Udarbejdet af	Øystein Angen
Øvrige deltagere	Mette Christoffersen, Branko Kokotovic, Lina Cavaco
Kontaktperson i FVST	Mette Schebye Skriver

Dato for henvendelse	Dato for svarfrist	Dato for afsendelse	Versionsnummer
11/03/2022	25/03/2022	24/03/2022	1

Journalnummer/sagsnummer	FVST	KU	SSI
	2022-14-81-19735	061-0285/22-3680	22/01311

Besvarelse vedr.

Testtidspunkt for fritestning for smitte med kontagiøs equin metritis (CEM)

Bestilling

1
Vurderer DK-VET, at der er bør ændres på proceduren for den periode, der som minimum skal gå fra endt behandling til der testes, hvis vi skal være sikre på, at en hest er fri for smitte? I så fald, vurderer DK-VET, at den bør ændres til 7 dage for systemisk behandling og 21 dage for lokalbehandling, eller er en anden periode mere fordelagtig? Og er der bedre alternativer, f.eks. med flere tests over en periode? Hvis en hest fortsat er smittet, hvor sikre kan vi så være på at finde *T. equigenitalis* ved de beskrevne metoder, inkl. de alternativer, DK-VET evt. foreslår?

2
Ifølge den nuværende praksis bliver kun hingste sat under offentlig tilsyn. Hvilken effekt vurderer DK-VET, at der vil være af også at sætte hopper, der testes CEM-positive, under offentlig tilsyn?

3
Hvor sikkert vurderer DK-VET, at testresultatet er ved poolede prøver i forhold til undersøgelse af enkeltprøver- og er testresultatet tilstrækkeligt pålideligt?

Svar

1
Forebyggelse og kontrol af CEM varierer afhængigt af om det pågældende land er CEM-frit eller om sygdommen optræder endemisk i hestepopulationen. CEM-fri lande har strenge restriktioner for karantæne og kontrol ved import af heste fra lande, hvor CEM optræder endemisk. Som eksempel kan nævnes USA (CEM-fri), hvor alle importerede heste skal i karantæne og testes for CEM (svaberprøver til bakteriologisk dyrkning, PCR diagnostik samt blodprøve til antistoftest). Hestene skal være negative på svaberprøver (analyseret ved bakteriologisk dyrkning og PCR test), og hingstene skal desuden "test-bedække" to hopper, som efterfølgende skal teste negative på svaberprøver udtaget fra klitoris (analyseret ved bakteriologisk dyrkning og PCR test). I CEM-endemiske lande kontrolleres og forebygges forekomsten af CEM ved hjælp af retningslinjer (Codes of practice) for avlere, dyrlæger og hesteejere.

Disse er baseret på omfattende bakteriologisk screening af avlshingste og hoppepopulationer for identifikation af asymptomatiske bærere (hingste og hopper) og eventuelle kliniske tilfælde (hopper). For at kontrollere smitte med CEM er det vigtigt, at heste, der diagnosticeres positive for *T. equigenitalis* isoleres og ikke anvendes til avl, førend de er behandlet og efterfølgende testet negative på kontrolprøver. Erfaringer viser, at i lande, hvor omfattende retningslinjer er blevet bredt implementeret, har det været muligt at nedbringe antallet af CEM tilfælde betragteligt, og i nogle tilfælde også udrydde sygdommen (Timoney, 2011).

T. equigenitalis er vanskelig at isolere, hvorfor tidspunktet for udtagelse af opfølgende kontrolprøver efter endt behandling kan være af stor vigtighed. I litteraturen angives, at kontrolprøver tidligst bør udtages 21 dage efter sidste lokale/topikale behandling, og 7, hvis der er tale om systemisk behandling (Timoney, 2011). Der refereres ikke til egentlige forsøg, hvor intervallet mellem behandling og kontrolprøveudtagning er undersøgt, men til enkelte kliniske tilfælde, hvor et interval på 7 dage efter lokal behandling var utilstrækkelig (Timoney, personlig kommunikation). Også danske data fra 2020-21 bekræfter denne observation. Intervallet på 21 og 7 dage er angivet første gang i Veterinary Services Memorandum no. 558.4 (1997). Her fremgår desuden, at der skal udtages svaberprøver tre gange i en 7 dages periode. Dvs. de første svaberprøver udtages på tidligst dag 21, og herefter 4 og 7 dage efter. Diagnosticeringsmetoden hér var bakteriel dyrkning.

