyr i syv til 13 dager. Hvert stadium varer i cirka ett år, mens hele livssyklusen kan vare fra to til syv år (1, 38).

Tidspunktet for overføring av *A. phagocytophilum* fra den infiserte flåtten til hesten, har blitt studert ved en rekke eksperimentelle infeksjoner. Hodzic et al. (39) anslår at bakterieoverføringen foregår innen de første 40 til 48 timene av blodmåltidet (1, 39).



Figur nr. 2: Illustrasjoner av de forskjellige stadiene i livet til *Ixodes ricinus*. Nymfen er ca 1.5mm lang, larven har tre par ben, mens de senere stadiene har fire par ben (1).

Kliniske symptomer, hematologi, prevalens og differensialdiagnoser

Langt fra alle individer som bærer *A. phagocytophilum* viser tegn til EGA. Subklinisk infeksjon forekommer hos ku (11), hund (12), sau (9), menneske (10) og hest (6).

Kliniske symptomer på *Granulocytær anaplasmose* er akutt feber i 2 til 20 dager (4). I tillegg forekommer letargi, delvis anoreksi (4, 5, 6, 7), ødemer i ekstremitetene, svake petekier, ikterus, ataksi og uvillighet til bevegelse (4, 6-8). Laminitt forekommer ikke (7).

De kliniske symptomene kan variere i alvorlighetsgrad, avhengig av varianten *A. phagocytophilum*, andre pattogener, dyrets immunstatus og kondisjon, klima, management (5) og alder: Hester yngre enn fire år viser svakere kliniske symptomer enn eldre hester (7).

Inkubasjonstiden ved naturlig infeksjon er anslått å være ti til 20 dager (41, 42), mens hos kunstig infiserte dyr er den kun fem til syv dager (43). Da initialfasen av sykdommen er preget av feber, kan den bli forvekslet med en virusinfeksjon.

Hos ubehandlede hester varer sykdomsforløpet vanligvis i ti til 14 dager. I sjeldne tilfeller utvikles også myokardiell vaskulitt (6, 41) og dødsfall kan forekomme, men dødsårsaken er stort sett traumer forårsaket av nedsatt koordinasjonsevne eller på grunn av en sekundærinfeksjon. Sistnevnte kommer av immunsuppresjon induisert av *A. phagocytophilum* (7). Hos sau og kyr forekommer abort og dårlig sædkvalitet, men dette har ikke blitt påvist hos hest (44).

Stuen et al. (45) påviste i 2002 en tydelig sammenheng mellom redusert vektøkning på seropositive lam i forhold til vektøkningen hos seronegative. Slike studier er til dags dato ikke gjennomført hos fyll.

Det skal også nevnes at klinisk manifestasjon hos mennesker strekker seg fra en mild influensaliknende sykdom til symptomer på en livstruende infeksjon (10).

Hematologiske undersøkelser gir en eller flere av følgende resultater:

- Anemi
- Leukopeni
- Trombocytopeni
- Inklusjonslegemer i neutrofile og/eller eosinofile granulocytter (4, 5, 7, 8)

Seroprevalens er avhengig av følgende faktorer:

- 1) Er området dyret befinner seg i belastet med aktuelle vektorer?
- 2) Er vektorene bærer av bakterien *A. phagocytophilum*?
- 3) Blir dyret behandlet med middel mot ektoparasitter?
- 4) Er dyret mye utendørs?
- 5) Når ble flått fjernet fra dyret?

I belastede området er andelen infiserte hester anslått til 0 % til 50 % (47). Se tabell nr. 2 for detaljer. Det er også funnet liknende resultater hos mennesker, hvor seroprevalensen varierer fra 5 % til 21 %, men kun et fåtall utvikler symptomer på HGE (48-51).

Tabell nr. 2: Studier om seroprevalens av antistoffer for *A. phagocytophilum* hos hest (1)

Studie	Publikasjonsår	Antall hester	% seropositive	Geografi
Madigan et al.	1990	240	10.4	California
Madigan et al.	1990	95	3.1	California
Bullock et al.	2000	741	10.8	Minnesota, Wisconsin
Egenvall et al.	2001	2018	16.6	Sweden
Teglas et al.	2005	74	13	Guatemala
Leblond et al.	2005	424	11.3	Frankrike (sør)
Levi et al.	2006	300	0	Israel
Amusatoguiet al.	2006	46	6.5	Spain (nordvest)

*For påvisning av antistoffer ble IFA brukt i alle studiene, bortsett fra studiet til Leblond' *et al.*, hvor ELISA ble benyttet.

Følgende **differensialdiagnoser** foreligger:

- Virus arteritt
- Purpura hemoragika
- Encefalitt
- Leversykdom (6)
- Annen systemisk infeksjon med feber og ingen lokalisierende symptomer (1)

Patologi

Kliniske og hematologiske funn ved EGA ble beskrevet i detalj av Gribble i 1969 og i 1970 (4, 41). Han infiserte et stort antall hester og gjennomførte klinisk overvåkning. Deretter ble dyrene avlivet og obdusert i forskjellige stadier av den kliniske infeksjonen.

Følgende funn ble påvist ved obduksjon:

- Blødninger, som petekier og ekkymoser i subkutant vev og i fascier
- Ødemer i ekstremitetene og ventrale abdomen
- Forhøyet volum av peritonealvæske
- Orkitt

I blodårer på eggstokker, testikler, plexus pampiniformis, i subkutis og i fascier på ekstremitetene ble det histopatologisk påvist inflammasjon og nekrotisk prolifererende lesjoner. Hevelser, tromboser og opphopning av inflammasjonsceller som monocytter og lymfocytter, neutrofile og eosinofile granulocytter ble også funnet.

I 2008 ble et tilsvarende forsøk gjennomført av Franzèn (1). Seks hester ble kunstig infisert og obduksjonsresultatene var tilnærmet identiske som Gribble's (4, 41) resultater.

Diagnostikk

For å diagnostisere *Granulocytær anaplasmose* finnes flere metoder. Diagnosen stilles i første omgang ut fra klinisk mistanke, men PCR, IF og mikroskopi er gode hjelpemidler.

Følgende diagnostiske kriterier foreligger for EGA:

- I. Kliniske symptomer på akutt sykdom og
- II. Påvisning av inklusjonslegemer i neutrofile cellers cytoplasma eller
- III. Påvisning av antistoffer i hestens serum (IFA eller ELSA) (1, 7, 47, 48) eller
- IV. Et positivt PCR-resultat (1, 48).

Påvisning av inklusjonslegemer ved mikroskopi

Inklusjonslegemene eller "morulae" kan identifiseres ved mikroskopisk analyse av blodutstryk fra individer som befinner seg i den akutte febrile fasen av sykdommen (1, 4, 8, 41, 52). I en undersøkelse gjennomført av Gribble (4, 41) ble inklusjonslegemer påvist spontant ved første feberdag, mens i undersøkelser gjennomført av Franzèn (1) ble morulae først påvist flere dager etter.

