

Pääntauti - kirjallisuuskatsaus ja alustava
seroprevalenssi Suomessa

Jonna Railio C 63
Lisensiaatin tutkielma 2015
Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto
Eläinlääketieteellinen tiedekunta
Helsingin Yliopisto



Tiedekunta - Fakultet – Faculty
Osasto - Avdelning – Department
Tekijä - Författare – Author
Työn nimi - Arbetets titel – Title

Oppiaine - Läroämne – Subject
Työn laji - Arbetets art – Level
Aika - Datum - Month and year
Sivumäärä - Sidoantal - Number of pages

Eläinlääketieteellinen
Eläinlääketieteellisten biotieteiden osasto
Railio, Jonna
Pääntauti – kirjallisuuskatsaus ja alustava
seroprevalenssi Suomessa
Mikrobiologia ja epidemiologia
Lisensiaatin tutkielma
02/2016
39

Tiivistelmä - Referat – Abstract

Pääntauti on *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*) -bakteerin aiheuttama kaikkialla maailmassa tavattava hevosten infektiotauti, jossa sairastuvuus on korkea. Hengitystieoireet, kuume ja abskessien muodostus ovat pääntaudille tyypillisiä oireita. *S. equi* on kehittynyt *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* -bakteerista, jonka kanssa sillä on lähes identtinen DNA. *S. equi* -bakteerilla on useita virulenssitekijöitä, joista merkittävimmät liittyvät synnynnäiseltä immuunijärjestelmältä suojautumiseen. Kapselin ja antifagosytäärin proteiiniensa avulla *S. equi* pystyy välttelemään komplementin välittämää opsonisaatiota ja neutrofiilien fagosytoosia. Pitkäaikaiset taudin kantajat ovat keskeisessä asemassa bakteerin säilymisen ja leviämisen kannalta.

Immuneetti pääntautia vastaan on pääasiassa vasta-ainevälitteinen ja paikallisen immunitetin merkitys taudilta suojautumisessa on keskeinen. Luonnollinen infektio aiheuttaa useimmille hevosille voimakkaan ja pitkäkestoisen immunitetin. Diagnostiikassa käytettäviä menetelmiä ovat bakteeriviljely, PCR ja serologia. Serologisista testeistä yleisimmin on käytössä *S. equi*-M-proteiinille (SeM) spesifisiä vasta-aineita mittaava ELISA-testi (ID Vet). Ristireagointi *S. zooepidemicus* -bakteerin kanssa heikentää SeM-proteiiniin perustuvan ELISA-testin spesifisyyttä. Pääntauti on hevosten infektiotaudeista yleisimmin diagnosoitu ja Suomessa se kuuluu ilmoitettaviin eläintauteihin. Usein bakteerimääritys jää kuitenkin tekemättä ja tapauksia ilmoittamatta, joten pääntaudin yleisyydestä Suomessa ei ole tarkempaa tietoa. Tämän lisensiaatin tutkielman kirjallisuuskatsauksessa käsitellään pääntautia keskittyen etiologiaan, patogeneesiin ja immunologiaan. Vaikka taudin hoitoa ei tässä työssä käsitellä, kirjallisuuskatsauksesta saa tietoa diagnostiikan suunnittelua varten. Patogeneesin ymmärtäminen on oleellista mietittäessä keinoja pääntaudin leviämisen estämiseksi. Työn kokeellisen osan tarkoituksena oli kartoittaa pääntaudin yleisyyttä Suomessa määrittämällä anti-SeM-vasta-aineiden esiintymistä suomalaisilla hevosilla. Seroprevalenssiksi saatiin 52,2 prosenttia, joka on korkea verrattuna muissa maissa tehtyihin prevalenssitutkimuksiin.

Avainsanat - Nyckelord – Keywords

Streptococcus equi, pääntauti, seroprevalenssi, hevonen

Säilytyspaikka - Förvaringställe - Where deposited

Eläinlääke- ja elintarviketieteiden talon (EE-talo) Oppimiskeskus

Työn johtaja (tiedekunnan professori tai dosentti) ja ohjaaja(t) - Instruktor och ledare - Director and Supervisor(s)

Airi Palva (työn johtaja), Joanna Koort (ohjaaja)

SISÄLLYSLUETTELO

1 JOHDANTO	5
2 PÄÄNTAUDIN ETIOLOGIA	6
3.1 <i>Streptococcus equi</i> subspecies <i>equi</i>	6
3.2 Virulenssitekijät	7
3.3 <i>S. equi</i> ja <i>S. zooepidemicus</i> – eroja ja yhtäläisyyksiä	10
3 PATOGENEESI	12
3.1 Tartunta ja inkubaatioaika	12
3.2 Akuutti vaihe ja abskessien muodostuminen	13
3.3 Oireettomat kantajat	14
3.4 Komplikaatiot	15
4 IMMUNOLOGIA	18
4.1 <i>S. equi</i> ja hevosen immuunijärjestelmä	18
4.2 Suojaavan immunitetin muodostuminen	19
4.3 Rokotteet	20
5 DIAGNOSTIIKKA	22
5.1 Näytteet	22
5.2 Bakteerin osoittaminen	23
5.2.1 Bakteeriviljely	23
5.2.2 PCR	24
5.3 Serologia	25
6 PÄÄNTAUTI SUOMESSA – ALUSTAVA SEROPREVALENSSI	26
6.1 Aineisto	26
6.2 Menetelmät	27
6.2.1 Näytteiden käsittely	27

6.2.2 Näytteiden analysointi	27
6.2.3 Tilastollinen analyysi	27
6.3 Tulokset	28
6.3.1 Aineiston jakautuminen eri muuttujien suhteen	28
6.3.2 Seroprevalenssi	29
6.3.3 Assosiaatiot muuttujittain	30
7 POHDINTA	32
7.1 Näytteiden laatu	32
7.2 Assosiaatiot muuttujiin	32
7.3 Korkea seroprevalenssi	34
7.4 Johtopäätökset	35
8 KIRJALLISUUS	36

1 JOHDANTO

Streptococcus equi subspecies *equi* -bakteeri aiheuttaa päntautia, joka on kaikkialla maailmassa tavattava hengitystieoireita aiheuttava hevosten infektiotauti (Paillot ym. 2010). Tietävästi ensimmäisen kerran päntaudista on raportoitu jo vuonna 1251 (Sweeney ym. 2005). Päntauti on helposti tarttuva ja vastustuskyvyttömässä populaatiossa sairastuvuus on korkea, usein jopa 100 % (Newton ym. 1997). Epidemiat aiheuttavat merkittäviä taloudellisia tappioita ja haittaa tallien toiminnalle (Moloney ym. 2013). Bakteeri säilyy hyvin pitkiä aikoja oireettomien kantajien ilmapusseissa, mikä vaikeuttaa taudin vastustamista (Newton ym. 1997). Päntaudille ominaista on korkea kuume sekä imusolmukkeiden voimakas turvotus ja paiseiden muodostus pään ja kaulan alueella (Paillot ym. 2010). Imusolmukkeiden turpoaminen voi johtaa jopa hevosen tukehtumiseen, mistä on peräisin englanninkielinen nimitys *strangles* (Paillot ym. 2010). Joissakin tapauksissa bakteeri pääsee veri- tai imusuonten välityksellä leviämään hengitysteistä muualle elimistöön, jolloin paiseita voi muodostua myös vatsa- tai rintaonteloon tai keskushermostoon (Gyles ym. 2010).

Hevosten infektiotaudeista päntauti on yleisimmin diagnosoitu, ja esimerkiksi Iso-Britanniassa todetaan vuosittain yli 600 epidemiaa (Robinson ym. 2013). Etelä-Afrikassa 109 hevosta sisältäneessä tutkimuksessa seroprevalenssiksi saatiin 10,1 prosenttia (Ling ym. 2011). Myös Irlannissa tehdyssä 162 laukkahevosta sisältäneessä tutkimuksessa päästiin kymmenen prosentin seroprevalenssiin (Shirlow & Duggan 2015). Suomessa päntauti kuuluu lakisääteisesti kuukausittain ilmoitettaviin eläintauteihin (Eläintautilaki, ilmoitusasetus). Siitä huolimatta osa tautitapauksista jää ilmoittamatta, joten päntautiepidemioiden yleisyys maassamme ei ole tiedossa (Evira 12.2.2016).

