

Förekomst av *Lawsonia intracellularis* och *Brachyspira* spp. hos häst i Sverige

Occurrence of Lawsonia intracellularis and Brachyspira spp. in Swedish horses

Ted Johansson

**Handledare: Magdalena Jacobson
Inst. för Kliniska Vetenskaper (KV)**

**Biträdande handledare: Merike Ronéus, SVA
Claes Fellström, Inst. för KV**

**Sveriges lantbruksuniversitet
Fakulteten för veterinärmedicin och
husdjursvetenskap
Veterinärprogrammet**

**Swedish University of Agricultural Sciences
Faculty of Veterinary Medicine and
Animal Sciences
Veterinary Medicine Programme**

**Examensarbete 2006:5
ISSN 1652-8697
Uppsala 2006**

**Degree project 2006:5
ISSN 1652-8697
Uppsala 2006**

STORT TACK TILL

- De fyra stuterier som ingår i studien, utan Er medverkan hade denna studie inte gått att genomföra
- Personalen på stuterierna för all hjälp med provtagning
- Mina handledare Magdalena Jacobson, Merike Ronéus, Claes Fellström och Therese Råsbäck
- SVA och den trevliga och hjälpsamma personalen på labbet
- Fredrik för uppmuntran, stöd, labhjälp och korrekturläsning av vissa delar av arbetet

INNEHÅLLSFÖRTECKNING

| | |
|---|-----------|
| <u>SUMMARY</u> | 1 |
| <u>SAMMANFATTNING</u> | 1 |
| <u>INLEDNING</u> | 2 |
| <i>Lawsonia intracellularis</i> | 2 |
| <i>Brachyspira</i> spp..... | 3 |
| <u>MATERIAL OCH METODER</u> | 4 |
| Djur för provtagning..... | 4 |
| Stuteri A..... | 4 |
| Stuteri B..... | 5 |
| Stuteri C..... | 6 |
| Stuteri D..... | 7 |
| Provhantering..... | 7 |
| Analys..... | 7 |
| <i>Lawsonia intracellularis</i> | 7 |
| <i>Brachyspira</i> spp..... | 9 |
| <u>RESULTAT</u> | 9 |
| <i>Lawsonia intracellularis</i> | 9 |
| <i>Brachyspira</i> spp..... | 10 |
| <u>DISKUSSION</u> | 10 |
| Metod..... | 10 |
| Urval..... | 10 |
| Preparering..... | 11 |
| PCR..... | 11 |
| Elfores..... | 12 |
| Odling av <i>Brachyspira</i> spp..... | 12 |
| Alternativa metoder..... | 12 |
| Konklusion..... | 13 |
| <u>LITTERATURFÖRTECKNING</u> | 13 |
| Böcker..... | 13 |
| Tidskriftsartiklar..... | 14 |
| Internet..... | 15 |
| Otryckt material..... | 16 |

SUMMARY

Proliferative enteropathy (PE) caused by *Lawsonia intracellularis* has been reported in horses in the USA, Canada, Australia and Great Britain. Diarrhoea caused by *Brachyspira* antigen-containing spirochaetes has been diagnosed in a horse in Japan. The presence of *Lawsonia intracellularis* or *Brachyspira* spp. have neither been investigated in healthy nor in sick horses in Sweden. The purpose of this study was to survey the occurrence of the two bacteria in Swedish horses. Faecal samples were gathered from 108 foals without any clinical signs of illness in the age of four to eight months. The samples were collected from four different stud farms. A nested PCR was used to detect *Lawsonia intracellularis* and culture was used to detect the presence of *Brachyspira* spp. In this study neither of the two bacteria were found. The explanations for the result might be that the bacteria do not exist in the Swedish horse population, or that they do not exist in horses from the examined area or that the horses did not shed a detectable number of bacteria.

SAMMANFATTNING

Det finns fall rapporterade av proliferativ enteropati (PE) hos häst orsakat av *Lawsonia intracellularis* från USA, Kanada, Australien och Storbritannien. Diarré orsakat av spiroketer med *Brachyspira*-antigen har påvisats hos en häst i Japan. I Sverige har inte *Lawsonia intracellularis* eller *Brachyspira* spp. påvisats hos varken sjuka eller friska hästar. Syftet med denna studie var att undersöka förekomsten av dessa två bakterier hos svenska hästar. Faecesprov togs från 108 kliniskt friska föl i åldern fyra till åtta månader på fyra olika stuterier. För analys av *Lawsonia intracellularis* användes en nested PCR och för *Brachyspira* spp. skedde analys genom odling. Ingen av dessa bakterier kunde påvisas. Detta kan bero på att bakterierna inte finns i den svenska hästpopulationen, eller att de inte finns i det undersökta geografiska området eller att de fanns i för liten mängd för att kunna detekteras.

INLEDNING

Lawsonia intracellularis, *Brachyspira hyodystenteriae* och *Brachyspira pilosicoli* är kända patogener hos gris. De förekommer även hos andra djurslag och det finns rapporter om förekomst av *Lawsonia intracellularis* och *Brachyspira* spp. hos häst (se nedan), men till stor del saknas kunskaper om dessa bakteriers prevalens och patogenicitet hos detta djurslag. I Sverige finns det inte några sjukdomsfall diagnostiserade av dessa bakterier hos häst. Därför gjordes denna studie vars syfte var att undersöka förekomsten av *Lawsonia intracellularis* och *Brachyspira* spp. hos svenska hästar.