Inklusjonslegemene hos hest varierer fra 0,5 til 5µm i diameter (3, 4) og kan inneholde hele 20 til 30 bakterier. I blodutstryk kan man påvise inklusjonslegemer i mindre enn 1 % til cirka 30 % av de neutrofile cellene (6). Ved Giemsa-farge blir "morulae" mørk til lys blå og de fluoriserer ved farging med Akridine Orange (4). Blodet må ikke være eldre enn ett døgn (blodlegemene faller sammen) (53).

Flere laboratorier i Skandinavia har sluttet å gjennomføre denne analysen, da PCR er betydelig mer sensitiv.

Serologi ved IFA – immunfluorescenseanalyse

Ved hjelp av IFA kan man påvise spesifikke antistoffer som forteller at individet har blitt infisert (53). Antistoffene foreligger i en til ti dager etter at infeksjonen inntraff og kan forbli i blodet i minst åtte måneder. I løpet av de neste seks til ti måneder faller titeren gradvis (52).

Ved mistanke om akutt infeksjon kreves parede blodprøver med ti til 14 dagers intervall. Prøvene bør for øvrig sendes til det samme laboratoriet.

Titer på 1:40 blir sett på som positiv og blodet skal samles på serumrør (rør uten tilsetning) (52).

Følgende funn forekommer:

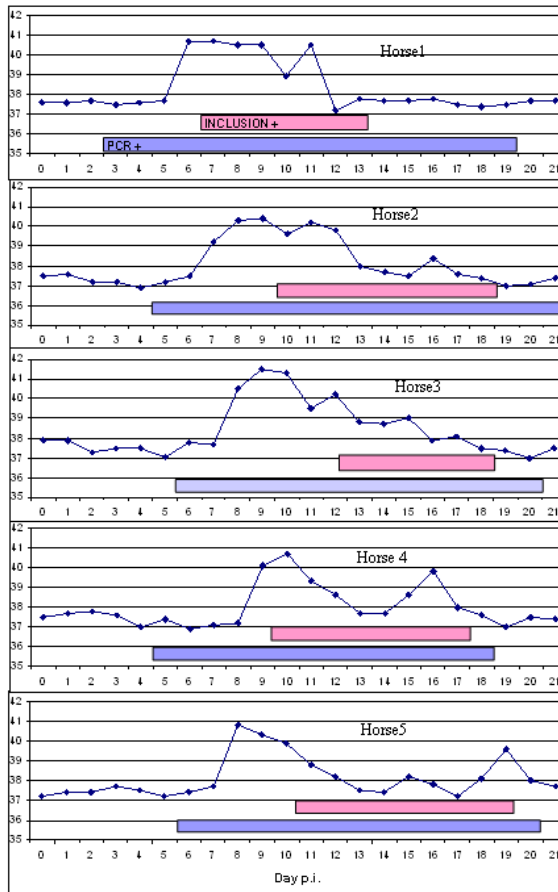
- En negativ eller lav titer i første prøve, som følges av en markant økning i titeren i den andre prøven, tilsier en akutt infeksjon.
- En lav eller negativ titer i første blodprøve, fulgt av en lav eller negativ titer i andre blodprøve, utelukker en akutt infeksjon. I slike tilfeller er det mulig at titeren er på vei ned, noe som betyr at hesten ble utsatt for en infeksjon lengre tilbake i tid.
- Er titeren høy ved første prøvetakning, er det ikke anbefalt å ta en ny prøve, da titeren trolig ikke vil stige enda mer (53).

I en studie gjennomført av Reubel *et al.* (42) ble tre hester kunstig infisert med *A. phagocytophilum* gjennom infiserte flått. To av hestene serokonverterte på dag fire og dag syv, men på tross av positiv PCR serokonverterte ikke den tredje hesten. I et annet forsøk utført av Pusterla (54), serokonverterte hestene seks til åtte dager etter infeksjon.

PCR – Polymerase chain reaction

Ved PCR påvises bakteriens DNA. Et positivt PCR svar foreligger allerede før den første dagen med feber (53). Dette ble også påvist av Franzèn (1) og illustreres på figur nr. 3. Enkelte bakteriologer påstår at positiv PCR kun foreligger de første syv til ti dager etter at infeksjonen har inntruffet, mens andre studier viser positiv PCR etter 12 til 22 dager post infectionem (42, 52).

Analysen kan uten problemer gjennomføres flere dager etter at prøven er tatt og blodet må samles på et EDTA-rør. Ulempene er at den også påviser døde organismer i blodet (53) og at det stilles store krav til hygienene ved prøvetakning og analysering.



Figur nr. 3: Figuren illustrerer de daglige prøveresultatene fra dag null til dag 21 p.i. gjennomført av Franzèn (1). Figuren viser kroppstemperatur (y-akse og tynn blå linje), positiv PCR (tykk blå linje) og synlige morulae (rosa linje) i neutrofile celler i perifert blod fra fem hester, som kunstig ble infisert med *A. phagocytophilum*. X-aksen viser det tidsmessige aspektet.

Immunrespons og immunitet

Uavhengig av kliniske symptomer, induserer bortimot hver infeksjon med *A. phagocytophilum* en spesifikk immunrespons (produksjon av antistoffer) hvor antistofftiteren ikke korrelerer med immunresponsens styrke. Batungbactal *et al.* (56) og Woldehiwet (57) påviste at infeksjon med *A. phagocytophilum* fører til en suppresjonsutvikling av det humorale immunforsvaret (56) og til nedsatt funksjon av de neutrofile cellene (57).

Tidspunktet det infiserte dyret utvikler immunitet etter infeksjon er ikke klarlagt. I en studie fra 1969 påviste Gribble *et al.* (4) at enkelte hester utvikler en vedvarende immunitet i opptil 20 måneder etter den første infeksjonen, mens Van Andel *et al.* påviste antistoffer i fem til 12 måneder (19) etter infeksjonen inntreffer.

Artursson *et al.* (55) gjorde følgende funn i sin studie fra 1999, hvor 45 hester med kliniske symptomer på EGA ble fulgt opp med IFA og PCR:

- 44 % var seropositive (IFA) i den akutte fasen av infeksjonen

- Alle hestene viste en hurtig stigning i antistoffnivå, som nådde et maksimum innen en måned etter det akutte stadiet
- Åtte måneder senere hadde antistofftiterene sunket, dog var 18 av 24 hester fortsatt positive
- Etter 12 til 15 måneder var alle hestene negative

Mramba *et al.* (58) injiserte blod fra hester som befant seg i den akutte fasen av EGA på fire ponnier. Deretter gjennomgikk dyrene daglige kliniske undersøkelser, LMI og IFA. To av ponnierne utviklet symptomer på sykdommen, mens alle utviklet både humoral og cellulær immunrespons. Antistoffene ble påvist i cirka 300 dager *post infectionem*.