Tämän työn kirjallisuuskatsauksessa käsitellään päntautia keskittyen taudinaiheuttajabakteeriin, patogeneesiin ja päntautiin liittyvään immunologiaan. Työn tutkimusosan tarkoituksena oli selvittää päntaudin yleisyyttä Suomessa määrittämällä vasta-ainepitoisuuksia hevosten seeruminäytteistä. 305 hevosen seeruminäytteestä

mitattiin vasta-ainepitoisuus epäsuoralla ELISA-testillä. Samankaltaisen proteiinirakenteen takia ristireagointia *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* -bakteerin kanssa voi tapahtua (Robinson ym. 2013), mikä on otettava huomioon tuloksia tarkasteltaessa.

2 PÄÄNTAUDIN ETIOLOGIA

2.1 *Streptococcus equi* subspecies *equi*

Pääntautia aiheuttaa grampositiivinen, pitkiä ketjuja muodostava bakteeri *Streptococcus equi* subspecies *equi* (*S. equi*) (Taylor & Wilson 2006). Bakteerin oletetaan kehittyneen *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) -bakteerista (Waller 2013). Evoluutionsa aikana *S. equi* on menettänyt geenejä mutaation ja deletion kautta ja toisaalta saanut uusia geenejä lajien välisen horisontaalisen geneettisen materiaalin siirtymisen seurauksena (Waller & Robinson 2013).

S. equi on hyvin isäntäspesifinen ja aiheuttaa tautia vain hevoseläimissä (*Equidae*) (Taylor & Wilson 2006). Bakteeri on obligaatteja patogeeni eli se ei kuulu hevosen normaalimikrobistoon (Paillet ym. 2010). *S. equi*, kuten myös *S. zooepidemicus*, kuuluu Lancefield -ryhmään C (Timoney 2004). Streptokokkien jako Lancefield -ryhmiin perustuu eroavaisuuksiin bakteerien soluseiniäntien antigeeneissä (Gyles ym. 2010). *S. equi* voi suotuisissa olosuhteissa säilyä ympäristössä parikin kuukautta (Newton ym. 1997), mutta on herkkä kuumuudelle, auringon valolle ja kuivumiselle (Taylor & Wilson 2006). Desinfektioaineista povidonijodi, klorheksidiini ja glutaraldehydi tuhoavat tehokkaasti bakteerin (Newton ym. 1997).

2.2 Virulenssitekijät

S. equi -bakteerilla on useita virulenssitekijöitä, jotka parantavat sen taudinaiheutuskykyä. Virulenssitekijät muun muassa estävät fagosytoosia, auttavat bakteeria kiinnittymään soluihin, osallistuvat hiilihydraattiaineenvaihduntaan ja saavat aikaan tulehduksen välittäjäaineiden vapautumista (Gyles ym. 2010). *S. equi* replikoituu imusolmukkeissa, jonne hakeutuu myös runsaita määriä neutrofiileja (Timoney ym. 2008). Bakteerin selviytymisen kannalta onkin tärkeää välttyä komplementtivälitteiseltä opsonisaatiolta ja fagosytoosilta (Timoney ym. 2008). Merkittäviä fagosytoosilta suojaavia virulenssitekijöitä ovat hyaluronihappokapseli sekä antifagosytääriset proteiinit SeM ja Se18.9 (Timoney ym. 2008).

S. equi -bakteeria ympäröivä hyaluronihappokapseli on merkittävä tekijä fagosytoosilta suojaautumisessa (Timoney 2004). Kapseli on N-asetyyli-glukosamiinista ja glukuronihaposta koostuva polymeeri (Timoney 2004). Hyaluronihappokapseli on non-antigeeninen eli ei aiheuta immuunivastetta eläimessä, koska eläinten kudosta muistuttavan molekyyli-rakenteen takia hevosen immuunijärjestelmä ei tunnista sitä vieraaksi (Timoney 2004, Waller 2013). Kapselittomien mutanttien virulenssin on todettu olevan huomattavasti heikompi kuin kapselillisten (Gyles ym. 2010). Hydrofiilinen kapseli parantaa hydrofobisten SeM-molekyylien toimintaa ja estää fagosytoivien solujen reseptoreja kiinnittymästä bakteerisolun pinnalla oleviin C3-molekyyleihin (Timoney ym. 2008). Lisäksi hyaluronihappokapseli edesauttaa muiden virulenssitekijöiden toimintaa (Gyles ym. 2010). Se esimerkiksi suojaaa bakteerin happilabiileja proteaaseja ja toksiineja lisäämällä negatiivista varausta ja hydrofiilisyyttä bakteerin pinnalla, jolloin muodostuu paikallisesti pelkistävät olosuhteet (Gyles ym. 2010).

S. equi-M-proteiini eli SeM koostuu kahdesta identtisestä, toistensa ympärille kiertyneestä molekyylistä ja sijaitsee soluseinän pinnalla (Gyles ym. 2010). Fagosytoosilta suojaava vaikutus perustuu SeM-molekyylin kykyyn sitoa itseensä fibrinogeenia ja IgG:tä, minkä seurauksena neutrofiilien reseptorit eivät pääse kontaktiin bakteerin pinnalle kertyneiden komplementin C3b-molekyylien kanssa

(Timoney ym. 2008). Hyaluronihappokapseli on välttämätön SeM:n fagosytoosia estävän vaikutuksen kannalta (Gyles ym. 2010). Ilman kapselia SeM-proteiinit aggregoituvat ja menettävät kolmiulotteisen toiminnallisen rakenteensa, jolloin bakteeri altistuu fagosytoosille (Timoney 2004). SeM-proteiinin suojaava vaikutus ei kuitenkaan ole täydellinen, sillä se ei pysty estämään tiettyihin lineaarisiin epitoppeihin kohdistuvia vasta-aineita opsonisoimasta bakteeria (Gyles ym. 2010).

Myös Se18.9 auttaa *S. equi* -bakteeria suojautumaan fagosytoosilta (Timoney ym. 2008). Se18.9 on komplementin säätelyproteiinia, faktoria H, sitova pieni proteiini (Tiwari ym. 2007). Faktori H säätelee vaihtoehtoisia komplementtireittiä toimimalla kofaktorina faktori 1 -välitteisessä C3b-molekyylin halkaisussa (Timoney ym. 2008). Sillä on myös C3-konvertaasin muodostusta estävä ja hajotusta lisäävä vaikutus (Timoney ym. 2008). Se18.9 -proteiinin sitoutuminen faktoriin H vähentää C3-molekyylien kertymistä bakteerin pinnalle, mikä vähentää neutrofiilien bakterisidista vaikutusta *S. equi* -bakteeria kohtaan (Timoney ym. 2008). Se18.9 estää fagosytoosia myös fibrinogeenin sitomisen kautta (Tiwari ym. 2007). Sidottuna fibrinogeeni kiinnittyy neutrofiilin CR3-reseptoriin, jolloin neutrofiili ei pääse vuorovaikutukseen bakteerin pinnalle kertyneiden iC3b-molekyylien kanssa (Tiwari ym. 2007). Se18.9 on voimakkaasti immunogeeninen (Tiwari ym. 2007).

S. equi ilmentää kahta eri IgG-endopeptidaasia infektion aikana ja erittää niitä ympäristöön eksponentiaalisen kasvun aikana (Waller ym. 2011, Timoney ym. 2008). IdeE ja IdeE2 ovat entsyymejä, jotka halkaisevat IgG-molekyylejä, minkä seurauksena opsonisaatio vähenee ja immuunijärjestelmän on vaikeampi tunnistaa bakteeria (Waller ym. 2011). IdeE2 halkaisee hevosen IgG-molekyylejä tehokkaammin kuin IdeE (Waller ym. 2011). IgG-endopeptidaasien fagosytoosia estävä vaikutus neutrofiileihin on annosriippuvainen ja perustuu IdeE:n sitoutumiseen C3-molekyyleihin, minkä seurauksena neutrofiilien reseptorit eivät pääse kontaktiin C3-molekyylien kanssa (Timoney ym. 2008).