Lawsonia intracellularis

Porcin proliferativ enteropati (PPE), orsakad av *Lawsonia intracellularis*, har länge varit känd som en endemisk sjukdom hos gris världen över (Lavoie *et al.*, 2000). I en svensk studie visade det sig att 47,6 % av smågrisproducerande besättningar var positiva för *Lawsonia intracellularis* (Jacobson *et al.*, 2005a). PPE karakteriseras av hyperplasi av omogna epitelceller i tarmkryptor i ileum och kolon. Orsakande agens är *Lawsonia intracellularis* som är en obligat intracellulär bakterie (McOrist *et al.*, 1996). Bakterien är svårödlad och växer, in vitro, bara i cellkultur och kräver mikroaerofil miljö. *Lawsonia intracellularis* är en gramnegativ, icke sporbildande, böjd stav och 1,25 till 1,75 µm lång (McOrist *et al.*, 1995). Vid obduktion av grisar med PPE ses histopatologiskt förstörade tarmkryptor som består av ett stort antal prolifererande omogna epitelceller. Epitelcellerna i de prolifererande kryptorna innehåller ett stort antal intracellulära bakterier, vilket de oinfekterade cellerna inte gör. Tre veckor efter infektion ses ett stort antal intracytoplasmatiska, gramnegativa bakterier. Bägarceller och celler i apoptos ses inte i sjukdomens utvecklings- eller akuta fas, utan först sju till nio veckor efter infektion, då tarmslemhinnan läker av. Då är tarmslemhinnan även blek och svullen med utbuktande tarmepitelceller och skrupna degenerativa epitelceller. Apoptoskroppar och makrofager kan ses. Orsaken till proliferationen av epitelceller är inte klarlagd, men det föreslås att *Lawsonia intracellularis* kan påverka cellcykeln i de intestinala epitelcellerna (McOrist *et al.*, 1996). Främst drabbas grisar i åldern sex till tjugo veckor (Rowland och Lawson, 1992). Hos grisar orsakar infektion med *Lawsonia intracellularis* diarré och dålig tillväxt. PPE kan dock även förekomma i akut form med blodig diarré och plötsliga dödsfall. Proliferativ enteropati (PE) har även påvisats hos andra djurslag, bl. a. hamster, räv, hund, iller, råtta, marsvin, kanin, apa, får, hjort samt häst (Lavoie *et al.*, 2000). Sjukdom har hittills inte konstaterats hos människa. Från USA, Kanada och Australien finns sju fallrapporter där *Lawsonia intracellularis* anges som orsak till sjukdom hos avvanda föl. Drabbade hästar har varit mellan tre och sju månader gamla, en var dock 13 månader. Totalt beskriver dessa rapporter sjukdom hos 35 hästar (Bihl, 2005; Brees *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 2000; McClintock och Collins, 2004; Schumacher *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1996). En av dessa beskriver flera fall på tre olika stuterier i Kanada (Lavoie *et al.*, 2000). Från Europa finns bara en muntlig rapport om ett fall av *Lawsonia intracellularis* hos häst, detta från Storbritannien (Miia Riihimäki pers. medd.).

De vanligaste symptomen hos häst har varit feber, letargi, anorexi, ventralt ödem, diarré, kolik och viktminskning (Bihl, 2005; Brees *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 1998;

Lavoie *et al.*, 2000; McClintock och Collins, 2004). Vid klinisk kemisk undersökning har det viktigaste fyndet varit hypoproteinemi (Bihr, 2005; Brees *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 2000). Den vanligaste differentialdiagnosen hos häst är ”protein losing enteropathy”, vilket kan orsakas av t.ex. *Salmonella*, endoparasiter, kroniska tarmsjukdomar, NSAID intoxication, neoplasier, gastrointestinala ulcera eller infektion av *Rhodococcus equi*. Nedsatt lever-, njurfunktion samt malnutrition kan också medföra hypoproteinemi (Bihr, 2005; Brees *et al.*, 1999; McClintock och Collins, 2004). Vid patologianatomisk undersökning har hyperplasi av mukosan observerats i jejunum och ileum. Histologisk undersökning har visat intracellulära, lätt böjda stavar främst i den apikala cytoplasman i kryptepitelcellerna (Brees *et al.*, 1999; Frank *et al.*, 1998; Lavoie *et al.*, 2000; Schumacher *et al.*, 2000). Hypoproteinemi hos gris med PPE är enligt författarens vetskap inte studerat i större utsträckning. I en studie anges att det finns vissa bevis som tyder på att PPE kan associeras med malabsorption av aminosyror (Rowan och Lawrence, 1982).

Vid oral behandling av insjuknade hästar med erytromycin, eller erytromycin i kombination med rifampicin, har tillfrisknande skett i flera fall. Av hittills kända behandlade hästar har endast en dött (Lavoie *et al.*, 2000). Dosen för erytromycin har legat mellan 15-25 mg per kg kroppsvikt per os q. 6-8 h under 2-6 veckor och rifampicindosen 5-10 mg per kg kroppsvikt per os q. 8-24 h under 2-4 veckor. Enbart understödande behandling har visat sig otillräcklig (Bihr, 2005; Cohen, 2004; Lavoie *et al.*, 2000; McClintock och Collins, 2004; Schumacher *et al.*, 2000). Hos gris har behandling med klortetracyklin, tylosin och tiamulin rapporterat god effekt (Jacobson, 2005b).

PE har även framkallats efter experimentell infektion (Al-Ghamdi *et al.*, 2005), där nyligen avvanda föl inokulerades intragastralt med tarminnehåll från *Lawsonia intracellularis*-infekterade grisar eller med en renkultur av *Lawsonia intracellularis*. Vid klinisk undersökning sågs varierande grad av nedsatt allmäntillstånd, kolik, minskad aptit, diarré, dehydrering och avmagring. Obduktion visade förtjockad tarmvägg i ileum och distala jejunum. Mukosan var veckad och hyperemisk. Histologiskt sågs hyperplasi av omogna enterocyter och ett minskat antal bägarceller. Förekomst av *Lawsonia intracellularis* i tarminnehåll verifierades med PCR.

***Brachyspira* spp.**

Brachyspira spp. är en grupp bakterier som kan orsaka kolit hos djur och människor. Spiroketal kolit (Colonic spirochetosis, CS) finns rapporterat hos primater (inklusive människa), gris, hund, opossum, marsvin och vissa fågelarter (Duhamel, 2001). Sjukdomsproblem med *Brachyspira* spp. har, förutom hos gris, framförallt observerats hos fjäderfä (Jansson, 2001). *Brachyspira* spp. är en gramnegativ, rörlig, anaerob spiroketa och ca 6 till 10 µm lång. Alla arter har flageller (Harris och Lysons, 1992; Taylor, 1992). Hos svin orsakas CS av *Brachyspira* (tidigare *Serpulina*) *pilosicoli*. Grisarna får lös avföring som vanligtvis går över på sju till tio dagar. CS är sällan letalt. Infektionen kan vara persisterande och medför då en minskad tillväxthastighet. Vid obduktion ses ödem i kolons krös och fibrinösa membran utmed den serösa ytan i kolon (Duhamel, 2001). Mukosan i kolon kan makroskopiskt bara ha små förändringar eller vara kraftigt hyperemisk, förtjockad och ha ulcerationer. Mikroskopiskt ses

att grovtarmsväggen är förtjockad och ödematös. Vidare ses en diffus katarral kolit med dilaterade tarmkryptor och infiltrat av mononukleära celler i lamina propria. Spiroketer i stor mängd fäster tätt tillsammans till tarmepitelet (Jensen, 2004; Taylor, 1992). I en studie visade sig prevalensen vara 32,4 % för *Brachyspira pilosicoli* i svenska smågrisproducerande besättningar (Jacobson *et al.*, 2005a).