Behandling og prevensjon

Effektiv terapi for EGA er bruk av oxytetracyclin (6-7mg/kg i.v.) en gang daglig i fem til syv dager (6, 20). Feberen forsvinner vanligvis innen 12 til 24 timer og andre symptomer forsvinner etter få dager. En tydelig bedring etter behandling med oxytetracyclin styrker for øvrig diagnosen (1, 4, 6), og ved for kort antibiotikabehandling kan infiserte hester igjen vise tegn til infeksjon. Symptomene foreligger i så fall innen 30 dager etter avsluttet behandling (1, 7).

I undersøkelsene gjennomført av Artursson *et al.* (55) varierte tiden for å oppnå rekonvalesens fra én dag til seks måneder etter avsluttet antibiotikabehandling.

Kontinuerlig fjerning av flått - helst innen 36 timer (1, 39) - og bruk av middel mot ektoparasitter viser seg å være effektiv som prevensjon (1). Det er foreløpig ingen vaksine tilgjengelig på markedet (48).

Seroprevalensstudiet

I august 2009 ble det gjennomført en seroprevalensstudie hos islandshest i Grimstad kommune. Grimstad ligger sør i Norge, nærmere bestemt i Aust-Agder fylke (se figur nr. 4). Kommunen ligger langs kysten og har et typisk norsk kystklima og mye skog, enger, jorder og fjell. Det befinner seg store mengder flått av typen *I. ricinus* i kommunen.



Figur nr.4: Kart over Sør-Norge og Danmark (59).

Material og metode

I august 2009 var det registrert 86 islandshester i Grimstad kommune. Hestene var fordelt på fem staller og et stort antall eiere (60) og det ble tatt blodprøver av et tilfeldig utvalg av 48 hester (navnene på alle hestene i kommunen ble lagt i en hatt og ble deretter trukket ut uavhengig av alder, kjønn, geografisk lokalisasjon, eier og treningstilstand). Antall hester ble bestemt ved hjelp av "EpiInfo".

Tjuefire av hestene var hopper, kun fem hester ble brukt i konkurranse og hestenes aldre var fordelt fra to til 25 år.

Blodprøvene ble samlet på serumrør, sentrifugert og deretter ble serumet sendt til SVA i Sverige for IFA.

For å få et representativt resultat forelå det enkelte kriterier for at hestene kunne delta i undersøkelsen:

- 1) Almenntilstanden på prøvedagen måtte være uten anmerkning
- 2) Hestene måtte ikke være behandlet med middel mot ektoparasitter det siste året
- 3) Hestene måtte ha oppholdt seg på beite i Grimstad store deler av døgnet i sommerhalvåret.

Før prøvene ble tatt, ble forsøket godkjent av "Avdeling for dyreforsøk" ved Norges Veterinærhøgskole.

Resultat

- Fire av 46 (8,69 %) hester var seropositive (se vedlegg nr. 1).
- To av disse hestene hadde titer på 1:40, mens de andre to hadde titer på 1:160.
- Av de seropositive hestene var det tre vallaker og en hoppe.
- Tre av de seropositive hestene var fire år eller yngre, mens den fjerde hesten var 18 år gammel.

- De unge seropositive hestene var under prøvetakningen til innridning, mens den fjerde ble brukt som hobbyhest.
- To av de seropositive hestene var oppstallet på samme stall mens de to andre befant seg på to forskjellige staller.
- Ingen av hestene var behandlet med midler mot ektoparasitter.

Følgende resultater kan leses ut fra statistikken (se vedlegg nr. 2-5):

Siden p -verdien i nullhypotesen $H_0 : p \geq 0.20$ (hvor $p = D/N$, hvor D er antallet seropositive islandshester i populasjonen og N er populasjonen av islandshester i Grimstad), ikke er med i det 95% konfidensintervallet for p (se vedlegg nr. 2), så kan nullhypotesen forkastes til fordel for den alternative hypotesen $H_1 : p < 0.20$.

På 5 % nivå kan derfor hypotesene I og III forkastes til fordel for hypotesene II og IV (se vedlegg nr. 3).

Diskusjon

Ut i fra tabell nummer to kan vi se at andelen seropositive hester fra tidligere studier varierer fra 0 % til 16.6 %. ”Mange hester” ble derfor satt til å være mer enn 20 % av hele populasjonen. På grunnlag av egen erfaring og det vi kan lese i tidligere publisert litteratur, definerer jeg ”få hester” når mindre enn 10 % av de seropositive hestene viser symptomer.

I utgangspunktet skulle 50 blodprøver undersøkes. Men siden to av hestene ikke var tilstedeværende på undersøkelsestidspunktet og to blodprøver av uvisst årsak ikke var mulig å analysere (SVA), ble kun 46 prøver analysert.

Det første man kan stille spørsmål ved er om resultatet av undersøkelsen er signifikant.

- Foreligger et tilstrekkelig antall blodprøver?
- Representerer hestene et gjennomsnitt av bestanden i Grimstad kommune?

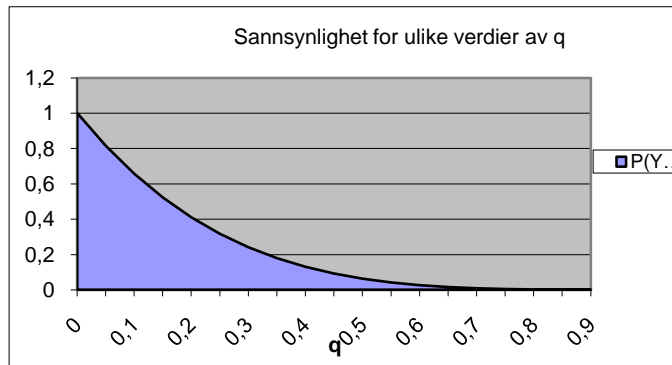
Siden undersøkelsene har blitt gjennomført på 5 % nivå og hestene er valgt ut gjennom tilfeldig utvalg, kan man konstatere at resultatene er signifikante.

Andre usikkerhetsmomenter er:

- Har hestene oppholdt seg i Grimstad kontinuerlig det siste halvåret?
- Foreligger det mørketall med hensyn til antall registrerte islandshester i kommunen?

Det andre man kan stille spørsmål ved er hvor stor usikkerhet det er knyttet til at ingen av de seropositive islandshestene viste kliniske symptomer på EGA. Islandshest er en robust hesterase som kan være vanskelig ”å lese”, og på tross av sykdom og lidelse kan en kraftig påkjent islandshest gi eieren et allment friskt inntrykk. Dette kan være en faktor man skal ta hensyn til når eierne påstår at hestene har vært friske det siste året.

Figur nr. 5 viser oss at i et utvalg på fire seropositive hester er det mindre enn 5 % sjanse for at ingen viser symptomer, gitt at den virkelige andelen seropositive hester som viser symptomer er 53 % eller større (se vedlegg nr. 4).



Figur nr. 5: Grafisk fremstilling av forhold mellom q og P, når q = Andel hester med symptomer i populasjonen av seropositive hester og P = sannsynligheten for ingen hester med symptomer i et utvalg på 4 hester.