Virulentit *S. equi* -kannat ovat betahemolyttisiä (Taylor & Wilson 2006).

Streptolysiini S on bakteriosiinin kaltainen sytotoksiini ja saa aikaan hemolyysin (Gyles

ym. 2010). Kun streptolysiini S sitoutuu punasolun pintaan, muodostuu transmembraaninen kanava, mikä johtaa punasolun palautumattomaan osmoottiseen hajoamiseen (Gyles ym. 2010). Streptolysiini S parantaa myös bakteerin invaasiokykyä – se auttaa bakteeria tunkeutumaan syvemmälle kudoksiin hajottamalla epiteelisolujen välisiä liitoksia (Sumitomo ym. 2011).

Streptokinaasi on betahemolyyttisten streptokokkien tuottama proteiini, joka toimii plasminogeenin aktivaattorina (Gyles ym. 2010). Streptokinaasin vaikutuksesta hevosen plasminogeenista muodostuu plasmiinia (Gyles ym. 2010). Plasmiini hydrolysoi fibriiniä, mikä todennäköisesti auttaa bakteeria leviämään kudoksissa (Gyles ym. 2010). Plasmiinin rooli patogeneesissä ei ole täysin selvä, mutta sen uskotaan fibriinin hajotuksen lisäksi aktivoivan komplementtia ja auttavan bakteereita typpiyhdisteiden hankinnassa (Gyles ym. 2010).

S. equi tuottaa neljää superantigeenia SeeH, SeeI, SeeL ja SeeM, joita koodaavat geenit sijaitsevat kahdessa profaagissa (Paillot ym. 2010). *S. equi* -bakteerin superantigeenit muistuttavat aminohapposekvensseiltään läheisesti *S. pyogenes* -bakteerin superantigeneja, joiden vaikutuksista tiedetään paljon (Paillot ym. 2010). Superantigeenit häiritsevät synnynnäisen ja opitun immuunijärjestelmän toimintaa aiheuttamalla epäspesifisen T-solujen proliferaation ja tarpeettoman voimakkaan tulehdusreaktion (Paillot ym. 2010). Superantigeenit pystyvät ohittamaan MHC II -molekyylin välityksellä tapahtuvan antigeenin esittelyn, jolloin ei synny rajallista spesifistä T-soluvastetta, vaan T-solujen aktivaatio johtaa kontrolloimattomaan tulehduksen välittäjäaineiden vapautumiseen (Paillot ym. 2010). SeeI, SeeL ja SeeM superantigeenien on osoitettu aiheuttavan hevosen T-lymfosyyttien proliferaatiota sekä gammainterferonin tuotantoa T-lymfosyyteissä (Paillot ym. 2010). SeeI:llä on myös pyrogeeninen vaikutus hevosessa (Paillot ym. 2010).

Myös *S. equi* -bakteerin soluseinän peptidoglykaani on potentti pyrogeeni, sillä se aiheuttaa pyrogeenisten sytotoksiinien, kuten interleukiini-6 ja TNF (tumour necrosis factor), vapautumista leukosyyteistä (Gyles ym. 2010). Peptidoglykaani aktivoi vaihtoehdoisen komplementtireitin, mikä johtaa kemotaktisten tekijöiden (C3a, C5a)

vapautumiseen (Gyles ym. 2010). Nämä molekyylit houkuttelevat tehokkaasti hevosen granulosityttejä (Gyles ym. 2010).

ICE (integrative conjugative element) -geenialueet pystyvät itsenäisesti siirtymään bakteerista toiseen ja ovat tärkeitä virulenssitekijöiden siirtymisessä bakteerilajien välillä (Heather ym. 2008). *S. equi* -bakteerin ICESe2:n koodaama NRPS (non-ribosomal peptide synthetase) -järjestelmä tuottaa equibaktiini nimistä sideroforia, joka tehostaa bakteerin raudan saantia (Heather ym. 2008). Raudan saanti on kaikille patogeenisille bakteereille välttämätöntä (Waller ym. 2011)

2.3 *S. equi* ja *S. zooepidemicus* – eroja ja yhtäläisyyksiä

S. equi on hyvin läheistä sukua *S. zooepidemicus* -bakteerille, josta sen oletetaan kehittyneen evoluution kautta (Waller 2013). Näiden bakteereiden DNA on yli 97 prosenttisesti yhteneväinen (Waller 2013). Evoluutionsa aikana *S. equi* on saanut virulenssitekijöitä lajien välisen horisontaalisen geenien siirtymisen avulla, mikä on lisännyt sen patogeenisuutta *S. zooepidemicus* -bakteeriin verrattuna (Waller & Robinson 2013). Superantigeneja koodaavat profaagisekvenssit ovat esimerkki hankituista virulenssitekijöistä, jotka *S. zooepidemicus* -bakteerilta puuttuvat (Waller & Robinson 2013). *S. equi* on saanut virulenssitekijöitä muun muassa *Streptococcus pyogenes* -bakteerilta, jonka DNA on yli 80 prosenttisesti identtinen sekä *S. equi* että *S. zooepidemicus* -bakteerien kanssa (Waller & Robinson 2013).

Geneettisestä samankaltaisuudestaan huolimatta *S. equi* ja *S. zooepidemicus* patogeeneina eroavat toisistaan huomattavasti (Waller & Robinson 2013). *S. equi* on obliigaatti patogeeni eikä siis kuulu hevosen normaalimikrobistoon, kun taas opportunistisesti patogeeninen *S. zooepidemicus* elää normaalistikin hevosen limakalvoilla aiheuttamatta tautia (Timoney 2004). Stressitekijän, kuten kuumuuden, pitkän kuljetuksen tai virusinfektion, seurauksena *S. zooepidemicus* voi kuitenkin aiheuttaa hevoselle vakaviakin hengitystieoireita (Velinen & Timoney 2013). *S. equi* kuitenkin muistuttaa enemmän *S. zooepidemicus* -kantoja, jotka aiheuttavat kohtutulehduksia ja abortteja, kuin hengitystietulehduksiin liitettyjä kantoja (Waller ym. 2011). Harvinaisia poikkeustapauksia lukuun ottamatta *S. equi* aiheuttaa tautia vain

hevoseläimissä, mutta *S. zooepidemicus* infektoi myös monia muita selkärangkaislajeja (Waller ym. 2011).

S. zooepidemicus pystyy kolonisoimaan limakalvoja huomattavasti paremmin kuin *S. equi*, joka tunkeutuu nopeasti syvemmälle kudoksiin eikä säily kauan limakalvoilla (Waller ym. 2011). Huonomman kolonisaatiokyvyn oletetaan johtuvan ainakin *S. equi* -bakteerin kiinnittymiseen tarvittavien proteiinirakenteiden vähentyneestä ilmentämisestä sekä kyvyttömyydestä erilaisten hiilihydraattien metaboliaan verrattuna *S. zooepidemicus* -bakteeriin (Waller ym. 2011). *S. equi* ei pysty fermentoimaan riboosia, sorbitolia eikä laktoosia, kun taas suurin osa *S. zooepidemicus* -kannoista fermentoi niitä (Waller ym. 2011).

Bakteerit eroavat suuresti myös kyvyssä suojautua fagosytoosilta (Tiwari ym. 2007). *S. equi* -bakteerilla on useita virulenssitekijöitä, kuten antifagosytääriset proteiinit SeM ja Se18.9 sekä hyaluronihappokapseli, jotka auttavat sitä välttymään komplementtivälitteiseltä fagosytoosilta (Tiwari ym. 2007). Nämä virulenssitekijät puuttuvat *S. zooepidemicus* -bakteerilta, joka onkin hyvin altis fagosytoosille (Tiwari ym. 2007).