Brachyspira (tidigare *Serpulina*) *hyodysenteriae* orsakar sjukdomen svindysenteri. Drabbade grisar får diarré som ofta är slemmig och blodig (Harris och Lysons, 1992; Meyer, 1978). Grovtarmarnas mukosa och submukosa blir ödematös. Epitelceller kan lossna från lamina propria så att kapillärer exponeras och blödningar uppstår. Spiroketerna kan ses i lumen, i tarmkryptor och i epitelceller. Vid kronisk sjukdom försvinner hyperemi och ödem, istället ses nekros av mukosan som ofta har ett tjockt fibrinöst pseudomembran. Perakut förlopp förekommer då grisarna dör inom några få timmar med lite eller ingen diarré. Den vanligaste kategorin av grisar som drabbas är de som väger 15 till 70 kg (Harris och Lysons, 1992). Morbiditeten i en besättning kan vara så hög som nittio procent. Letaliteten är olika beroende på grisarnas ålder, från tio procent upp till femtio procent om grisarna inte behandlas med antibiotika. De största ekonomiska förlusterna orsakas av dålig tillväxt och behandlingskostnader (Meyer, 1978). Tiamulin, tylosin, gentamicin och tetracyklin är exempel på antibiotika som är verksamma mot spiroketer (Harris och Lysons, 1992; Taylor, 1992).

Det saknas kännedom om patogenicitet och prevalens av *Brachyspira* spp. hos häst. Det finns dock en rapport från Japan där intestinala spiroketer med *Brachyspira*-antigen påvisats med immunohistokemi, i caecum och kolon hos en 21 månader gammal häst med diarré. Vid obduktion var grovtarmarna fyllda med stora mängder illaluktande flytande faeces. Mukosan i caecum och kolon var hyperemisk och ödematös. Histopatologiskt sågs ödem i mukosa och submukosa med infiltration av leukocyter. Vidare observerades ett stort antal spiroketer framförallt mellan epitelceller och i cytoplasman hos degenererade epitelceller. Spiroketerna fäste inte till tarmepitelet på det sätt som ses vid CS hos gris. Tre morfologiskt olika typer av spiroketer hittades i lesionerna. Andra patogener (*Rhodococcus*, *Salmonella*, rotavirus eller koccidier) kunde inte påvisas i detta fall (Shibahara *et al.*, 2002). Rapporter finns även från Storbritannien, där spiroketer hittats i innehåll från caecum hos friska hästar (Davies, 1964; Davies, 1985).

MATERIAL OCH METODER

Djur för provtagning

Fyra större stuterier valdes ut för provtagning och 108 föl provtogs. Dessa stuterier valdes med tanke på att en hög djurtäthet ökar risken för spridning av infektionssjukdomar. Många stuterier fungerar även som betäckningsstationer och tar emot ston utifrån för betäckning eller inseminering. Detta medför ett ständigt in- och utflöde av hästar vilket också ökar smittorisker.

Stuteri A

Stuteri A hade vid besöket ca 130 hästar, varav 56 föl. Prov togs 2005-10-03 från 48 avvanda föl som var födda 2005-01-28 till 2005-05-24. Sju av dessa 48 hästar hade ingen träck i ampullen och kunde således bara provtas för *Brachyspira* spp.

Hästarna gick i fyra olika grupper (grupp A: 1-4) på separata beten på en gård och tio hästar befann sig på en annan, mindre gård, 15 km från stuteri A (grupp A: 5). På den mindre gården, där grupp A: 5 hölls, fanns stuteriets betäckningsstation och de ston som fölat där var inhyrda. Stuteriets egna hästar hölls på så sätt åtskiljda från inhyrda hästar och hästar som kom dit för betäckning. Vid provtagningsstillfället fanns ca 50 hästar på den mindre gården. Fölen i grupp A: 5 hade gått på bete fram till provtagningen och alternerat mellan två hagar. Fölen i grupp A: 1-4 hade gått på bete fram till provtagning. Varje grupp hade tre hagar som de roterat mellan. Samtliga föl hade stödutfodrats med kraftfoder. Ingen av hästarna i grupp A: 1-5 visade kliniska tecken på sjukdom. Hästarna var avmaskade vid olika datum beroende på grupp och svar på träckprovsanalys. I grupp A: 1 avmaskades två föl den 28 september. Hela grupp A: 2 avmaskades den 1 september. I grupp A: 3 avmaskades tre föl den 9 september och alla i grupp A: 4 avmaskades den 9 september. Samtliga hästar avmaskades med piperazine (licenspreparat). I grupp A: 5 avmaskades fölen senaste gången 2005-08-24 eller 2005-09-05, denna gång med Noromectin vet. (ivermektin). Fem hästar var behandlade med antibiotika eller NSAID: ett föl behandlades med Penovet vet. (bensylpenicillinprokain) i tio dagar med början den 23 juni, en behandlades den 20 juli med Penovet vet. i tolv dagar och därefter med Gentaject[®] vet. (gentamicin) i åtta dagar, en behandlades med Penovet vet. i sju dagar med början den 30 juli och med Finadyne vet. (flunixin) i en dag, en behandlades med Engemycin[®] vet. (oxytetracyklin) i tre dagar med start den 3 juni och en behandlades den 22 augusti med Penovet vet. i en dag och därefter med Engemycin[®] vet. i tre dagar.

Stuteri B

Prov togs 2005-10-05 och 2005-10-06 och vid dessa tillfällen fanns ca 80 hästar på gården varav 36 var föl. Alla dessa 36 provtogs. De var födda under tidsintervallet 2005-02-02 till 2005-06-05. Inte heller någon av dessa hästar visade kliniska tecken på sjukdom. Fölen hade gått på bete fram till avvänjning. Hästarna hade gått i två grupper och varje grupp växlat mellan två beten. Gruppernas sammansättning hade dock ändrats under säsongen så att hästarna från de två grupperna blandats och två hästar hade tillkommit från Holland. Ytterligare fyra hästar hade anlänt från Holland, men hade inte blandats med de andra hästarna. På stuteriet bedrevs ingen semin- eller övrig betäckningsverksamhet. Fölen hade stödutfodrats med kraftfoder och avmaskats vid behov efter träckprovsanalys. Alla var avmaskade minst en gång med Equimax vet. (ivermektin och prazikvantel) och piperazine. Övriga behandlingar se tabell 1 på nästa sida. Stuteriet hade under sensommaren haft flera fölunger med feber och misstanke om erlichios.