Tre av de fire seropositive islandshestene i Grimstad var yngre enn fire år. Madigan et al. (7) påstår at hester yngre enn fire år viser svakere symptomer enn eldre hester. Hvis dette stemmer er sjansen stor for at en eller flere av de seropositive unghestene i Grimstad har hatt symptomer uten at eierne/trenerne har blitt oppmerksom på dette.

Et tredje spørsmål er hvorfor kun enkelte hester blir syke. Èn mulighet er de individuelle forskjellene i individenes immunforsvar. En annen mulighet er, som Peter Franzèn (61) antyder, muligheten for at enkelte hester har et bestemt molekyl i cellemembranen som setter i gang sykdomskaskaden. En tredje mulighet er at det foreligger flere ulike bakterier med forskjellig virulens (61).

På 90-tallet ble infeksjonen oppdaget hos mennesker og situasjonen er den samme som hos dyr; mange utvikler antistoffer uten at de blir klinisk syke. Flere av menneskene som har utviklet alvorlig symptomer og dødd i følge av HGA, har fått påvist nedsatt immunforsvar og/eller alvorlige bakenforliggende sykdom, som kreft eller aids (61).

Et fjerde spørsmål er hvorfor andelen hester som serokonverterer og utvikler symptomer adskilling høyere i eksperimentelle forsøk enn hos naturlig infiserte hester. Dette har blitt påvist ved flere anledninger, for eksempel i studiene til Gribble (4) og Reubel (42).

I følge litteraturen er forskjellene på naturlig infiserte hester og hester som er infisert gjennom intravenøs injeksjon begrenset (1, 62). Èn mulighet er at den hurtige i.v. injeksjonen ikke imiterer den naturlige smitteveien, hvor infeksjonen sannsynligvis er overført over tid. En annen mulighet er at ved intra venøs injeksjon er infeksjonsdosen mye høyere enn ved naturlig infeksjon. I et eksperimentelt forsøk av Pusterla fra 1999 (62) ble den intravenøse infeksjonsruten sammenliknet med den naturlige (flåttbitt). Hestene ble kunstig infisert med

HGE-agent. Den intravenøse ruten viste seg å ha en betydelig kortere inkubasjonstid og hurtigere serokonvertering enn ved den naturlige smitteveien.

Ytterligere kan det stilles spørsmål ved serokonverteringen. I studiet til Reubel et al. (42) var det kun to av tre hester som serokonverterte. Dette betyr at ikke alle hester som er infisert med *A. phagocytophilum* danner antistoffer mot bakterien. Hesten som ikke serokonverterte i studiet til Reubel et al. (42) var PCR positiv, men viste ingen symptomer på EGA. I den forbindelse kan man stille spørsmålene: Er det kun hester som serokonverterer som i enkelte tilfeller viser kliniske symptomer - eller kan de kliniske symptomene oppstå uten en forestående serokonversjon?

En annen problemstilling er om alder, kjønn, treningstilstand og geografisk lokalisasjon har betydning. Hos hestene i Grimstad var tre av de fire seropositive hestene yngre enn fire år, tre av fire seropositive hester var vallaker, i tillegg til at tre av de fire seropositive hestene var i dårlig til moderat treningstilstand. Antallet seropositive hester i dette studiet er for lavt til at man kan konkludere med at vallaker, hester i dårlig til moderat treningstilstand og unghester er mer mottakelige enn hopper, eldre hester og hester i god treningstilstand.

Et spørsmål som etter dette melder seg, er om resultatene hadde blitt mer signifikante hvis jeg hadde foretatt andre analysemetoder i tillegg til IFA. For å utvide studiet kunne jeg foretatt PCR, hematologi, parede blodprøver (IFA) og mikroskopi for å påvise inklusjonslegemer. Jeg ville i utgangspunktet kun undersøke hvor mange hester i Grimstad som var seropositive til *A. phagocytophilum* og hvor mange av disse som hadde vist symptomer på EGA.

IFA er den eneste metoden som forblir positiv over et lengre tidsrom etter at hesten ble utsatt for antigener. Hvis jeg skulle gjennomført PCR og mikroskopi kun én gang hadde det vært tilfeldig om jeg hadde fått positive eller negative resultater. Da måtte jeg enten utført disse undersøkelsene ukentlig hele sommerhalvåret, eller jeg måtte omformulert problemstillingen i oppgaven. Da de hematologiske resultatene ofte kun viser avvik i den akutte fasen av infeksjonen så jeg heller ingen grunn til å gjøre dette. Det som derimot hadde vært interessant var å ta parede blodprøver av de seropositive hestene for å se hvor i infeksjonsforløpet de befant seg, men dette ville ikke hatt utslagskraft på den regjerende problemstillingen i oppgaven.

En annen måte å utvide undersøkelsen på, er å gjennomføre et større forsøk, gjerne landsomfattende, for å finne ut om *A. phagocytophilum* virkelig er et problem. Ved å ta blodprøver av langt flere hester kunne man sammenliknet resultatene med alder, rase, kjønn, treningstilstand og geografisk lokalisasjon.

Konklusjon og perspektivering

På grunnlag av statistikken kan hypotesene I og III forkastes til fordel for hypotesene II og IV.

Siden mindre enn 10 % av de undersøkte islandshestene har antistoffer mot *A. phagocytophilum*, trekker resultatene av studiet i retning av at bakterien ikke er utbredt hos denne hesterasen i Grimstad kommune.

Spørsmålet om symptomfrihet hos seropositive islandshester i Grimstad, gir undersøkelsen intet svar på. Siden antallet seropositive islandshester i undersøkelsen er lavt, kan eiernes/trenernes påstand om at de seropositive hestene ikke har vist symptomer mot EGA, statistisk sett verken bekreftes eller avkreftes.

Selv om infeksjonen ikke er utbredt bør hestepraktiserende dyrleger kjenne til sykdommen og vite hvordan den diagnostiseres og behandles. Både PCR og IFA er gode verktøy, som bør benyttes ved mistanke om EGA.