S. equi ja *S. zooepidemicus* -bakteerien samankaltaisuus aiheuttaa ristireagointia serologisissa tutkimuksissa (Robinson ym. 2013). Vasta-aineiden kvantitatiiviseen määrittämiseen käytetään epäsuoraa ELISA-testiä, joka mittaa *S. equi* -bakteerin virulenssitekijänä toimivaan SeM-proteiiniin suunnattuja vasta-aineita (Robinson ym. 2013). *S. zooepidemicus* -bakteerilla on vastaava proteiini, SzM, jonka rakenne on hyvin samankaltainen SeM:n kanssa (Robinson ym. 2013). Ristireagointi SzM:n kanssa aiheuttaa virhepositiivisia tuloksia ELISA-testissä (Robinson ym. 2013).

3 PATOGENEESI

3.1 Tartunta ja itämisaika

Pääntauti tarttuu erittäin helposti ja alttiissa hevospopulaatiossa sairastuvuus on 85 – 100 % (Taylor & Wilson 2006). Vuoden ikäiset varsat ja nuoret aikuiset ovat herkimpiä saamaan tartunnan (Taylor & Wilson 2006). Sairauden vakavuus riippuu hevosen immuniteetista sekä infektiomäärästä (Sweeney ym. 2005). Yksivuotiailla varsoilla oireet ovat yleensä vakavimmat ja pitkäkestoisimmat (Taylor & Wilson 2006). Mitä suurempi infektiomäärä on, sitä vakavimmat ovat oireet (Sweeney ym. 2005). Suuri infektiomäärä myös lyhentää taudin itämisaikaa (Sweeney ym. 2005). Pienet bakteerimäärät pystytään poistamaan hengitysteistä limakalvojen epiteelisolujen värekarvojen avulla (Sweeney ym. 2005).

Pääntautitartunnan saanut hevonen alkaa erittää bakteeria sieraineritteessä latenttivaiheen jälkeen eli 4 – 14 päivää infektiosta (Gyles ym. 2010). Bakteerieritys jatkuu yleensä noin 3 – 6 viikkoa taudin akuuttivaiheen jälkeen (Gyles ym. 2010). Sieraineritteen lisäksi *S. equi* -tartunnan lähteenä toimii puhjenneiden abskessien erite (Gyles ym. 2010). Paitsi suorassa kontaktissa, pääntauti tarttuu myös esimerkiksi kontaminoituneen veden, rehun tai muun fomiitin välityksellä (Gyles ym. 2010). Hevonen saa tartunnan inhaloimalla tai ingestoimalla bakteeria (Taylor & Wilson 2006). Suuhun tai sieraimiin päästyään *S. equi* kiinnittyy suun tonsillojen kryptien soluihin tai nenänielun tonsillojen värekarvoihin (Gyles ym. 2010). Hyaluronihappokapseli, SeM ja fibronektiiniä sitovat proteiinit auttavat bakteeria kiinnittymisessä (Taylor & Wilson 2006). *S. equi* ei kolonisoi limakalvojen epiteeliä vaan tunkeutuu nopeasti syvemmälle kudokseen (Sweeney ym. 2005).

S. equi siis tunkeutuu elimistöön suu- ja nenänielun tonsilloiden kautta (Timoney & Kumar 2008). Muutaman tunnin kuluttua tartunnasta bakteeria on enää vaikea löytää limakalvoilta (13), koska se leviää nopeasti leuanalus- ja retrofaryngeaali- imusolmukkeisiin (Paillot ym. 2010). *S. equi* -bakteereita on osoitettu pään ja kaulan

imusolmukkeista jo kolme tuntia tartunnasta (Waller ym. 2011). Imusolmukkeissa *S. equi* alkaa lisääntyä voimakkaasta immuunivasteesta huolimatta (Paillot ym. 2010). Itämisaika tartunnasta oireiden alkamiseen on 3 – 14 päivää (Gyles ym. 2010).

3.2 Akuutti vaihe ja abskessien muodostuminen

Akuutin pääntaudin oireita ovat muun muassa kuume, uupumus, sierainvuoto, silmien ja sierainten limakalvojen hyperemia, purulentti silmävuoto, nielemisvaikeudet, leuanalusimusolmukkeiden turvotus ja aristus sekä lievä yskä (Gyles ym. 2010, Sweeney ym. 2005). Turvonneista imusolmukkeista nieluun sekä henki- ja ruokatorveen kohdistuva paine voi aiheuttaa hengitys- ja nielemisvaikeuksia (Sweeney ym. 2005). Sierainvuoto alkaa seroosina, mutta erite muuttuu nopeasti mukopurulentiksi ja lopulta purulentiksi (Sweeney ym. 2005). Abskessien muodostuminen on pääntaudille ominaista (Paillot ym. 2010) ja yleisimmin abskessija kehittyy submandibulaari- ja retrofaryngeaali-imusolmukkeisiin, mutta myös muut pään ja kaulan alueen imusolmukkeet voivat infektoitua (Sweeney ym. 2005). Infektion ja inflammaation seurauksena imusolmukkeisiin kehittyy ensin turvotusta, jota seuraa abskessien muodostuminen (Paillot ym. 2010, Sweeney ym. 2005). Abskessit ovat havaittavissa 3 – 5 vuorokautta imusolmukkeiden infektoitumisen jälkeen (Sweeney ym. 2005).

Kuumeen nousu on ensimmäinen oire pääntaudissa ja on seurausta pyrogeenisten mitogeenien, SePE-H ja I vapautumisesta (Sweeney ym. 2005). Samaan aikaan veren fibrinogeenipitoisuus sekä leukosyytti- ja neutrofiilimäärät nousevat (Sweeney ym. 2005). Bakteerieritys sieraineritteessä alkaa yleensä 2 – 3 vuorokautta kuumeen noususta (Taylor & Wilson 2006). Kuume jatkuu abskessien kypsymiseen asti (Sweeney ym. 2005). Synnynnäinen immuunijärjestelmä ei kykene tappamaan patogeneita, mikä johtaa pitkien streptokokkiketjujen ja neutrofiilien kerääntymiseen tonsilloihin ja infektoituneisiin imusolmukkeisiin (Waller ym. 2011). Neutrofiilien infiltraatio tonsilloihin ja imusolmukkeisiin ajoittuu kuumeen alkamiseen (Timoney & Kumar 2008).

Bakteerin lisääntyminen imusolmukkeissa aiheuttaa voimakkaan immuunivasteen (Paillot ym. 2010). Komplementtiproteiinien ja bakteerin peptidoglykaanin välisen vuorovaikutuksen seurauksena muodostuu kemotaktisia tekijöitä, jotka houkuttelevat paikalle runsaasti neutrofiilejä (Sweeney ym. 2005). *S. equi* -bakteerilla on useita fagosytoosilta suojaavia virulenssitekijöitä, kuten hyaluronihappokapseli, oletettu leukosiditoksiini, antifagosyyttiset proteiinit SeM ja Se18.9 sekä IdeE (Gyles ym. 2010), joka on IgG:tä hajottava entsyymi (Waller ym. 2011). Kun elimistö ei onnistu tuhoamaan patogeenia, solun ulkoiseen tilaan kertyy suuria määriä bakteereita sekä degeneroituvia neutrofiilejä, joista alkaa muodostua mätää (Gyles ym. 2010). Fagosytoosilta suojaavien virulenssitekijöiden lisäksi abskessien muodostumiseen liittyvät sideroforina toimiva equibactin sekä solukalvoja hajottava streptolysiini S ja plasminogeenia aktivoiva streptokinaasi (Gyles ym. 2010).

Abskessien kypsymiseen ja ihon läpi puhkeamiseen kuluu noin 4 – 21 vuorokautta tartunnasta (Waller ym. 2011). Retrofaryngeaali-imusolmukkeiden abskessit voivat puhjeta ilmapusseihin tai nieluun (Waller ym. 2011). Ilmapussit ovat korvatorvien laajentumat ja yhteydessä nenäonteloon (Waller ym. 2011).