Tabell 1. Medicinska behandlingar av fölen på Stuteri B

| Föl | Behandling | |
|----------------------|-----------------------|---|
| Kön och födelsedatum | Första behandlingsdag | Preparat |
| Hingst, 05-06-05 | 17 augusti | Engemycin [®] vet. |
| Sto, 05-05-16 | 15 augusti | Engemycin [®] vet. |
| Sto, 05-04-06 | 3 oktober | Engemycin [®] vet. |
| Hingst, 05-03-29 | 3 maj | Penovet vet. |
| Hingst, 05-05-08 | 19 augusti | Engemycin [®] vet. |
| Sto, 05-04-25 | 9 september | Engemycin [®] vet. |
| Sto, 05-05-16 | 19 september | Penovet vet., Gentaject [®] vet. |
| Hingst, 05-03-30 | 27 april | Penovet vet. |
| Hingst, 05-04-03 | 29 april | Penovet vet. |
| | 2 september | Engemycin [®] vet. |
| Hingst, 05-05-17 | 9 juli | Penovet vet. |
| | 15 juli | Gentaject [®] vet. |
| | 23 augusti | Engemycin [®] vet. |
| Hingst, 05-04-30 | 29 augusti | Engemycin [®] vet. |
| | 9 september | GastroGard [®] vet. |
| Hingst, 05-05-07 | 9 augusti | Chloromycetin ögondroppar |
| | 11 augusti | Penovet vet. |
| | 15 augusti | Rimactan [®] (rifampicin) |
| | 21 augusti | Gentaject [®] vet. |
| | 26 augusti | Tribrissen [®] vet. (sulfadiazin, trimetoprim) |
| Sto, 05-02-19 | 15 augusti | Engemycin [®] vet. |
| Sto, 05-05-30 | 3 september | Engemycin [®] vet. |

Stuteri C

Stuteri C hade vid provtagningsdagen 2005-10-27 42 fölston och 25 fölunger, 16 av dessa var egna och de övriga hade varit på stuteriet i ca 10 dagar och kom från två olika ställen. 17 hästar provtogs och de var födda 2005-03-26 till 2005-06-01. Samtliga fölunger hade gått på samma beten och de hade växlat mellan tre olika beten. Ingen stödutfodring med kraftfoder hade behövts eftersom ston med föl hade släppts på andraskörden i augusti. Varje säsong tar stuteriet emot ca 100 ston utifrån för inseminering. Dessa hästar hålls avskiljda från stuteriets egna och inackorderade fölston med föl. En av hästarna var mager och den hade, enligt uppgift från ägaren, varit magrare än de övriga fölungerarna i flocken hela sommaren. Den hästen hade dock bara varit på detta stuteri i 10 dagar. I övrigt noterades inga tecken på sjukdom och ingen av de egna hästarna hade behandlats med antibiotika. De egna fölungerarna var avmaskade vid tre dagars ålder samt i slutet av augusti.

Stuteri D

Prov togs 2005-11-15 från sju föl födda 2005-04-06 till 2005-05-24. Totalt fanns ca 150 hästar på stuteriet vid besökstillfället varav ca 35 föl. Fölen hade gått på bete tillsammans fram till avvänjning och skiftat bete under sommaren. Från och med oktober hade hästarna stödutfodrats på betet med ensilage och kraftfoder. De avmaskades senast 2005-11-01 med ivermektin. En av hästarna var behandlad med penicillin och sulfadiazine/trimetoprim. Vid provtagningstillfället visade inget av fölen kliniska tecken på sjukdom. På stuteriet bedrivs även semin- och betäckningsverksamhet, men detta sker på en intilliggande gård så stuteriets hästar blandas inte med ston som kommer dit för inseminering.

Provhantering

Prov för *Lawsonia intracellularis* bestod av faeces som togs från rektum alternativt från boxen, i de fall där hästen befann sig i ensambox, och lades i burk märkt med stuterinamn och hästens nummer. I de fall där fölen hade individnummer användes detta, övriga föl gavs löpnummer och uppgifter om kön, ålder och eventuella behandlingar antecknades. Proverna frystes in i och förvarades i $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i väntan på analys.

Prov för *Brachyspira* spp. togs som rektalsvabb med tops (kulturett) från ändtarmen och kulturetten snurrades mot tarmslemhinnan. Kulturetten kylförvarades i $+8\text{ }^{\circ}\text{C}$ i Amies kolade medium (Amies Agar Gel Medium with Charcoal, Copan Venturi Transsystem[®], Copan innovation, Brescia, Italien) fram till odling. Märkning av proverna gjordes enligt ovan. Provtagningen utfördes av författaren och av stuteripersonal.

Analys

Lawsonia intracellularis

Koklysat

Faecesproverna preparerades genom koklysat (Jacobson *et al.*, 2004; Möller *et al.*, 1998) där 0,1 g frusen faeces vägdes upp i 1,5 ml eppendorfrör och blandades med 1,2 ml avjoniserat, sterilt vatten med hjälp av vortex (skakning). Därefter inkuberades proverna i 15 minuter i rumstemperatur och centrifugerades sen i två minuter, 250 x g. för att bli av med debris. Supernatanten överfördes till nytt, låsbart rör och centrifugerades i 5 minuter, 14 500 x g., detta för att få ett sediment (pellet) innehållande bakterier. Supernatanten kastades och till pelleten tillsattes 400 µl lyseringsbuffert (50 mM Tris-HCl, pH 8,4; 1 mM EDTA; 0,5 % Tween-20). Pelleten blandades med lyseringsbufferten genom vortex och kokades i tio minuter för att bryta ned bakteriernas cellväggar och frigöra bakteriernas DNA. Slutligen centrifugerades rören i 30 sekunder, 14 500 x g, för att få cellväggsresterna att sedimentera. Supernatanten överfördes till nya rör och förvarades i $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ i minst en natt innan PCR-analys.

PCR

Vid PCR, "polymerase chain reaction", sker en anrikning av ett utvalt känt DNA-segment. En s.k. nested PCR användes för anrikning av DNA-sekvensen. Vid PCR byggs nytt DNA med hjälp av så kallade primrar och vid en nested PCR sker detta i två steg, med nya primrar i andra steget.

I denna PCR användes primrarna Pe-F ("forward primer" för detektion av proliferativ enteropati), Pe-R ("reverse primer" för detektion av proliferativ enteropati), Pe-Fc ("forward primer C" för detektion av proliferativ enteropati) och Pe-Rd ("reverse primer D" för detektion av proliferativ enteropati) (Jacobson *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1993). En nested PCR ger en ökad känslighet och en bättre specificitet jämfört med en enkel PCR som sker i ett steg. Detta segment påvisas sedan genom elektrofores där segmenten vandrar olika långt beroende på storlek.

Inför varje PCR skrevs ett protokoll som inkluderade datum, provmärkning, negativa kontroller, positiva kontroller samt de ämnen som skulle ingå i PCR-mixturen, inklusive dessa ämnens mängd. I mixturen ingick per reaktionsrör: 15,3 µl avjoniserat destillerat vatten; 2,5 µl PCR-buffert; 2,0 µl MgCl₂; 2,0 µl dNTP (nukleotider); 1,0 µl primer Pe-F; 1,0 µl primer Pe-R; 1,0 µl mimic (se nedan); 0,2 µl reaktionsenzym (AmpliTaq Gold DNA Polymerase, Applied Biosystems, Foster City, California, USA) och 1,0 µl templat (prov).