Takk til

”DNV’s faglige/vitenskapelige fond” og ”Astrid og Birger Torsteds legat til fordel for dyrene” for finansiell støtte

Hester og hesteeiere/-trenere

Dr. scient. Trond Arnold Abrahamsen for hjelp til statistisk arbeid

Dyrlege Bjørg Siri Svendsen, Spesialist i hestesykdommer

Sørlandets Dyreklinikk for motivasjon og støtte

Min ektefelle Preben for tålmodighet og forståelse

SVA for god service og hjelp med analyse av blodprøvene

Dr. scient. Peter Franzèn

Julie Fjeldborg, Henrik Lundegaard og Håkan Vigre for hjelp til formulering av oppgaven

Vedlegg

Vedlegg nr.1: Prøvesvar

Vedlegg nr. 2: Konfidensintervall

Vedlegg nr. 3: Hypotesetest

Vedlegg nr. 4: Bionomisk fordeling

Vedlegg nr. 5: Hyperergonomisk fordeling

Referanser

1. Franzén P. On *Anaplasma phagocytophilum* in Horses, Doctorial Thesis, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala, 2008.
2. Strle F, Human granulocytic ehrlichiosis in Europe. *International Journal of Medical Microbiology*, 2004; 293: S37, 27-35.
3. Sells DM, Hildebrandt PK, Lewis Jr GE, Nyindo MBA, Ristic M. Ultrastructural observations on *Ehrlichia equi* organisms in equine granulocytes. *Infection and immunity*, 1976; 13: 273-80.
4. Gribble DH, Equine ehrlichiosis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1969; 155: 462-9.
5. Stuen S. *Anaplasma phagocytophilum* – the most widespread tick-borne infection in animals in Europe. *Vet. Res. Commun.* 2007; 31 Suppl. 1: 79-84.
6. Madigan JE, Pusterla N, Ehrlichial diseases. *Vet. Clin. N. Am.: Equine practice* 2000; 16: 487-9.
7. Madigan JE, Gribble DH, Equine ehrlichiosis in northern California: 49 cases (1968 –1981). *JAVMA.* 1987; 90: 445-448.
8. Rikihisa Y, The tribe *Ehrlichieae* and ehrlichial diseases. *Clin. Microbiol. Rew.* 1991; 4: 286-308.
9. Foggie A, Studies on the infectious agent of tick-borne fever in sheep. *J. Pathol. Bact.* 1951; 63: 1-15.
10. Dumler JS, Choi KS, Garcia HC, Barat NS, Scorpio DG, Garyu JW, Grab DJ og Bakken JS, Human granulocytic anaplasmosis and *Anaplasma phagocytophilum*. *Emerging Infectious Disease*, 2005; 11: 1828-1834.
11. Larsson LG, Aspan A, Bergström K, Persistens av *Anaplasma phagocytophilum* hos naturligt infekterade svenska nötkreatur, *Sv. Vettidn.* 2006; 58:13-9.
12. Egenvall A, Bonnet BN, Gunnarsson A, Hedhammar A, Shoukri M, Bornstein S, Artursson K *et al.*, Sero-prevalence of granulocytic *Ehrlichia spp* and *Borrelia burgdorferi sensu lato* in Swedish dogs 1991-94. *Scand. J. Infect. Dis.* 2006b; 32:19-25.
13. Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR, MacLeod J, Studies in louping ill. (Anencephalomyelitis of sheep). *J. Comp. Pathol. and Therap.* 1932a; 42: 106-40. 14. Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR, MacLeod J, Tick-borne fever (a hitherto undescribed disease of sheep). *J. Comp. Pathol.* 1932b; 45: 301-7.
15. Gordon WS, Brownlee A, Wilson DR, Studies in louping-ill, tick-borne fever and scrapie. *Proceedings: 3rd International Congress of Microbiology* New York, 1940; 362-3.
16. Philip CB. Tribe II *Ehrlichieae* In (Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.) *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 8th ed.; 893-7; 1974.
17. Bakken JS, Dumler JS, Chen SM, Eckman MR, Van Etta LL, Walker DH, Human granulocytic ehrlichiosis in the upper midwest United States: a new species emerging. *JAMA.* 1994; 272: 212-8.
18. Chen SM, Dumler JS, Bakken JS, Walker DH, Identification of agranulocytotropic *Ehrlichia* species as the etiologic agent of human disease. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32: 589-95.
19. Van An del AE, Magnarelli LA, Heimer R, Wilson ML, Development and duration of antibody response against *Ehrlichia equi* in horses. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1998; 212:1910-4.
20. Madigan JE, Equine ehrlichiosis. *Vet. Clin. N. Am.: Equine practice* 9, 1993; 423-8.
21. Barlough JE, Madigan JE, DeRock E, Dumler JS, Bakken JS, Protection against *Ehrlichia equi* is conferred by prior infection with the human granulocytotropic *Ehrlichia* (HGE agent). *J. Clin. Microbiol.* 1995; 33: 3333-4.
22. Dumler JS, Barbet AF, Bekker CPJ, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, Rurangirwa FR, Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2001; 51: 2145-65.
23. Rikihisa Y, Diagnosis of emerging ehrlichial diseases of dogs, horses and humans. *J. Vet. Intern. Med.* 2000; 14: 250-1.
24. Björnsdorff A, Bagert B, Massung RF, Gusa A, Eliasson I, Isolation and characterization of two european strains of *Ehrlichia phagocytophila* of equine origin. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 2002; 2: 341