For at øge sensitiviteten for udpegning af CEM positive hingste anvender CEM-fri og flere CEM endemiske lande testbedækninger. Det vil sige at hopper, der er testet negative for CEM, bliver bedækket. Efterfølgende udtages svaberprøver (typisk på tre forskellige tidspunkter). Svaberprøverne skal alle være negative for, hingsten kan diagnosticeres fri for *T. equigenitalis*. En retrospektiv gennemgang af data fra importerede hingste til USA viste, at tæt på 70% (16/23) af de hingste, som blev bekræftet som kroniske bærere af *T. equigenitalis* under deres karantæneophold efter ankomst til USA i perioden 1997-2007, var negative på bakteriologisk dyrkning, men fundet positive via deres test-bedækninger (Timoney, ikke-publicerede data).

Ved gennemgang af retningslinjer for CEM-fri og CEM-endemiske lande, erfares, at prøveudtagningstidspunkt samt omfanget af prøver, der udtages efter endt behandling er mere omfattende end det, der kræves i Danmark på nuværende tidspunkt. The World Organisation for Animal Health angiver, at kontrolprøver efter endt behandling tidligst bør udtages 21 dage efter sidste lokale behandling, og 7 dage efter sidste systemiske behandling (OIE Terrestrial Manual, 2018).

Fuldblodsindustrien (HBLB; Horserace Betting Levy Board) i Storbritannien har udarbejdet en International Code of practice. De anbefaler, at kontrolprøver for hopper og hingste, der er behandlet for CEM, skal udtages tre gange med syv dages mellemrum, tidligst fra dag 7 efter endt behandling. Dvs. tidligst på dag 7, efterfulgt af dag 14 og med sidste prøveudtagning på dag 21. Prøver fra 1. og 2. prøveudtagning anvendes til aerob og mikroaerofil dyrkning; 3. prøveudtagning anvendes til både aerob og mikroaerofil dyrkning samt diagnostik ved qPCR. Hingste skal desuden test-bedække tre hopper. Disse skal have udtaget svaberprøver (klitoris) på tre forskellige tidspunkter (med minimum 7 dages interval) startende fra dag 2 efter bedækning. Svaberprøverne skal testes ved aerob og mikroaerofil dyrkning samt PCR test (https://codes.hblb.org.uk/index.php/page/19).

I Sydafrika, som havde konstaterede tilfælde af CEM i 2011 og 2017, kræver myndighederne, at kontrolprøver udtages på dag 21 og 28 efter sidste behandlingsdag. Svaberprøverne anvendes både til aerob og mikroaerofil dyrkning samt PCR diagnostik (Veterinary Procedural Notice: The confirmation of diagnosis and treatment of contagious equine metritis (2019)).

I Sverige skal der udtages prøver tidligst 14 dage efter afsluttet behandling. Derefter skal man udtage prøver 5 gange med mindst 3 dages mellemrum. Samtlige prøver skal være negative for at hesten igen kan bruges til bedækning.

For hingste på EU-godkendte sædopsamlingsstationer gælder, at prøver for CEM skal udtages på to tidspunkter med mindst syv dages mellemrum, og tidligst 7 dage (systemisk behandling) eller 21 dage (lokal behandling) efter antimikrobiel behandling af donorhingsten (Kommissionens delegerede forordning (EU) 2020/686 af 17. december 2019).