PCR-rör märktes med löpnummer enligt protokollet, vart femte rör var en negativ kontroll. Dessa bestod av PCR-mixtur, men inget templat. De negativa kontrollerna var till för att visa eventuell kontamination. En positiv kontroll sattes i sista röret innehållande PCR-mixtur och templat med DNA från *Lawsonia intracellularis*. Den positiva kontrollens syfte var att visa om PCR-reaktionen fungerat. En intern kontroll (mimic) visar förekomst av inhibitoriska faktorer, som kan finnas i faeces. Den består av en konstruerad DNA-molekyl som har en annan sekvens jämfört med det DNA-segment som ska detekteras, men ett likadant bindningsställe för primrarna. Den interna kontrollen anrikas av primrarna, men skiljer sig i storlek från detektionssegmentet och kan därav åtskiljas i gelelektroforesen (se nedan) (Jacobson *et al.*, 2003).

PCR-mixturens ingredienser, förutom enzymet, tinades och blandades i ett 1,5 ml centrifugrör. Detta ägde rum i dragskåp som strålats med ultraviolett ljus före användning, även pipetter, märkpenor och ställ för rören var bestrålade med UV-ljus. Enzymet togs direkt ur frysen och tillsattes sist. Mixturen blandades med vortex och 24 µl av mixturen tillsattes varje PCR-rör. Därefter tillsattes 1,0 µl templat till rören enligt protokoll och 1,0 µl templat från positiv kontroll sattes till det sista röret. Rören placerades omedelbart i en PCR-apparat där programmet bestod av en "hotstart" (95 °C i tio minuter) följt av 35 cykler, där varje cykel bestod av denaturering (då DNA-strängarna separerar) vid 95 °C i 30 sekunder, "annealing" (då primrar fäster vid DNA) vid 55 °C i 30 sekunder och elongering (då nytt DNA byggs) vid 72 °C i 30 sekunder. Efter dessa 35 cykler kylde rören till 4 °C. Därefter blandades ny PCR-mixtur med sammansättning som den första blandningen (se ovan), dock utan mimic och med primrarna utbytta till Pe-Fc och Pe-Rd. 24 µl av blandningen sattes till nya märkta PCR-rör och 1 µl av PCR-produkten från första PCR-reaktionen användes som templat och sattes till respektive rör. Samma PCR-program som vid första PCR-reaktionen användes vid den andra PCR-reaktionen (se ovan). Prov som vid analys visade sig vara inhiberade späddes med avjoniserat, sterilt vatten, 1:10, och analyserades igen. Prov som efter den spädningsen fortfarande var inhiberade späddes 1:100 och analyserades åter.

Elektrofores

En 1,5 procentig agarosgel göts i en form med en eller två mallar för brunnar, beroende på antalet prov. På en plastfilm blandades 2 µl GLS med 5 µl av den nestade PRC-produkten. Den stelnade gelen sänktes ner i ett elektroforesbad, innehållande TBE-buffert. Mallarna för brunnarna avlägsnades och prover samt kontroller sattes i brunnarna i känd ordning. En DNA-markör (DNA molecular weight marker VI, digoxigenin-labeled, Roche Diagnostics GmbH, D-68305 Mannheim, Germany) med DNA-fragment av kända storlekar sattes per rad. Ström kopplades över behållaren så att de negativt laddade DNA-segmenten vandrade från minuspol mot pluspol. Spänningen sattes till 90-110 V i 30-40 minuter.

Gelen färgades sedan i 20 minuter i etidiumbromid och lades sedan ca 10 sekunder i avjoniserat vatten. Gelen placerades på ett ultraviolett ljusbord för avläsning och fotografering. PCR-produkten ses som ljusa band i gelen då den läggs på ljusbordet. Positiva prover har ett band som vandrat lika långt som den positiva kontrollen, 319 baspar (Jacobson *et al.*, 2004; Jones *et al.*, 1993) samt ett band som visar den mimic som tillsatts, 596 baspar (Jacobson *et al.*, 2004). Negativa prover där PCR-reaktionen fungerat har ett band som bildas av den interna kontrollen (mimic). Vid inhibition av PCR syns inte något band alls. DNA-markörerna syns om elektroforesen fungerat.

Brachyspira spp

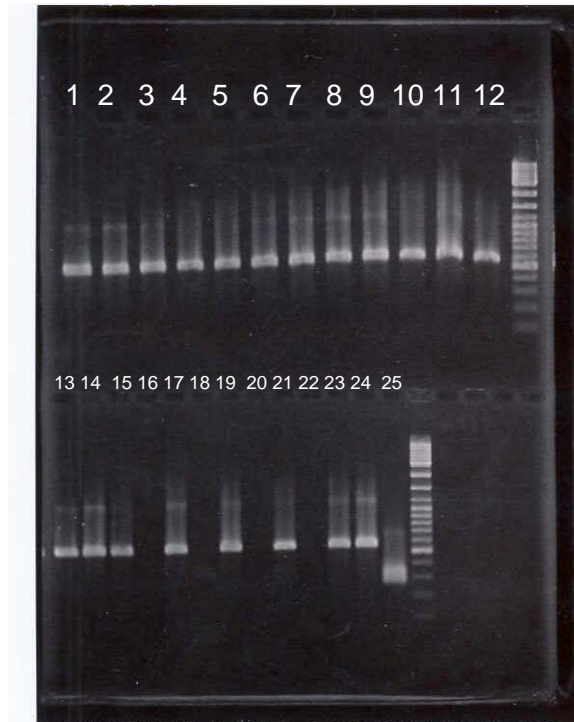
Odlingen utfördes på ett selektivt medium, TSA (Trypticase Soy Agar) med 10 % nötblod och antibiotika (400 µg/ml spectinomycin samt 5 µg/ml polymyxin). Vid rutindiagnostik vid SVA (Sveriges Veterinärmedicinska Anstalt) odlas faeces från gris på selektiva *Brachyspira*-agar med tre antibiotika (Blood agar base number 2 Oxoid with 5 % sheep blood) (Fellström och Gunnarsson, 1995). I detta försök valdes två antibiotika för att minska risken att antibiotikan skulle hämma eventuell växt av *Brachyspira* spp. Human *Brachyspira* (*Brachyspira aalborgi*) odlas på två antibiotika, den växer dessutom inte i 42 °C som övriga *Brachyspira* spp. utan i 37-38,5 °C (Hovind-Hougen *et al.*, 1982). Risken som togs i och med att två antibiotika användes var att *Brachyspira* spp. skulle bli överväxt av annan flora. Agarplattorna odlades anaerobt i 37 °C i minst sju dagar innan första avläsning. Vid växt av *Brachyspira* spp. ses svärmning och svag till stark hemolys, beroende på art. *Brachyspira aalborgi* orsakar endast svag hemolys eller ingen alls. Vid misstänkt växt av *Brachyspira* spp. togs kolonimaterial och undersökes i faskontrastmikroskop. Hemolysbedömning tillsammans med biokemiska tester (spot indol test och hippurat test) kan användas för artbestämning av *Brachyspira* hos gris (Fellström och Gunnarsson, 1995). Plattorna inkuberades totalt 31 till 39 dagar före slutavläsning. Plattorna avlästes även av en veterinär.