3.3 Oireettomat kantajat

Yleensä hevonen erittää bakteeria noin 3 – 6 viikkoa pääntaudin akuutin vaiheen jälkeen (Gyles ym. 2010). Osalla hevosista bakteeri kuitenkin säilyy ilmapusseissa useita kuukausia kliinisen parantumisen jälkeen (Gyles ym. 2010). Useimmiten pitkittynyt taudin kantajuus liittyy ilmapussien tai sinuksien empyeemaan, kun taas tonsilloissa persistoiva infektio on harvinaista (Gyles ym. 2010). Ilmapussien empyeema pääsee kehittymään, jos retrofaryngeaalisten imusolmukkeiden abskessit puhkeavat ja märkäerite tyhjenee ilmapusseihin (Whelchel & Chaffin 2009). Vaikka abskessit puhkeaisivatkin ilmapusseihin, useimmat hevoset puhdistuvat silti infektiosta abskessimateriaalin vuotaessa ilmapusseista sierainten kautta ulos runsaana mukopurulenttina eritteenä (Waller ym. 2011). Kuitenkin jopa kymmenessä prosentissa tapauksista ilmapusseihin jää märkäeritettä, joka tiivistyessään ja kovettuessaan

muodostaa kondroideja (Waller ym. 2011). Kondroidit voivat sisältää eläviä *S. equi*-bakteereja, jotka voivat säilyä ilmapusseissa jopa vuosia (Waller ym. 2011). Empeema voi olla joko vain toisessa tai molemmissa ilmapusseissa (Newton ym. 1997).

Noin kymmenen prosenttia pääntaudin sairastaneista hevosista jää oireettomiksi taudin kantajiksi (Ling ym. 2011). Kliinisesti oireettomilla kantajilla on suuri merkitys pääntaudin ylläpitämisessä ja levittämisessä (Waller ym. 2011). Kantajat aiheuttavat toistuvia taudin purkauksia populaatiossa ja voivat siirtää taudin uuteen populaatioon (Sweeney ym. 2005, Welchel & Chaffin 2009). Koska hevoset ovat oireettomia ja erittävät bakteeria jaksottaisesti (Sweeney ym. 2005), niitä ei osata pitää eristyksissä. Pääntaudille vastustuskyvyttömät hevoset voivat saada tartunnan oireettomien kantajien normaaleista sieraineritteistä (Sweeney ym. 2005). Taudin kantajuus voi olla hyvin pitkäaikaista, jopa 39 kuukautta kestäneestä piilevästä infektiosta on raportoitu (Newton ym. 1997). Oireettomien kantajien tunnistamiseksi ilmapusseista endoskopiassa huuhtelemalla otetut näytteet viljellään tai testataan PCR:llä (Welchel & Chaffin 2009). Koska bakteerin erittäminen on jaksottaista, hevosen voidaan todeta puhdistuneen infektiosta vasta, kun kondroidit on poistettu ilmapusseista ja viljely- tai PCR-tulokset ovat toistuvasti negatiivisia (Welchel & Chaffin 2009).

3.4 Komplikaatiot

Tyypillisessä pääntautiepidemiassa on korkea sairastuvuus ja matala kuolleisuus (Welchel & Chaffin 2009). Komplikaatiot kuitenkin nostavat kuolleisuutta (Welchel & Chaffin 2009). Kuolleisuus pääntaudissa on noin 4 – 10 prosenttia (Newton ym. 1997, Taylor & Wilson 2006). Mahdollisia komplikaatioita ovat muun muassa abskessien ja turvonneiden imusolmukkeiden mekaanisesti aiheuttamat ongelmat, bronkopneumonia, pääntaudin ns. bastard-muoto ja immuunivälitteiset sairaudet, kuten purpura hemorrhagica (Welchel & Chaffin 2009). Abskessit ja turvonneet imusolmukkeet voivat aiheuttaa komplikaatioita ympäröiviin rakenteisiin kohdistuvan paineen kautta (Sweeney ym. 2005). Nieluun, henkitorveen tai ruokatorveen aiheutuva paine voi johtaa nielemis- ja hengitysvaikeuksiin, jopa tukehtumiseen (Sweeney ym.

2005). Retrofaryngeaalisten imusolmukkeiden puhkeaminen ilmapusseihin voi johtaa empyemaan ja pitkittyneeseen taudin kantajuuteen (Whelchel & Chaffin 2009). Joskus abskessit puhkeavat ilmapussien sijaan nieluun, mistä voi seurata bronkopneumonia (Whelchel & Chaffin 2009).

Tavallisesti abskessien muodostuminen rajoittuu pään ja kaulan alueen imusolmukkeisiin (Whelchel & Chaffin 2009). Pääntaudin yleistyneessä muodossa, niin kutsutussa bastard-muodossa, abskesseja muodostuu myös muualle elimistöön bakteerin leviämisen seurauksena (Whelchel & Chaffin 2009). Bakteerit voivat levitä verenkierron tai imunesteen välityksellä tai esimerkiksi aivohermoja pitkin (Whelchel & Chaffin 2009). Tyypillisiä paikkoja abskessien muodostumiselle bastard-muodossa ovat munuaiset, perna, keuhkot, suolilieve ja aivot (Whelchel & Chaffin 2009). Jos bakteerit leviävät elimistössä, se tapahtuu taudin alussa kuumevaiheessa (Taylor & Wilson 2006). Kun hevosia on infektoitu intranasalisesti, bakteremiaa on havaittu 6 - 12 päivän kuluttua infektiosta (Sweeney ym. 2005). Bastard-muotoisen pääntaudin oireet riippuvat kohde-elimistä, mutta yleensä taudin ennuste on heikko (Whelchel & Chaffin 2009).

Purpura hemorrhagica on immuunivälitteinen vaskuliitti eli verisuonitulehdus, joka voi kehittyä jälkikomplikaationa kahdesta kolmeen viikkoa pääntauti-infektion jälkeen (Whelchel & Chaffin 2009). Myös pääntautia vastaan rokottaminen voi aiheuttaa purpura hemorrhagigan (Whelchel & Chaffin 2009). Kyseessä on tyypin 3 yliherkkyyssreaktio, jossa vasta-aine-antigeenikomplekseja kertyy verisuonten seinämiin (Whelchel & Chaffin 2009). Immuunikompleksit koostuvat *S. equi* -antigeneista ja niille spesifisistä IgA-vasta-aineista (Galan & Timoney 1985b). Tauti aiheuttaa myös seerumin IgA-pitoisuuden kohoamisen (Galan & Timoney 1985b). Immuunikompleksit saavat aikaan komplementin aktivaation ja kemotaktisten aineiden vapautumisesta seuraavaa neutrofiilien ja makrofagien kertymistä verisuonten seinämiin (Whelchel & Chaffin 2009). Tulehdussoluista vapautuvat proteolyttiset entsyymit vaurioittavat verisuonten seinämiä aiheuttaen ödeemaa eli nesteturvotusta (Whelchel & Chaffin 2009). Ödeeman lisäksi muita oireita ovat muun muassa kuume, petekkiat ja ekkymoosit limakalvoilla sekä urtikaria (Whelchel & Chaffin 2009). Kaviokuume,

ähky, lihaskivut ja hengitysvaikeudet ovat mahdollisia seurauksia vaskuliitista (Whelchel & Chaffin 2009). Infarktiivinen muoto purpura hemorrhagigasta on harvinainen ja siihen liittyy infarkteja ja verenvuotoa useissa kudoksissa (Whelchel & Chaffin 2009). Tila johtaa DIC:n (disseminated intravascular coagulopathy) kehittymiseen ja päättyy yleensä kuolemaan (Whelchel & Chaffin 2009). Kuten bastard-muotoista pääntautia, myös purpura hemorrhagigaa sairastavan hevosen SeM-tiitterit ovat tyypillisesti huomattavan korkeat (>1:12800) (Whelchel & Chaffin 2009).