Det skal bemærkes, at flere af de procedurer, der er nævnt ovenfor, primært var baseret på bakteriologisk dyrkning, da reglerne blev udformet. Senere er PCR kommet til og er i den sidste udgave af OIE-manualen (2018) er både dyrkning og PCR listet som anbefalede metoder (dyrkning omtales som "recommended" (+++) og PCR som suitable (++)). Flere publikationer har vist at både dyrkning og PCR er anvendelige til diagnostik af *T. equigenitalis* (Ousey et al., 2009). Det må antages, at PCR øger sensitiviteten af diagnostikken, da den i mindre grad påvirkes af prøvens alder og den kraftige kontaminationsflora på hestenes kønsorganer. På den anden side vil PCR detektere DNA fra både døde og levende bakterier. Efter et stringent udført behandlingsforløb med antibiotika og vask vil bakterien forventes at være om ikke udryddet så i alle fald kraftig reduceret i antal. Genlevende og sandsynligvis svækkede bakterier vil efter en latensperiode så langsomt kunne starte at vokse igen. Hvis der skulle være genlevende bakterier i kønsorganerne efter behandling, vil det være essentielt for metodens sensitivitet, at der indsamles så meget prøvemateriale som muligt til testen. For at sikre dette, skal der udtages separate svaberprøver fra de angivne anatomiske lokaliteter.

En måde at øge diagnostikkens sensitivitet er at undersøge flere prøver fra samme dyr med et interval på 4-7 dage, hvilket også bliver anvendt i flere af de testregimer, som er beskrevet ovenfor. Det er ikke publiceret undersøgelser som kvantificerer størrelsen på denne sandsynlige øgning i sensitivitet. Som det fremgår af den tidligere gennemgang anvendes gentagen prøvetagning i de fleste kontrolprogrammer for CEM, hvilket reflekterer den fordel dette må forventes at give i kontrol af infektionen.

Behandling af persistent inficerede hopper og hingste såvel som hopper med kliniske tegn på CEM baseres på lokal behandling i form af daglige grundige rens/vask af eksterne kønsorganer med klorhexidinsæbe, påsmøring af bakteriedræbende salve samt skylning og efterfølgende antibiotikabehandling af uterus (hopper). Lokalbehandling foretages i minimum 5 dage, og understøttes oftest af 5-10 dages systemisk antibiotikabehandling (Timoney, 2011). Lokal behandling af ydre kønsorganer vurderes som en nødvendighed, og er forudsætning for eliminering af infektionen. Det vil derfor være naturligt, at angivelse af et tidsinterval mellem behandling og fritestning tager udgangspunkt i, at dyret bliver lokalbehandlet.

På nuværende tidspunkt kan CEM positive hingste under offentligt tilsyn i Danmark få udtaget opfølgende kontrolprøver 7 dage efter sidste behandling. Hvis disse er negative ophæves det offentlige tilsyn, og hingsten må atter bedække hopper. De kliniske erfaringer med heste, der er negative på prøver udtaget kort tid efter endt behandling, og som efterfølgende tester positive ved en senere prøveudtagning, og/eller inficerer hopper ved testbedækninger (Timoney, ikke-publicerede data) taler for, at tidspunktet for udtagning af kontrolprøver justeres til de retningslinjer som OIE foreskriver og som anvendes i både CEM-endemiske og CEM-fri lande, dvs. mindst 21 dage efter behandling.

Desuden kan det anbefales, at der udtages kontrolprøver mere end én gang, for at øge den diagnostiske sikkerhed. Dette gøres allerede nu f.eks. i Sverige, Sydafrika, USA samt på EU godkendte sædopsamlingsstationer og det vil være naturligt at tage udgangspunkt i retningslinjerne i disse lande.

Dette vil vi konkretisere til en anbefaling om, at der skal udtages to kontrolprøver med 1 uges mellemrum for fritestning, og at disse tidligst tages på dag 21 og 28 efter afsluttet lokalbehandling.