RESULTAT

Lawsonia intracellularis

Vid den första analysen av de 101 utspädda proverna var 14 prover negativa och resterande 87 prover var inhiberade. Inhiberade prov späddes 1:10 varefter de sattes på nested PCR. Resultatet blev 30 negativa och 57 inhiberade. De prov som

fortfarande var inhiberade späddes 1:100 innan ny nested PCR utfördes. Det slutliga resultatet blev negativt för samtliga 101 prov. Nedan visas i figur 1 ett av resultaten från analys vid spädning 1:100.



Figur 1. Längst till höger syns DNA-markörerna, prov 16, 18, 20 och 22 är inhiberade (20 dock negativ kontroll). Nummer 25 är positiv kontroll.

***Brachyspira* spp.**

Ingen överväxt noterades på någon av plattorna, så eventuell *Brachyspira* spp. hade möjlighet att växa ut. Blandflora sågs på samtliga plattor men inga kolonier liknade *Brachyspira* spp. Hemolyserande kolonier och icke hemolyserande kolonier studerades i faskontrastmikroskop i etthundra gångers förstoring. Detta gjordes, eftersom inte alla *Brachyspira* spp. är hemolyserande. Växande kolonier visade sig bestå av kocker och stavar, inga spiroketer kunde påvisas i något av de 101 tagna proverna.

DISKUSSION

Metod

Urval

Dessa föl provtogs i avvänjningsperioden, vilket borde medföra den största sannolikheten att hitta *Lawsonia intracellularis*. Samtliga rapporter om sjukdomsfall har varit hästar i avvänjningsperiod i åldern tre till sju månader, förutom en häst som var 13 månader (Bihr, 2005; Brees *et al.*, 1999; Frank *et al.*,

1998; Lavoie *et al.*, 2000; McClintock och Collins, 2004; Schumacher *et al.*, 2000; Williams *et al.*, 1996). Dessutom var urvalet inom varje besättning stort, utom på stuteri D, där bara sju föl provtogs av ca 35. På de övriga stuterierna provtogs från 64 % till 100 % av fölungarna, för att minimera risken att missa eventuell förekomst av *Lawsonia intracellularis* eller *Brachyspira* spp.

Proven från fölen togs av instruerad personal på stuterierna och av författaren. Fölen som provtogs kom samtliga från stuterier i Uppland. Den geografiska spridningen begränsades av tiden för provtagning samt av ekonomiska faktorer. Därför är urvalet inte representativt för hela landet. I Sverige hålls de flesta grisar inomhus, men att ta prov från hästar på stuterier i mer gristäta delar av landet kan eventuellt öka möjligheten att finna dessa bakterier. Dock är vanligen kontakten mellan grisbesättningar och hästar begränsad. Intressant i sammanhanget är att *Lawsonia intracellularis* hittills inte påvisats i den svenska vildsvinspopulationen (Jacobson *et al.*, 2005). Spridning av bakterien till vildsvin skulle kunna öka risken att den även hittas hos häst. Stuterier borde vara bra som urvalsgrupp, då de inhyser unga individer, ofta i stort antal på begränsade ytor och flödet av djur till och från stuterier är ofta stort. Ett av stuterierna i denna studie hade dessutom utbyte av hästar med Holland, vilket är intressant ur smittspridningssynpunkt.

Preparering

Prepareringen fick inte bort PCR-inhibitorerna i mer än 14 av proverna. Samma erfarenhet finns från analyser på grisfaeces. Denna prepareringsmetod valdes därför att den i tidigare studier visat sig vara den metod som säkrast identifierat positiva prov. Tyvärr är metoden dock sämre än flera andra metoder när det gäller att avlägsna inhibitorer (Jacobson *et al.*, 2004). Det har också konstaterats att inhibition är mindre vanligt i prover tagna från grisar med diarré (Jacobson *et al.*, 2003). I denna studie hade ingen av de provtagna fölen diarré och inhibitionen var omfattande. Vid PCR av de outspädda proverna inhiberades 79 %. Vid inhibition i grisfaeces har dock proverna späts (Jacobson *et al.*, 2004; Jacobson *et al.*, 2005), vilket även gjordes i detta försök. Dock kvarstod inhibition. Vid spädning 1:10 var 57 prover (56 %) fortfarande inhiberade och efter spädning 1:100 var tio prover inhiberade. Dessa tio sattes på en ny nested PCR där inget prov inhiberades. Det som tolkades som inhibition i de tidigare analyserna vid spädning 1:100 kan i stället ha berott på att mimicen varit ojämnt fördelad och funnits i för liten mängd i en del prover. Vetskapen är liten om vad som orsakar inhibitionen. Det behövs mer studier över diagnostiken av *Lawsonia intracellularis* hos häst. Det kan vara så att det råder skillnader mellan mängden och typen av inhibitorer i faeces beroende på djurslag.

PCR

Sensitiviteten i denna nested PCR fastställdes till 10^3 måldNA-molekyler per PCR i en studie av Jacobson *et al.* (2003). I studien togs hänsyn till inhibition och olika koncentrationer av mimic undersöktes. Vid analys av faeces från gris blev konklusionen att mimic i koncentrationen 10^3 var optimalt. En för liten mängd mimic inhiberas lätt och för mycket mimic konkurrerar ut måldNA-molekylerna. Sensitiviteten för denna nested PCR utan mimic uppskattades av Möller *et al.* (1998) till 2×10^2 bakterier per gram grisfaeces genom spädning. Möllers studie gjordes dock utan att graden av inhibition kunde bedömas. Teoretiskt kan, utifrån

resultaten av de två ovanstående studierna, detektionsnivåerna beräknas till följande: vid spädning 1:10 krävs 2×10^3 till 10^4 bakterier per gram faeces för detektion och vid spädning 1:100 krävs 2×10^4 till 10^5 bakterier per gram faeces. Inget föl i denna studie visade tecken på sjukdom så ingen av dem borde ha haft stor utsöndring av patogena bakterier i träcken. Det finns inga uppgifter om mängden utsöndrade bakterier hos häst med kliniska symptom, orsakade av infektion med *Lawsonia intracellularis*. Hos gris med kliniska symptom på PE anges mängden utsöndrade bakterier i träcken vara mellan 2×10^5 och 2×10^7 eller mera per gram faeces (Möller *et al.*, 1998).