25. Stuen S, Bergström K, Petrovec M, van de Pol I and Schouls LM, Differences in clinical manifestations and hematological and serological responses after experimental infection with genetic variants of *Anaplasma phagocytophilum* in sheep. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, 2003; 10: 692-695.
26. Carlyon JA, Fikrig E, Invasion and survival strategies of *Anaplasma phagocytophilum*. *Cell. Microbiol.* 2003; 5: 743-54.
27. Carlyon JA, Fikrig E, Mechanisms of evasion of neutrophil killing by *Anaplasma phagocytophilum*. *Curr. Opin. Hematol.* 2006; 13: 28-33.
28. Brouqui P, Raoult D, In vitro antibiotic susceptibility of the newly recognized agent of ehrlichiosis in humans, *Ehrlichia chaffeensis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1992; 36: 2799-803.
29. Brouqui P, Raoult D, Susceptibilities of ehrlichiae to antibiotics. In *Antimicrob. agents intracellular pathogens* ed. Raoult D, CRC Press, Boca Raton. 1993; 181-99.
30. Horowitz HW, Hsieh TC, Agüero-Rosenfeld ME, Kalantarpour F, Chowdhury I, Woermser GP, Wu JM *et al.*, Antimicrobial susceptibility of *Ehrlichia phagocytophila*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001; 45: 786-8.
31. McQuiston JH, Childs JE, Chamberland ME, Tabor E, Transmission of tickborne agents of disease by blood transfusion: a review of known and potential risks in the United States. *Transfusion* 2000; 40: 274-84.
32. MacLeod J, Ticks and diseases in domestic stocks in Great Britain. *Symposium of the Zoological Society of London*, 1962; 6: 29-50.
33. Alekseev A, Dubinia H and Schouls L, First detection of *Ehrlichia* infected ticks among the primary vectors of the tick-borne encephalitis and borreliosis in the Russian Baltic region. *Bulletin of the Scandinavian Society for Parasitology*, 1998; 8: 88-91.
34. Oegden N H, Brown K, Horrocks BK, Woldehiwet Z and Bennett M, Granulocytic *Ehrlichia* infection in ixodid ticks and mammals in woodlands and uplands of the UK. *Medical and Veterinary Entomology*, 1998; 12: 423-429.
35. Alberti A *et al.*, *Anaplasma phagocytophilum*, Sardinia, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 2005; 11: 1322-1323.
36. Fernández-Soto P, Pérez-Sánchez R and Encinas-Grandes A, Molecular detection of *Ehrlichia Phagocytophila* genogroup organisms in larvae of *Neotrombicula autumnalis* captured in Spain. *Journal of Parasitology*, 2001; 87: 1482-1483.
37. Skoracki M, Michalik J, Skotarczak B, Rymaszewska A, Sikora B, Hofman T., Wodecka B and Sawczuk M *et al.*, First detection of *Anaplasma phagocytophilum* in quill mites parasitizing passerine birds. *Microbes and Infection*, 2006; 8: 303-307.
38. Balashov Y S, Blood sucking ticks (*Ixodoica*) – vectors of disease in man and animals (Engl. trans from Russian original). *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* 1972; 8: 163-176.
39. Hodzic E, Fish D, Maretzki CM, Silva AM, Feng SL, Barthold SV, Acquisition and transmission of the agent of human granulocytic ehrlichiosis by *Ixodes scapularis* ticks. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 3574-8.
40. Telford SR, Dawson JE, Katavolos P, Warner CK, Kolbert CP, Persing DH, Perpetuation of the agent of human granulocytic ehrlichiosis in a deer tick-rodent cycle. *Nat. Acad. Sci. USA Proc.* 1996; 93: 6209-14.
41. Gribble DH, Equine Ehrlichiosis. PhD thesis. Davis, University of California at Davis, 1970
42. Reubel GH, Kimsey RB, Barlough JE, Madigan JE, Experimental transmission of *Ehrlichia equi* to horses through naturally infected ticks (*Ixodes pacificus*) from northern California. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36: 2131-34.
43. Pusterla N, Madigan JE, Asanovich KM, Chae JS, Derock E, Leutenegger CM, Pusterla JB, Lutz H, Dumler JS *et al.*, Experimental inoculation with human granulocytic ehrlichial agent derived from high- and low-passage cell cultures in horses. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38: 1276-78.
44. Woldehiwet Z and Scott GR, Tick-borne (pasture) fever. In: Z. Woldehiwet and M. Ristic (eds), *Rickettsial and clamydial diseases of domestic animals*, Pregamon Press, Oxford, 1993; 233-254.
45. Stuen S, Bergström K, Palmér E, Reduced weight gain due to subclinical *Anaplasma phagocytophilum* (formerly *Ehrlichia phagocytophila*) infection. *Exp. Appl. Acarol.* 2002b; 28: 209-15.
46. Bjöersdorff A., Myrin Carlsson I, Borrelios och ehrlichios hos häst – modediagnos eller reellt problem? *Sv. Vettidn.* 1998; 50: 197-201.
47. Madigan JE, Pusterla N, Johnson E, *et al.*, Preliminary report on the transmission of *Ehrlichia Equi* in horses of northern California. *JAVMA* 1990; 196: 1962-1964.
48. Pusterla N, Madigan JE, *Anaplasma phagocytophila*. In: Sellon, D. Long, M. *Equine Infectious Diseases* St: Louis, Miss. USA, 2007; 354-7
49. Agüero-Rosenfeld ME, Donnarumma L, Zentmaier L, Jacob J, Frey M, Noto R, Wormser GP *et al.*, Seroprevalence of antibodies that react with *Anaplasma phagocytophila*, the agent of human granulocytic ehrlichiosis, in different populations in Westchester County, New York. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40: 2612-5.
50. Dumler JS, Dotevall L, Gustafson R, Granström M, A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. *J. Infect. Dis.* 1997; 175: 720-2.
51. Woessner R, Gaertner BC, Grauer MT, Weber K, Mueller-Lantsch N, Hunfeld KP, Treib J *et al.*, Incidence and prevalence of infection with human granulocytic ehrlichiosis agent in Germany. A prospective study in young healthy subjects. *Infection.* 2001; 29: 271-3.
52. Veterinær Elisabeth Bagge v/SVA, muntlig referanse
53. www.sva.se (hjemmeside på internett) <http://www.sva.se/sv/navigera/Djurhalsa/Hast/Fastingburna-sjukdomar/Granulocytar>- ehrlichios/ (opdatert 10.12.2007)
54. Pusterla N, Lutz H, Braun U, Experimental infection of four horses with *Ehrlichia phagocytophila*. *Vet. Rec.* 1998b; 143: 303-5.
55. Artursson, K., Gunnarsson, A., Wikström, U-B., Engvall, E.O. (1999) A serological and clinical follow-up in horses with confirmed equine granulocytic ehrlichiosis. *Equine. Vet J.* 31, 473-7.

56. Batungbactal MR and GR Scott, Suppression of the immune respons to clostridial vaccine by tick-borne fever. *J. Comp. Pathol.* 1982; 92: 403-407.
57. Woldehiwet Z, The effects of tick-borne fever on some functions of polymorphonuclear cells of sheep. *J. Comp. Pathol.* 1987; 97: 481-485.
58. Mramba BA, Nyindo MBA, Ristic M, Lewis GE, Huxsoll DL, Stephenson EH, Immune response of ponies to experimental infection with *Ehrlichia equi*. *Am. J. Vet.Res.* 1978; 39: 15-18.
59. www.wikipedia.org (homepage on the internet)
60. Simme Jakobsen, formann i Hrani – islandshestforening i Arendal og Grimstad, muntlig referanse
61. Peter Franzèn, muntlig referanse
62. Pusterla N, Leuteneger CM, Chae JS, Lutz H, Kimsey RB, Dumler JS, Madigan JE *et al.*, Quantitative evaluation of ehrlichial burden in horses after experimental transmission of human granulocytic *Ehrlichia* agent by intravenous inoculation with infected leukocytes and by infected ticks. *J. Clin. Microbiol.* 1999a; 37: 4042-4.

Vedlegg nr. 1:

Prøvesvar, SVA



RAPPORT
Slutsvar

1(4)

Sörlandets Dyreklinikk
Mari C. Lungholt
Travparkveien 40
4636 KRISTLANSAND
NORGE
Kundid 16101

UppdragID U090812-0435
Svarsdatum 2009-08-17
Kontakt 018-674248

Kunduppgifter

Veterinärinstitutet, OSLO
Sörlandets Dyreklinikk, Mari C. Lungholt,
KRISTLANSAND
Kringeland, Jakobsen, Skarstein, Ågreneset, Larsen

Insändare	Djurägare	Svarsmott	Fakturamott
<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

Kommentar

Provtagningsdatum: 2009-08-07--08

Insänt material

Ankomstdatum 2009-08-12

Djurslag	Material	Antal	Prov taget
Häst, Islandshäst	Blod	47	Ej angivet

* Analysen är utförd med en ackrediterad metod

ENHET FÖR BAKTERIOLOGI
post. 751 89 UPPSALA
telefon. 018-67 40 00, fax. 018-30 91 62
e-post. sva@sva.se, webb. www.sva.se
org.nr. 03-202100-1868-01, EU- VAT No. SE 202100186801



Rapport utfärdad av ackrediterat laboratorium.
Denna rapport får endast återges i sin helhet,
om inte utfärdande laboratorium i förväg godkänner annat.