Akuutti rhabdomyolyysi ja immuunivälitteinen polymyosiitti ovat pääntauti-infektioihin liittyviä myopatioita, joita tavataan pääasiassa quarterhevosilla (Whelchel & Chaffin 2009). Akuutti rhabdomyolyysi on harvinainen ja yleensä kuolemaan johtava (Whelchel & Chaffin 2009). Kliinisesti tauti on samanlainen kuin infarktiivinen purpura hemorrhagiga, mutta patofysiologian uskotaan olevan erilainen (Whelchel & Chaffin 2009). Akuuttia rhabdomyolyysia sairastavilla hevosilla SeM-tiittereiden on todettu pysyvän normaalilla tasolla, kun taas Se18.9-tiitterit ovat olleet korkeat (Whelchel & Chaffin 2009). Immuunivälitteinen polymyosiitti aiheuttaa jäykkyyden ja yleisen huonovointisuuden lisäksi akuuttia lihasatrofiaa gluteus- ja epaksiaalilihaksissa (Whelchel & Chaffin 2009).

4 IMMUNOLOGIA

4.1 *S. equi* ja hevosen immuunijärjestelmä

S. equi pystyy tehokkaasti hämäämään hevosen synnynnäistä immuunijärjestelmää (Waller ym. 2011). Tärkeimmät virulenssitekijät komplementin välittämältä opsonisaatiolta ja neutrofiilien fagosytoosilta suojautumisessa ovat hyaluronihappokapseli ja antifagosytääriset proteiinit SeM, Se18.9 ja IdeE (Timoney ym. 2014, Timoney ym. 2008). SeM, Se18.9 ja IdeE ovat immunogeenisiä ja aiheuttavat spesifisten vasta-aineiden tuotantoa akuutin taudin ja toipumisvaiheen aikana (Timoney ym. 2008, Sheoran ym. 1997). Hyaluronihappokapseli puolestaan on nonantigeeninen – sen molekyyli rakenne jäljittelee eläinten kudoksia ja estää hevosen immuunijärjestelmää tunnistamasta bakteeria (Waller ym. 2011).

S. equi sekoittaa hevosen immuunijärjestelmää myös tuottamiensa superantigeenien, SeeH, SeeI, SeeL ja SeeM, avulla (Paillot ym. 2010). Superantigeenit ovat voimakkaasti immuunijärjestelmää stimuloivia molekyylejä (Paillot ym. 2010), mutta spesifisen puolustusreaktion sijaan ne saavat aikaan hallitsemattoman voimakkaan inflammatorisen vasteen (Waller 2013). Tavanomaiset antigeenit aiheuttavat spesifisen, tiettyyn antigeeniin kohdistuvan puolustusreaktion, koska antigeeniesittelijäsolut esittelevät ne ja spesifiset T-solureseptorit tunnistavat antigeenit (Waller 2013). Superantigeenit pystyvät ohittamaan esittelijäsolut ja sitoutuvat suoraan MHC luokka II -molekyyliin peptidien sitoutumiskohdan ulkopuolelle, minkä seurauksena 5 – 20 prosenttia T-soluista aktivoituu (Waller 2013). Superantigeenit saavat T-solut proliferoitumaan ja tuottamaan gammainterferonia (Paillot ym. 2010). Superantigeenien vaikutukset T-soluihin ovat annoksesta riippuvaisia (Paillot ym. 2010). Superantigeneista SeeI, SeeL ja SeeM stimuloivat hevosen lymfosyyttejä, pääasiassa CD4+ ja CD5+ -T-soluja (Paillot ym. 2010). SeeH-superantigeenilla ei ole osoitettu olevan immuunijärjestelmää stimuloivaa vaikutusta hevosessa, mutta aasissa se aiheuttaa lymfosyyttien proliferaatiota (Paillot ym. 2010).

Superantigeenien aiheuttaman hallitsemattoman inflammatorisen reaktion oletetaan häiritsevän tehokkaan immuunivasteen muodostamista patogeeneja vastaan (Paillot ym. 2010). Pääntautitartunta aiheuttaa spesifisten vasta-aineiden muodostumista ainakin SeeH ja SeeI superantigeeneja vastaan, mutta vasta-aineet neutralisoivat superantigeeneja vain rajallisesti (Paillot ym. 2010). Hevoset tulevat kuitenkin vastustuskykyisiksi SeeI:n pyrogeenista vaikutusta kohtaan (Paillot ym. 2010). Vasta-ainetasot nousevat nopeasti ja ovat huipussaan 20 – 80 päivän kuluttua (Paillot ym. 2010).

4.2 Suojaavan immunitetin muodostuminen

Useimmat hevoset kehittävät vahvan ja pitkäaikaisen immunitetin pääntautia vastaan luonnollisen tartunnan jälkeen (Taylor & Wilson 2006). Noin 75 prosentilla pääntaudin sairastaneista hevosista suojaava immunitetti säilyy vähintään neljä vuotta (Taylor & Wilson 2006). Toiset hevoset kuitenkin ovat alttiita uudelle tartunnalle jo puolen vuoden – vuoden kuluttua (Taylor & Wilson 2006). Pääntaudille vastustuskykyisten tammojen varsat saavat vasta-aineet ternimaidon kautta ja immunitetti kestää kolmen kuukauden ikään asti (Taylor & Wilson 2006). Immunitetti *S. equi* -bakteeria vastaan on pääasiassa vasta-ainevälitteinen (Mengyao & Benfang 2010). Vasta-aineet opsonisoivat bakteerin ja lisäävät fagosytoosia (Mengyao & Benfang 2010). Pääntautitartunta aiheuttaa immunoglobuliinien pitoisuuksien nousun sekä veressä että nenänielun limakalvoilla (Galan & Timoney 1985a).

Paikallinen ja systeeminen immuunivaste ovat toisistaan riippumattomia (Galan & Timoney 1985a). Hengitysteiden limakalvojen ja seerumin immunoglobuliinien spesifisyydessä on suuria eroja – seerumin IgA ja IgG -molekyylit tunnistavat eri proteiineja kuin limakalvoilla olevat vasta-ainemolekyylit (Galan & Timoney 1985a). Vaikka seerumin immunoglobuliinit tunnistavat suuremman joukon eri antigeeneja, paikallisen immunitetin merkitys pääntaudilta suojautumisessa on tärkeämpi kuin systeemisen (Galan & Timoney 1985a). Luonnollisen infektion jälkeen limakalvojen immunoglobuliinitasot ovat korkeat ja useimmilla hevosilla on erinomainen suoja tautia

vastaan riippumatta seerumin vasta-ainepitoisuuksista (Taylor & Wilson 2006, Galan & Timoney 1985a).

Nenänielun limakalvojen IgA- ja IgG- pitoisuudet ovat koholla jo viikon kuluttua infektiosta, mutta nousevat edelleen ja ovat kuukauden kuluttua vielä huomattavasti korkeammat (Galan & Timoney 1985a). Limakalvoilla spesifinen IgGb on vallitseva vasta-ainetyyppi pääntaudin akuutissa vaiheessa, mutta IgA korvaa sen toipumisvaiheessa (Sheoran ym. 1997). SeM-spesifisiä IgGa ja IgG(T) -vasta-aineita limakalvoilla on taudin akuutissa vaiheessa ja toipumisvaiheen alussa (Sheoran ym. 1997). Äskettäin pääntaudin sairastaneilla hevosilla opsonofagosytäärinen IgGb on seerumin vallitseva vasta-ainetyyppi (Sheoran ym. 1997). Tartunnan aikana ja jälkeen myös spesifisien opsonofagosytääristen IgGa-vasta-aineiden pitoisuudet seerumissa ovat korkeat (Sheoran ym. 1997). Voimakas immuniteetti suojaa hevosta pian toipumisen jälkeen alkuperäiseen tartuntaan verrattuna moninkertaiseltakin bakteerimäärältä (Galan & Timoney 1985a).