Specificiteten för denna PCR undersöktes av Jacobson *et al.* (2004) och konstaterades god. Primrarna testades mot *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter mucosalis*, *Desulfovibrio desulfuricans*, *Escherichia coli*, *Myxococcus xanthus* och *Proteus mirabilis* och var negativ för samtliga. Vidare kunde positiva resultat i PCR korreleras till kliniska symptom och makroskopiska och histologiska fynd vid obduktion.

Elfores

Gelelektroforeserna kontrollerades med DNA-markörer som syns om elforesen fungerat, vilket var fallet i samtliga elforeser i detta försök.

Odling av *Brachyspira* spp.

Vid odling av *Brachyspira* spp. har detektionsmängden visat sig vara 10^4 till 10^6 CFU (colony forming units) per gram faeces (Stegge *et al.*, 2000). I en studie av *Brachyspira hyodysenteriae* var detektionsnivån 14 bakterier per gram faeces (Fellström *et al.*, 2001). Odling är således en känslig metod och borde i detta försök ha detekterat bakterier även hos subkliniska smittbärare. Den mest långsamväxande arten av *Brachyspira* spp. är *Brachyspira aalborgi* som kräver två veckor för att växa fram. Den är även unik på det sätt att den inte växer i 42 °C som de andra *Brachyspira* spp., vilka växer både i 37 °C och 42 °C (Hovind-Hougen *et al.*, 1982). I detta försök inkuberades plattorna i 37 °C för att kunna fånga upp växt av alla kända *Brachyspira* spp., 37 °C ligger dessutom inom intervallet för hästens normala kroppstemperatur (36,9-38,3 °C). Inkubationen varade i minst 31 dagar så alla kända arter av *Brachyspira* spp. hade möjlighet att växa fram. Då ingen överväxt av annan bakterieflora skedde hade eventuell *Brachyspira* spp. chans att växa ut. Orsaker till att odlingen blev negativ kan vara att inga spiroketer fanns i fölens faeces eller att inga eller för få bakterier hade utsöndrats i träcken. Utsöndringen av bakterier sker eventuellt intermittent. Det skulle också kunna vara så att spiroketer hos häst inte växer under samma betingelser som övriga *Brachyspira* spp.

Alternativa metoder

Lawsonia intracellularis

Då odling kräver cellkulturer är det inget bra alternativ för påvisande av *Lawsonia intracellularis*. Serologi finns att tillgå, men vid klinisk misstanke om sjukdom har serologi nackdelen att antikroppar först blir detekterbara 14 dagar efter infektionstillfället (Knittel *et al.*, 1998). En antikroppstiter är dessutom en indirekt metod som enbart ger information om att djuret kommit i kontakt med smittoämnet. Däremot går det inte att avgöra om infektionen har etablerat sig hos

individens eller om djuret är infekterat vid provtagningstillfället eller var i kroppen detta agens befinner sig. En studie av Jacobson *et al.* (2004) visar att falskt positiva prover kan förekomma vid serologi och att det kan vara svårt att detektera svagt positiva prov. I en studie som denna hade serologi varit användbart, men provtagningen hade försvårats avsevärt. Troligtvis hade det också blivit svårare att få stuterier att ställa upp på studien.

Brachyspira spp.

PCR finns utarbetat för diagnosticering av *Brachyspira* spp. och används vid SVA som rutindiagnostik. Selektiv odling valdes i denna studie med tanke på att det är en bra metod vid analys av grisfaeces (se detektionsnivå ovan) samt för att detta är det enda sättet att få stammar att spara. Dessutom finns det risk för falskt negativa resultat med befintliga PCR-system (Claes Fellström, pers. medd.).

Konklusion

Varken *Lawsonia intracellularis* eller *Brachyspira* spp. kunde påvisas i denna studie. De negativa resultaten kan bero på att bakterierna inte finns hos häst i Sverige. För detta talar att sjukdom p.g.a. dessa bakterier hittills inte finns beskriven hos häst i Europa. Andra orsaker kan vara att bakterierna kan vara svåra att påvisa hos subkliniska smittbärare. Analys av *Lawsonia intracellularis* i faeces från häst försvåras ytterligare av inhibition av PCR. I denna studie var 14 av fölen behandlade med tetracyklin och två med gentamicin. Eventuell förekomst av *Lawsonia intracellularis* kan ha eliminerats av tetracykinbehandling och *Brachyspira* spp. kan ha eliminerats av båda dessa antibiotika.

För att gå vidare kan, som nämnts tidigare, hästar i kontakt med grisar eller hästar i närheten av grisbesättningar provtas. Dessutom bör prov tas från hästar med diarré eller ”protein losing enteropathy” och analyseras avseende förekomst av *Lawsonia intracellularis* och *Brachyspira* spp. Studier av obducerade hästar som haft tarmlidanden kan också öka sannolikheten att påvisa dessa två bakterier. För att slippa späda ut prover och därigenom sänka PCR-sensitiviteten bör andra prepareringsmetoder provas.

LITTERATURFÖRTECKNING

Böcker

- Harris D.L., Lysons R.J. (1992). Swine Dysentery. In: Eds. Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D’Allaire S.D., Taylor D.J. *Diseases of Swine*. 7. ed. 599-616. Ames: Iowa State University Press. ISBN 0 7234 18861.
- Rowland A.C and Lawson G.H.K. (1992). Porcine Proliferative Enteropathies. In: Eds. Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D’Allaire S.D., Taylor D.J. *Diseases of Swine*. 7. ed. 560-569. Ames: Iowa State University Press. ISBN 0 7234 18861.
- Taylor D.J. (1992). Spirochetal Diarrhea. In: Eds. Leman A.D., Straw B.E., Mengeling W.L., D’Allaire S.D., Taylor D.J. *Diseases of Swine*. 7. ed. 584-587. Ames: Iowa State University Press. ISBN 0 7234 18861.