Resultat

Anaplasma phagocytophilum

Teknik Immunofluorescens (IF)

Von	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Gna	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Agla	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Spes	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Freya	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Krafle	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Drottning	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Flugsvinn	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Kylja	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Gianni	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Hlekkur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Gandalvur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Undri	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Raukur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Blokk	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Olina	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Vengur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Seidur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar påvisade, titer 1:40 *
Hugin	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Oda	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *

* Analysen är utförd med en ackrediterad metod

Arka	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Mari-Vallak	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Randvaer	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Sort	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar påvisade, titer 1:160 *
Krapla	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Kilja	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar påvisade, titer 1:40 *
Alda	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Rhönn	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Glitra	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Sort-Brun	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
No-Name	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Landi	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar påvisade, titer 1:160 *
Freia 2	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Tara	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Funi	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Ljosi	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Rammi	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Gikkur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Laki	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Valtyr	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Helgi	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Voerdur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *

* Analysen är utförd med en ackrediterad metod

Ofsi	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Blacky	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Hrodalur	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Deplar	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *
Fluga	
Blod	Anaplasma phagocytophilum, antikroppar ej påvisade *

Information

Som positivt prov räknas en titer 1:40 eller högre.

* Akkrediteringen omfattar endast djurslagen häst och hund.

Om djuret är eller har varit infekterat med aktuellt smittämne kan antikroppar påvisas. Långt ifrån alla djur utvecklar sjukdom efter att ha träffat bakterien. Att antikroppar finns är alltså inte liktydigt med att djuret har sjukdomen granulocytär anaplasmos (f.d. ehrlichios).

Behandling sänker inte antikroppshalten. Prov för att kontrollera svar på behandling rekommenderas därför inte.

* Analysen är utförd med en ackrediterad metod

Vedlegg nr. 2:

Seropositive

La

- $N =$ Størrelsen på populasjonen av islandshester i Grimstad kommune = 86.
- $D =$ Størrelsen på populasjonen av seropositive islandshester i Grimstad kommune.
- $p = \frac{D}{N} =$ Andelen seropositive hester i populasjonen av islandshester i Grimstad kommune.
- $n =$ Utvalgsstørrelse = 46.
- $X =$ Antall hester i et utvalg på $n=46$ islandshester som er seropositive.

Under forutsetning av tilfeldig trekning, så er X hypergeometrisk fordelt med forventning

$$EX = np \text{ og varians } VarX = \frac{N-1}{N-n} np(1-p).$$

Konfidensintervall

Estimator for p : $\hat{p} = \frac{X}{n}$.

Utvalget på $n = 46$ hester ble trukket tilfeldig. Av disse hestene ble 4 observert seropositive, dvs. $X^{obs} = 4$, så $\hat{p}^{obs} = \frac{4}{46} \approx 0.087$. Under forutsetningene over, er da et venstresidig 95% konfidensintervall $[0, D_2]$ for D gitt ved at D_2 er den minste D -verdien som oppfyller at

$$P(X \leq X^{obs} : p = \frac{D}{N}) = P(X \leq 4 : p = \frac{D}{86}) = \sum_{k=0}^4 \frac{\binom{86-D}{46-k} \binom{D}{k}}{\binom{86}{46}} \leq 0.05.$$

Beregninger viser at $P(X \leq 4 : p = \frac{14}{86}) \approx 0.04$, mens $P(X \leq 4 : p = \frac{13}{86}) \approx 0.07$. Følgelig er

$D_2 = 14$. Siden vi vet at $D \geq 4$, dvs. $p \geq \frac{4}{46} \approx 0.087$, så blir et venstresidig 95% konfidensintervall for p lik $[0.087, 0.163]$.

Vedlegg nr. 3:

Hypotesetest

Vi ønsker å teste følgende hypoteser:

$$H_0 : p \geq 0.20 \text{ mot } H_1 : p < 0.20$$

Siden p -verdien i nullhypotesen, $H_0 : p \geq 0.20$, ikke er med i det 95% konfidensintervallet for p over, så kan nullhypotesen forkastes til fordel for den alternative hypotesen

$$H_1 : p < 0.20.$$

Vedlegg nr. 4:

Seropositive med symptomer

La

- $N =$ Størrelsen på populasjonen av seropositive islandshester i Grimstad kommune.
- $M =$ Størrelsen på populasjonen av seropositive islandshester som har vist symptomer på EGA i Grimstad kommune.
- $q = \frac{M}{N} =$ Andelen seropositive hester som har vist symptomer på EGA i populasjonen av seropositive islandshester.
- $n =$ Utvalgsstørrelse = 4.
- $Y =$ Antall hester som har vist symptomer på EGA i et utvalg på $n=4$ fra populasjonen av seropositive islandshester i Grimstad kommune.

Under disse forutsetningene blir Y hypergeometrisk fordelt med forventning $EY = nq$ og

varians $VarY = \frac{N-1}{N-n} q(1-q)$.

I det opprinnelige tilfeldige utvalget på 46 hester fra populasjonen av islandshester i Grimstad kommune, ble 4 hester observert seropositive. Disse 4 hestene kan igjen sees på som et tilfeldig utvalg på $n = 4$ fra populasjonen av alle seropositive islandshester i Grimstad kommune. Det viste seg at ingen av de 4 seropositive hestene hadde vist symptomer på EGA, dvs. $Y^{obs} = 0$. Fra tabellen i fila **seropositive-ega.xls**, kan vi blant annet se at sannsynligheten for at dette skal skje er 5 % eller mindre hvis den virkelige andelen q er 53 % eller større. Det er med andre ord stor sannsynlighet for at den virkelige andelen q er mindre enn 53 %.

Definisjoner

N = Størrelse på poulasjonen av seropositive hester i Grm. kommune
M = Antall hester med symptomer på EGA i poulasjonen av seropositive i Grm. kommune
n = Utvalgsstørrelse = 4
Y = Antall i utvalget med symptomer på EGA

Forklaring

Tabellen under viser sannsynligheter for at ingen hester i et utvalg på 4 seropositive, har vist symptomer på EGA for ulike valg av N og M, dvs. $P(Y=0:M,N)$ for ulike valg av N og M. Beregningene er basert på at Y er hypergeometrisk fordelt, dvs. $Y \sim \text{hyp}(N,M,n)$.

Konklusjon

Av tabellen ser vi at den kombinasjonen av M og N som gir størst andel $p=M/N$ og som samtidig gir $P(Y=0:M,N) \leq 0,05$, er $M = 11$ og $N=21$. Andelen blir i dette tilfellet $11/21=0,524$. Dvs. hvis den virkelige andelen $M/N = 0,53$, så er det mindre enn 5% sjanse for at ingen i et utvalg på 4 seropositive hester har vist symptomer på EGA.