4.3 Rokotteet

Hevosten rokottaminen pääntautia vastaan maailmanlaajuisesti on yleistä (Sheoran ym. 1997). Rokotteiden koostumus ja annostelureitit vaihtelevat (Taylor & Wilson 2006). Lihaksen sisäisesti annettavat rokotteet sisältävät *S. equi* -antigeneja, kuten SeM-proteiinia (Taylor & Wilson 2006). Eläviä heikennettyjä rokotteita käytetään joko ylähuuleen limakalvon alaisesti tai sieraimen sisäisesti annosteltuna (Waller 2013).

Pääntautirokotteiden ongelmana ovat olleet huono teho (Sheoran ym. 1997), haittavaikutukset (Taylor & Wilson 2006) ja virhepositiiviset tulokset diagnostiikassa (Waller 2013). Lihaksen sisäisesti annettavilla rokotteilla ei saada aikaan minkäänlaista vasta-ainevastetta limakalvoille (Sheoran ym. 1997), mikä on ongelma, sillä nimenomaan paikallisella immuniteetilla on keskeinen merkitys pääntautitartunnalta suojautumisessa (Galan & Timoney 1985a). Myös seerumin vasta-ainetasot jäävät matalammiksi kuin pääntaudin sairastaneilla hevosilla (Hobo ym. 2010, Sheoran ym. 1997). Mikään pääntautirokotteista ei anna täydellistä suojaa, mutta rokotteet

vähentävät sairastumisriskiä ja lieventävät oireita (Taylor & Wilson 2006).

Valmisteesta riippuen rokottamiskertoja tarvitaan aluksi kaksi tai kolme ja sen jälkeen rokote on tehostettava puolen vuoden välein tautisuojan ylläpitämiseksi (Taylor & Wilson 2006).

Turvotus ja lihaskipu injektikohdassa lihaksen sisäisesti annosteltavia rokotteita käytettäessä ei ole harvinaista (Taylor & Wilson 2006). Jos elävää rokotetta päätyy lihakseen virheellisen annostelun tai kontaminaation seurauksena, se voi aiheuttaa abskessin injektiokohtaan (Waller 2013, Taylor & Wilson 2006). Elävät rokotteet voivat aiheuttaa myös lieviä pääntaudin oireita, kuten sierainvuotoa ja imusolmukkeiden turvotusta (Taylor & Wilson 2006). Harvinaisena ja vakavana pääntautirokotteiden haittavaikutuksena esiintyy purpura hemorrhagigaa (Taylor & Wilson 2006). Purpura hemorrhagiga on liitetty sekä lihaksen sisäisesti käytettäviin antigeneita sisältäviin rokotteisiin kuin limakalvoille annosteltaviin eläviin rokotteisiin (Taylor & Wilson 2006). Hevosilla, joilla SeM-spesifiset vasta-ainetasot ovat korkeat, on kohonnut riski kehittää purpura hemorrhagiga eikä niitä pitäisi koskaan rokottaa (Whelchel & Chaffin 2009). Rokottaminen sekoittaa myös bakteeriviljelyyn, PCR-testiin ja serologiaan perustuvaa pääntautidiagnostiikkaa (Waller 2013). Osa rokotteista sisältää samoja geneettisiä komponentteja kuin virulentit *S. equi* -kannat, joten ne aiheuttavat virhepositiivisia PCR-tuloksia (Waller 2013). Elävät heikennetyt rokotteet voivat myös sekoittaa bakteeriviljelyn tulkintaa (Waller 2013). ELISA-testillä on hyvin vaikea erottaa, ovatko vasta-aineet peräisin luonnollisesta infektiosta vai rokottamisesta (Waller 2013).

Euroopassa on käytössä elävä heikennetty SeM-1-kantaan perustuva ylähuuleen annosteltava Equilis StrepE -rokote (MSD Animal Health) ja USA:ssa SeM-2-kantaan perustuva intranasalisesti annosteltava Pinnacle IN (Pfizer Animal Health) (Waller 2013). StrepE sisältää samoja geneettisiä komponentteja kuin virulentit *S. equi* -kannat, joten sen käyttö voi sekoittaa diagnostiikkaa aiheuttamalla positiivisia tuloksia bakteeriviljelyssä, PCR-testissä ja serologiassa (Waller 2013). Molempiin rokotteisiin on liitetty haittavaikutuksia, kuten lihaksen sisäiset paiset virheellisen annostelun tai kontaminaation seurauksena (Waller 2013). Rokotteiden teho on suunnilleen sama;

rokotetuista hevosista 10 – 20 prosenttia on sairastunut kokeellisen *S. equi* -altistuksen jälkeen (Waller 2013). Tutkimukset on tehty pienillä hevosmäärillä kahdesta kolmeen viikkoa tehosterokotteen jälkeen (Waller 2013).

Uusi rokote, Strangvac (Intervacc AB) on kehitetty SeM-9-kannasta ja perustuu kahdeksaan eri *S. equi* -antigeeniin (Waller 2013). Strangvac voidaan annostella lihaksen sisäisesti, ihon alaisesti tai sieraimiin eikä se häiritse bakteeriviljelyyn, PCR-testiin tai serologiaan perustuvaa diagnostiikkaa (Waller 2013).

5 DIAGNOSTIIKKA

5.1 Näytteet

Kuume, hengitystieoireet, pään ja kaulan imusolmukkeiden turpoaminen sekä abskessien muodostuminen ovat tyypillisiä kliinisiä oireita pääntaudissa (Sweeney ym. 2005). Kuitenkin myös muut bakteerit, kuten *S. zooepidemicus*, voivat aiheuttaa vastaavia oireita (Velineni & Timoney 2013). Siksi pääntaudin diagnosoiminen edellyttääkin *S. equi* -bakteerin osoittamista hevosesta käyttämällä bakteeriviljelyä, PCR-testiä tai molempia (Lindahl ym. 2013).

Viljelyä ja PCR-tutkimusta varten näytteitä voidaan ottaa pumpulitikulla sieraimista ja nenänielusta tai steriilillä natriumkloridiliuoksella huuhtelemalla nenänielusta tai ilmapusseista (Lindahl ym. 2013). Huuhtelemalla näytettä saadaan laajemmalta pinta-alalta verrattuna topsitikulla otettuihin näytteisiin, mikä parantaa menetelmän herkkyyttä (Sweeney ym. 2005). Näytteeksi voidaan ottaa myös abskessieritettä (Lindahl ym. 2013). Pääntautia sairastavien hevosten abskessieritenäytteistä 30 prosenttia on saanut positiivisen tuloksen viljelyssä ja 80 prosenttia PCR-testissä (Lindahl ym. 2013).

Riippumatta näytteenotto paikasta ja käytetystä tutkimusmenetelmästä kaikista kliinisesti oireilevista hevosista ei onnistuta osoittamaan *S. equi* -bakteeria (Lindahl ym. 2013). Mahdollisia syitä virheellisesti negatiivisiin tuloksiin ovat eritettävän bakteerin vähäinen määrä taudin vaiheesta johtuen tai väärin valittu näytteenottomenetelmä (Lindahl ym. 2013). Myös muiden bakteerien, erityisesti *S. zooepidemicus*, kasvu voi peittää etsittävän bakteerin (Lindahl ym. 2013).

Oireettomien pääntaudin kantajien tunnistaminen ja tautistatuksen seuraaminen edellyttävät näytteiden ottamista ilmapusseista (Lindahl ym. 2013). Oireettomilla kantajilla bakteeri on pesiytynyt ilmapusseihin ja bakteerieritystä on vain jaksottaisesti, joten hengitysteistä otetut näytteet ovat usein negatiivisia (Timoney 2004). Ainoa luotettava näytteenottomenetelmä näiden hevosten kohdalla on ilmapussien huuhtelu endoskopian yhteydessä (Timoney 2004).

Seeruminäytteistä voidaan mitata vasta-ainetiittereitä (Sweeney ym. 2005). Vaikka vasta-ainetasojen perusteella ei voida sanoa, onko hevosella tutkimushetkellä patogeenia elimistössä, serologia voi olla apuna pääntautidiagnoosin tekemisessä (Sweeney ym. 2005).