Tidskriftsartiklar

- Bihr T.P. Protein-losing enteropathy caused by *Lawsonia intracellularis* in a weaning foal. (2003 January, 44 (1)). Can. Vet. J., 65-66.
- Brees D.J., Sondhoff A.H., Kluge J.P., Andreasen C.B., Brown C.M. *Lawsonia intracellularis*-like organism infection in a miniature foal. (1999, August 15, Vol 215, No.4). JAVMA, 511-514.
- Cohen N.D. Meeting Report from North American Veterinary Conference. *Lawsonia intracellularis*. (författare ej angiven) (2004 April, Volume 24, Number 4). Journal of Equine Veterinary Science, 146-147.
- Davies M.E. Cellulolytic Bacteria Isolated from the Large Intestine of the Horse. (1962, 27 (3)). J. Appl. Bact., 373-378.
- Davies M.E, Bingham R.W. Spirochaetes in the equine caecum. (1985, 39). Res. Vet. Sci., 95-98.
- Duhamel G.E. Comparative pathology and pathogenesis of naturally acquired and experimentally induced colonic spirochetosis. (2001, 2(1)). A.H.R.R., 3-17.
- Fellström C., Gunnarsson A. Phenotypical characterisation of intestinal spirochaetes isolated from pigs. (1995, 59). Res. Vet. Sci., 1-4.
- Fellström C., Zimmerman U., Aspan A., Gunnarsson A. The use of culture, pooled samples and PCR for identification of herds infected with *Brachyspira hyodysenteriae*. (2001, 2(1)). Anim. Health. Res. Rev., 37-43.
- Frank N., Fishman C.E., Gebhart C.J., Levy M. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weaning foal. (1998, 30 (6)). Equine vet. J., 549-552.
- Jacobson M., Englund S., Ballagi-Pordány A. The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in faeces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. (2003, 15) J. Vet. Diagn. Invest., 268-273.
- Jacobson M., Aspan A., Heldtander Königsson M., Hård af Segerstad C., Wallgren P., Fellström C., Jensen-Waern M., Gunnarsson A. Routine diagnostics of *Lawsonia intracellularis* performed by PCR, serological and post mortem examination, with special emphasis on sample preparation methods for PCR. (2004, 102). Vet. Microb., 189-201.
- Jacobson M., Gerth Löfstedt M., Holmgren N., Lundeheim N., Fellström C. The Prevalences of *Brachyspira* spp. and *Lawsonia intracellularis* in Swedish Piglet Producing Herds and Wild Boar population. (2005a, 52). J. Vet. Med., 386-391.
- Jacobson M. Proliferativ enteropati –en aktuell sjukdom med många frågetecken. (2005b, 2). Svensk Veterinärtidning, 11-16.
- Jansson D.S., Fossum O., Satora K., Gunnarsson A., Fellström C. Spiroketala infektioner (*Brachyspira* spp) hos tamhöns i Sverige. (2001, Vol. 53, Nr. 2). Svensk Veterinärtidning, 69-74.
- Jensen T.K., Boye M., Möller K. Extensive intestinal spirochaetosis in pigs challenged with *Brachyspira pilosicoli*. (2004, 53). J. Med. Microbiol., 309-312.
- Jones G.F., Ward G.E., Murtaugh M.P., Lin G., Gebhart C.J. Enhanced Detection of Intracellular Organism of Swine Proliferative Enteritis, Ileal Symbiont Intracellularis, in Faeces by Polymerase Chain Reaction. (1993, Vol. 31, No. 10). J. Clin. Microbiol., 2611-2615.
- Hovind-Hougen K., Birch-Andersen A., Henrik-Nielsen R., Orholm M., Pedersen J.O., Stubbe Teglbjaerg P., Hess Thaysen E. Intestinal Spirochetosis: Morphological

- Characterization and Cultivation of the Spirochete *Brachyspira aalborgi* gen. nov. sp. nov. (1982, Vol 16, No. 6). J. Clin. Microbiol., 1127-1136.
- Knittel J.P., Jordan D.M., Schwartz K.J., Janke B.H., Roof M.B., McOrist S., Harris D.L. Evaluation of antemortem polymerase chain reaction and serologic methods for detection of *Lawsonia intracellularis*-exposed pigs. (1998, Vol. 59, No. 6, June). Am. J. Vet. Res., 722-726.
- Lavoie J.P., Drolet R., Parsons D., Leguillette R., Sauvageau R., Shapiro J., Houle L., Hallé G., Gebhart C.J. Equine proliferative enteropathy: a cause of weight loss, colic, diarrhoea and hypoproteinemia in foals on three breeding farms in Canada. (2000, 32 (5)). Equine vet. J., 418-425.
- Meyer R.C. Swine Dysentery: A Perspective. (1978, 22). Adv. Vet. Sci. Comp. Med., 133-158.
- McClintock S.A., Collins A.M. *Lawsonia intracellularis* proliferative enteropathy in a weaning foal in Australia. (2004, December No 12, Volume 82). Australian Vet. J., 750-752.
- McOrist S., Gebhart C.J., Boid R., Barns S.M. Characterization of *Lawsonia intracellularis* gen. nov., sp. nov., the Obligately Intracellular Bacterium of Porcine Proliferative Enteropathy. (1995, Oct, Vol. 45, No. 4). Int. J. Syst. Bacteriol., 820-825.
- McOrist S., Roberts L., Jasni S., Rowland A.C., Lawson G.H.K., Gebhart C.J., Bosworth B. Developed and resolving Lesions in Porcine Proliferative Enteropathy: Possible Pathogenic Mechanisms. (1996, Vol. 115, No. 1). J. Comp. Path., 35-45.
- Möller K., Jensen T.K., Jorsal S.E., Leser T.D., Carstensen B. Detection of *Lawsonia intracellularis*, *Serpulina hyodysenteriae*, weakly beta-haemolytic intestinal spirochaetes, *Salmonella enterica*, and haemolytic *Escherichia coli* from swine herds with and without diarrhoea among growing pigs. (1998, 62). Vet. Microb., 59-72.
- Rowan T.G, Lawrence T.L.J. Amino acid digestibility in pigs with signs of porcine intestinal adenomatosis. (1982, 110). Vet. Rec., 306-307.
- Schumacher John, Schumacher Jim, Rolsma M., Brock K.V., Gebhart C.J. Surgical and Medical Treatment of an Arabian Filly with Proliferative Enteropathy Caused by *Lawsonia intracellularis*. (2000, 14). J. Vet. Intern. Med., 630-632.
- Shibahara T., Kuwano A., Ueno T., Kuwamoto Y., Sato H., Maeda T., Ishikawa Y., Kadota K. Intestinal Spirochetosis in a 21-Month-Old Thoroughbred Colt. (2002, 64 (7)). J. Vet. Med. Sci., 633-636.
- Stege H., Jensen T.K., Möller K., Baekbo P., Jorsal S.E. Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds. (2000, 46). Prev. Vet. Med., 279-292.
- Williams N.M., Harrison L.R., Gebhart C.J. Proliferative enteropathy in a foal caused by *Lawsonia intracellularis*-like bacterium. (1996, 8). J. Vet. invest., 254-256.

Internet

- http://www.ivis.org/proceedings/SIVE/2005/free_com/ALGhamdi.pdf. 2005-12-12: Al-Ghamdi G.M., Guedes R.M.C., Ames T.R., Sage A.M., Hayden D.W., Neubauer A., Gebhart C.J. Reproduction of Equine proliferative enteropathy in foals. (2005). Società Italiana Veterinari per Equini –SIVE- 11°Congresso Nazionale Multisala, Piza.

Otryckt material

Claes Fellström, leg. vet. och professor vid Inst. för Kliniska Vetenskaper, SLU. Samtal 2005-12-14.

Miia Riihimäki, leg. vet., SLU. Samtal 2005-10-14.