‣2
Ifølge den nuværende praksis bliver kun hingste sat under offentligt tilsyn. Der er blevet stillet spørgsmål ved hensigtsmæssigheden ved denne praksis i forhold til at bekæmpe en kønssygdom.
Så vidt vi ved, er begrundelsen for denne praksis, primært at hingstene bliver brugt til flere parringer end hopperne. Dette passer også med de tal, vi har modtaget fra Dansk Islandshesteforening for avlssæsongen 2021. Her blev hingstene i gennemsnit brugt til 7 naturlige bedækninger. Enkelte hingste blev imidlertid anvendt i stort omfang, 17 af hingstene blev anvendt til mere end 20 forskellige hopper i løbet af sæsonen. Hopperne bliver på den anden side som regel kun parret med den samme hingst, hvis den ikke bliver drægtig i første forsøg. Dog vil der være tilfælde, hvor ejer beslutter at skifte hingst, hvis hoppen ikke bliver drægtig med den første hingst anvendt. I disse tilfælde vil en CEM positiv hoppe videregive smitten til den nye hingst. Hvis vi på den anden side ser på kønsfordelingen af smittede heste i prøver indsendt til diagnostik på SSI, så blev der i 2020 registreret 14 smittede hingste og 92 smittede hopper, de tilsvarende tal for 2021 var 24 hingste og 56 hopper. Der var således over 3 gange flere smittede hopper end hingste i løbet af disse to år. Alle smittede hingste blev sat under offentlig tilsyn og blev efterfølgende behandlet og fritestet på opfølgende prøver (undtagen en hingst, der blev kastreret). SSI har ingen oversigt over hvor mange af hoppene der blev behandlet og SSI modtog kun få prøver fra hopper til fritestning. Vi har grund til at tro, at mange af hopperne også blev behandlet og måske efterfølgende testet på andre laboratorier. Men vi ved også, at flere hesteejere af økonomiske grunde har valgt ikke at behandle hopperne, måske med håb om, at de spontant skulle eliminere infektionen. I denne forbindelse skal det bemærkes, at ifølge OIE expert group for CEM (OIE Report of the electronic consultation of an OIE expert group on contagious equine metritis July-December 2019) bør hopper betragtes som livsvarige smittebærere. (Dette gælder selvsagt kun, hvis dyrene ikke bliver behandlet.)

Da hopper udgør en stor del af smittespredningen, vil det være hensigtsmæssigt, at de også sættes under offentligt tilsyn. Som retningslinjerne er nu, har vi ingen kontrol med, om CEM positive hopper behandles, ej heller om de er CEM negative førend de atter forsøges bedækkes. For at kontrollere og forebygge forekomsten af CEM i Danmark vurderes det nødvendigt med yderligere kontrol samt en tilpasning af de nuværende retningslinjer på dette punkt. Vi vil derfor anbefale, at FVST for fremtiden også sætter hopper under offentlig tilsyn, hvis disse konstateres smittet med *T. equigenitalis*. Vi vil anbefale, at ophævelse af det offentlige tilsyn for hopper følger de samme retningslinjer som for hingste.

Note:
I løbet at 2021 har SSI påvist CEM hos 9 vallaker og ikke modtaget prøver efter behandling fra nogen af disse. Nogle vallaker fortsætter at bedække hopper efter kastrationen og kan repræsentere en smittefare for populationen. SSI har også modtaget prøver fra CEM positive hingsteføl født af positive hopper. Hverken vallaker eller føl bliver sat under offentlig tilsyn men kan potentielt videreføre smitte til hopper.
OIE Expert group diskuterede risikoen forbundet med import af CEM-positive vallaker (OIE Report of the electronic consultation of an OIE expert group on contagious equine metritis July-December 2019), men kom ikke til en endelig konklusion i spørgsmålet og ville overlade til importlandet at fastsætte regler på området. Vi er bekendt med hingste, som er testet positive gentagne gange og derefter kastreret, og vi antager at FVST derefter har løftet det offentlige tilsyn. Vi vil anbefale, at FVST i sådanne tilfælde henstiller til ejeren, om at disse vallaker holdes adskilt fra andre heste for at forhindre smitteoverførsel.