N	M=0	M=1	M=2	M=3	M=4	M=5	M=6	M=7	M=8	M=9	M=10	M=11	M=12	M=13	M=14	M=15	M=16	M=17	M=18	M=19	M=20	M=21
4,00	1,00																					
5,00	1,00	0,20																				
6,00	1,00	0,33	0,07																			
7,00	1,00	0,43	0,14	0,03																		
8,00	1,00	0,50	0,21	0,07	0,01																	
9,00	1,00	0,56	0,28	0,12	0,04	0,01																
10,00	1,00	0,60	0,33	0,17	0,07	0,02	0,00															
11,00	1,00	0,64	0,38	0,21	0,11	0,05	0,02	0,00														
12,00	1,00	0,67	0,42	0,25	0,14	0,07	0,03	0,01	0,00													
13,00	1,00	0,69	0,46	0,29	0,18	0,10	0,05	0,02	0,01	0,00												
14,00	1,00	0,71	0,49	0,33	0,21	0,13	0,07	0,03	0,01	0,00	0,00											
15,00	1,00	0,73	0,52	0,36	0,24	0,15	0,09	0,05	0,03	0,01	0,00	0,00										
16,00	1,00	0,75	0,55	0,39	0,27	0,18	0,12	0,07	0,04	0,02	0,01	0,00	0,00									
17,00	1,00	0,76	0,57	0,42	0,30	0,21	0,14	0,09	0,05	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00								
18,00	1,00	0,78	0,59	0,45	0,33	0,23	0,16	0,11	0,07	0,04	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00							
19,00	1,00	0,79	0,61	0,47	0,35	0,26	0,18	0,13	0,09	0,05	0,03	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00						
20,00	1,00	0,80	0,63	0,49	0,38	0,28	0,21	0,15	0,10	0,07	0,04	0,03	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00					
21,00	1,00	0,81	0,65	0,51	0,40	0,30	0,23	0,17	0,12	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00				
22,00	1,00	0,82	0,66	0,53	0,42	0,33	0,25	0,19	0,14	0,10	0,07	0,05	0,03	0,02	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00			
23,00	1,00	0,83	0,68	0,55	0,44	0,35	0,27	0,21	0,15	0,11	0,08	0,06	0,04	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00		
24,00	1,00	0,83	0,69	0,56	0,46	0,36	0,29	0,22	0,17	0,13	0,09	0,07	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00	
25,00	1,00	0,84	0,70	0,58	0,47	0,38	0,31	0,24	0,19	0,14	0,11	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
26,00	1,00	0,85	0,71	0,59	0,49	0,40	0,32	0,26	0,20	0,16	0,12	0,09	0,07	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00	0,00
27,00	1,00	0,85	0,72	0,61	0,50	0,42	0,34	0,28	0,22	0,17	0,14	0,10	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
28,00	1,00	0,86	0,73	0,62	0,52	0,43	0,36	0,29	0,24	0,19	0,15	0,12	0,09	0,07	0,05	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00	0,00
29,00	1,00	0,86	0,74	0,63	0,53	0,45	0,37	0,31	0,25	0,20	0,16	0,13	0,10	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00	0,00
30,00	1,00	0,87	0,75	0,64	0,55	0,46	0,39	0,32	0,27	0,22	0,18	0,14	0,11	0,09	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00
31,00	1,00	0,87	0,75	0,65	0,56	0,48	0,40	0,34	0,28	0,23	0,19	0,15	0,12	0,10	0,08	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01	0,00
32,00	1,00	0,88	0,76	0,66	0,57	0,49	0,42	0,35	0,30	0,25	0,20	0,17	0,13	0,11	0,09	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01
33,00	1,00	0,88	0,77	0,67	0,58	0,50	0,43	0,37	0,31	0,26	0,22	0,18	0,15	0,12	0,09	0,07	0,06	0,04	0,03	0,02	0,01	0,01
34,00	1,00	0,89	0,78	0,68	0,59	0,51	0,44	0,38	0,32	0,27	0,23	0,19	0,16	0,13	0,10	0,08	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02	0,01
35,00	1,00	0,89	0,78	0,69	0,60	0,52	0,45	0,39	0,34	0,29	0,24	0,20	0,17	0,14	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05	0,03	0,02	0,01
36,00	1,00	0,89	0,79	0,69	0,61	0,53	0,47	0,40	0,35	0,30	0,25	0,21	0,18	0,15	0,12	0,10	0,08	0,07	0,05	0,04	0,03	0,02
37,00	1,00	0,89	0,79	0,70	0,62	0,54	0,48	0,41	0,36	0,31	0,27	0,23	0,19	0,16	0,13	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05	0,04	0,03
38,00	1,00	0,89	0,80	0,71	0,63	0,55	0,49	0,43	0,37	0,32	0,28	0,24	0,20	0,17	0,14	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05	0,04
39,00	1,00	0,90	0,80	0,72	0,64	0,56	0,50	0,44	0,38	0,33	0,29	0,25	0,21	0,18	0,15	0,13	0,11	0,09	0,07	0,06	0,05	0,04
40,00	1,00	0,90	0,81	0,72	0,64	0,57	0,51	0,45	0,39	0,34	0,30	0,26	0,22	0,19	0,16	0,14	0,12	0,10	0,08	0,07	0,06	0,05
41,00	1,00	0,90	0,81	0,73	0,65	0,58	0,52	0,46	0,40	0,36	0,31	0,27	0,23	0,20	0,17	0,15	0,12	0,10	0,09	0,07	0,06	0,05
42,00	1,00	0,90	0,82	0,73	0,66	0,59	0,53	0,47	0,41	0,37	0,32	0,28	0,24	0,21	0,18	0,16	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07	0,06
43,00	1,00	0,91	0,82	0,74	0,67	0,60	0,54	0,48	0,42	0,38	0,33	0,29	0,25	0,22	0,19	0,17	0,14	0,12	0,10	0,09	0,07	0,06
44,00	1,00	0,91	0,82	0,75	0,67	0,61	0,54	0,49	0,43	0,39	0,34	0,30	0,26	0,23	0,20	0,17	0,15	0,13	0,11	0,09	0,08	0,07

Vedlegg nr. 5:

Hypergeometrisk

Istedenfor å oppfatte utvalget på $n=4$ seropositive hester, som et utvalg fra populasjonen av alle seropositive hester i hele verden (dvs. fra N_2), kan vi oppfatte det som et utvalg fra populasjonen av alle seropositive islandshester i Grimstad kommune (dvs. fra N). Da blir Y hypergeometrisk fordelt med forventning $EY = np$ og varians $VarY = \frac{N-n}{N-1} p(1-p)$. Fra diagrammet i fila **seropositive-ega.xls** ser vi at

$P(Y = 0 : M = 2) \approx 0.067$, mens $P(Y = 0 : M = 3) \approx 0.029$. Dette forteller oss at med hhv 97 % og 93 % sikkerhet så er sannsynligheten for at en hest har hatt symptomer, gitt at den er seropositiv, er mindre enn hhv $\frac{3}{7} \approx 43\%$ og $\frac{2}{6} \approx 33\%$.