‣3

Dansk Veterinær Konsortium · Enhed for Veterinær Myndighedsbetjening · vet-myn@sund.ku.dk · www.dkvet.dk

For at ophæve det offentlige tilsyn for hingste, skal der udtages fire separate svaberprøver fra distale urethra, fossa glandis, fossa urethralis og præputium. Det kræves, at svaberprøverne skal undersøges ved qPCR og at alle prøvesvar skal være negative. Nogle dyrlæger indsender prøver efter behandling og beder om at disse undersøges som poolede prøver, og offentlig tilsyn er i 2021 i fire tilfælde blevet ophævet på basis af test af poolede prøver.

Til screeningsundersøgelser har det vist sig, at pooling af prøver giver acceptable resultater (Mawhinney et al., 2019). SSI tilbyder derfor undersøgelse af poolede prøver som en del af den overvågning som erhvervet startede i 2021. I Mawhinneys undersøgelse blev der imidlertid ikke undersøgt prøver udtaget efter behandling, hvor der må forventes, at antal tilstedeværende *T. equigenitalis* vil være meget lavt og sandsynligvis tæt på detektionsgrænsen for testen og måske kun detekterbar i enkelte anatomiske lokaliteter.

Som beskrevet ovenfor vil et stringent udført behandlingsforløb med antibiotika og vask føre til, at bakterien vil være om ikke udryddet så i alle fald kraftig reduceret i antal. Hvis der skulle være genlevende bakterier i kønsorganerne efter behandling, vil det være essentielt for metodens sensitivitet, at der indsamles så meget prøvemateriale som muligt til testen. For at sikre dette, skal der udtages separate svaberprøver fra de angivne anatomiske lokaliteter. En pooling af prøver vil på den anden side nedsætte mængden prøvemateriale fra den enkelte svaberprøve, der bliver undersøgt i PCR-testen. Det er derfor ulogisk både at forskrive anvendelse af separate svaberprøver og samtidigt at poole prøver i laboratoriet forud for PCR analyse, hvis man ønsker maksimal sensitivitet for diagnostikken.

SSI har opfattet formuleringen ”alle prøvesvar skal være negative” som en indikation på, at prøverne skal undersøges enkeltvis, selv om en pooling af de fire prøver til to poolede prøver også kan opfylde en fortolkning af formuleringen ”alle prøver”. SSI vil i sådanne tilfælde skrive en kommentar i prøvesvaret, hvor det fremgår, at testen er udført på poolede prøver. SSI vil gerne tilføje på prøvesvaret en kommentar om, at ”Prøvesvar baseret på poolede prøver kan ikke anvendes til at friteste dyret for *T. equigenitalis* efter behandling*”.*
SSI vil gerne have en tilkendegivelse fra FVST om, at de er enig i at anvende denne formulering.

Referencer:

Timoney, PJ. Contagious equine metritis. In: McKinnon, AO, Squires EL, Vaala WE & Varner D (eds) *Equine Reproduction*, 2nd edition. Ames, Iowa: Blackwell Publishing Ltd, (2011), 2399-2409.

Veterinary Services Memorandum no. 558.4. USA (1997). [Denne er vedhæftet besvarelsen]

OIE Terrestrial Manual 2018, Chapter 3.6.2. Contagious Equine Metritis.
https://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Health_standards/tahm/3.06.02_CEM.pdf

Veterinary Procedural Notice: The confirmation of diagnosis and treatment of contagious equine metritis. Department of Agriculture, Forestry and Fisheries, Directorate: Animal Health, South Africa (2019). [Denne er vedhæftet besvarelsen].

Ousey et al. An investigation into the suitability of a commercial real-time PCR assay to screen for *Taylorella equigenitalis* in routine prebreeding equine genital swabs. Equine Veterinary Journal (2009) 41: 878-882.

OIE Report of the electronic consultation of an OIE expert group on contagious equine metritis July-December 2019. https://www.oie.int/app/uploads/2021/09/a-ahg-contagious-equine-metritis-2019.pdf

Mawhinney et al. Pooling of genital swabs for detection by PCR of *Taylorella equgenitalis*, the cause of contagious equine metritis. Equine Veterinary Journal 51 (2019) 227-230; doi: 10.1111/evj.12986

VS Memo 558_4.pdf

VPN for Confirmation of Dia