5.2 Bakteerin osoittaminen

5.2.1 Bakteeriviljely

Bakteeriviljely on perinteisin tapa diagnosoida pääntauti, mutta se kuitenkin häviää nopeudessa ja herkkyydessä PCR-menetelmille (Lindahl ym. 2013, Waller 2013). Näytteenotosta diagnoosiin pääsemiseen vaaditaan vähintään 48 tuntia (Waller 2013). Viljely tehdään valikoivalla elatusalustalla, minkä jälkeen biokemiallisia testejä hyödynnetään bakteerin tunnistamisessa (Waller 2013). *S. equi* -bakteerin kohdalla biokemialliset testit perustuvat bakteerin kyvyttömyyteen fermentoida trehaloosia, laktoosia ja sorbitolia, mikä erottaa sen *S. zooepidemicus* -bakteerista (Waller 2013). *S. equi* pesäkkeet ovat hunajan värisiä ja niillä on laaja hemolyysivyöhyke (Taylor & Wilson 2006). Virulenttien kantojen pesäkkeet ovat aina limaisia (Sweeney ym. 2005).

Muut beetahemolyttiset streptokokit, erityisesti *S. zooepidemicus*, voivat hankaloittaa viljelyiden tulkintaa (Sweeney ym. 2005). Viljelyn herkkyys on heikko, sillä parhaimmillaankin vain noin 63 prosenttia kliinisesti sairaista hevosista saavat positiivisen viljelytuloksen (Lindahl ym. 2013). Parhaaseen herkkyYTEEN on päästy kaikkien näytteenottopaikkojen yhdistämisellä (Lindahl ym. 2013). Käytettäessä vain yhtä näytteenottopaikkaa ja -menetelmää, pumpulitikkunäytettä sieraimesta tai nenänielusta tai huuhtelunäytettä nenänielusta, herkkyys on alle 40 prosenttia (Lindahl ym. 2013).

5.2.2 PCR

PCR, polymeerasiketjureaktio, on nopea menetelmä ja tulokset voidaan saada jo näytteenottopäivänä (Sweeney ym. 2005). Menetelmän heikkoutena on, ettei se erota eläviä ja kuolleita bakteerisoluja (Sweeney ym. 2005). Ilmapusseissa bakteerin DNA säilyy pitkään ja kuolleet solut voivat aiheuttaa virhepositiivisia tutkimustuloksia (Timoney 2004). Sen sijaan hengitysteissä limakalvojen puhdistusmekanismit poistavat bakteerimateriaalin nopeasti (Timoney 2004). PCR voidaan tehdä joko suoraan näytteestä tai bakteeriviljelmästä (Lindahl ym. 2013). *S. equi* -bakteerin osoittamisessa päästään yli 90 prosentin herkkyYTEEN, kun real time-PCR tehdään suoraan nenänielun huuhtelunäytteestä ja lisäksi joko bakteeriviljelystä tai nenänielusta tai sieraimesta otetusta pumpulitikkunäytteestä (Lindahl ym. 2013).

Kvantitatiivinen Triplex qPCR on kahta *S. equi* -bakteerille ominaista geeniä hyödyntävä protokolla, jonka herkkyys on 93,9 prosenttia ja spesifisyys 96,6 prosenttia (Webb ym. 2013). Testi voidaan suorittaa alle kahdessa tunnissa ja se tunnistaa pienempiä bakteerimääriä kuin viljely, vaikka näyte sisältäisi kontaminanttibakteereitakin (Webb ym. 2013).

5.3 Serologia

Useat *S. equi* -bakteerin proteiinit aiheuttavat seerumissa voimakasta vasta-aineiden tuotantoa infektion tai siitä toipumisen aikana (Sweeney ym. 2005). Epäsuora ELISA-testi (ID Vet) mittaa SeM-proteiinille spesifisten vasta-aineiden pitoisuutta (Sweeney ym. 2005). SeM-proteiinin samankaltaisuus *S. zooepidemicus* -bakteerin SzM-proteiinin kanssa aiheuttaa ristireagointia ja virhepositiivisia tuloksia (Waller 2013). Ristireagoivat vasta-aineet pystytään poistamaan inkuboimalla seerumia tapettujen *S. zooepidemicus* -bakteerien kanssa ennen varsinaista ELISA-testiä, mutta menetelmää ei hyödynnetä käytännössä (Waller 2013). SeM-proteiiniin perustuvan epäsuoran ELISA-testin (ID Vet) herkkyys on 89,9 prosenttia ja spesifisyys 77 prosenttia (Waller 2013). AHT:n (Animal Health Trust) kehittämä ELISA-testi perustuu kahteen *S. equi* -bakteerille spesifiseen antigeeniin, antigeeneihin A ja C (Knowles 2011). Testi tunnistaa antigeeneihin A ja C suunnatut IgG-molekyylit, joita muodostuu hevosen elimistössä pääntautitartunnan seurauksena (Knowles 2011, Ling ym. 2011). Kun bakteerille altistumisesta on alle puoli vuotta, AHT:n testin herkkyys on 93,3 prosenttia ja spesifisyys 88,0 prosenttia (Knowles 2011).

Serologialla voidaan selvittää altistumista *S. equi* -bakteerille, mutta ei sitä, onko hevosella infektio tutkimushetkellä (Sweeney ym. 2005). Serologiset testit eivät myöskään pysty erottamaan, ovatko vasta-aineet peräisin rokottamisesta vai infektiosta (Sweeney ym. 2005). Vasta-ainetiitterit ovat korkeimmillaan noin viisi viikkoa bakteerille altistumisen jälkeen ja pysyvät korkeina vähintään kuusi kuukautta (Sweeney ym. 2005). Rokottamisen jälkeen tiitterihuiput saavutetaan kahden viikon kuluttua ja ne pysyvät korkeina puolen vuoden ajan (Sweeney ym. 2005).

Serologiaa voidaan käyttää osana pääntautidiagnostiikkaa tai sen avulla voidaan selvittää rokottamisen tarvetta (Sweeney ym. 2005). Hevosia, joilla on korkeat vasta-ainetiitterit, ei saisi rokottaa pääntautia vastaan, koska niillä on kohonnut riski kehittää purpura hemorrhagica rokottamisen seurauksena (Sweeney ym. 2005). Testitulokset on negatiivinen silloin, kun hevosta ei ole rokotettu eikä se ole altistunut bakteerille tai altistumisesta on aikaa vähemmän kuin viikko (Sweeney ym. 2005). Kun altistumisesta

on kulunut vasta vähän aikaa, vasta-aineita ei ole ehditty vielä tuottaa suuria määriä ja tiitterilukemat ovat matalia, välillä 1:200 – 1:400 (Sweeney ym. 2005). Samanlaisia lukemia saadaan silloin, kun infektiosta on kulunut pitkä aika ja vain pieni osa vasta-aineista on jäljellä (Sweeney ym. 2005). Tiitterilukemat väliltä 1:800 – 1:1600 ovat tyypillisiä 2 -3 viikon kuluttua bakteerille altistumisesta tai kun infektiosta on kulunut puolesta vuodesta kahteen vuotta (Sweeney ym. 2005). Korkeita arvoja, 1:3200 – 1:6400, esiintyy 4 – 12 viikkoa bakteerille altistumisen jälkeen, 1 – 2 viikkoa lihaksen sisäisesti annetun rokotteen jälkeen sekä 2 – 4 viikkoa intranasaalisesti annetun rokotteen jälkeen (Sweeney ym. 2005). Hyvin korkeat tiitterit, yli 1:12 800, ovat tavallisia hevosilla, jotka sairastavat pääntaudin bastard-muotoa tai ovat kehittäneet purpura hemorrhagigan pääntaudin tai rokottamisen seurauksena (Sweeney ym. 2005).

6 PÄÄNTAUTI SUOMESSA – ALUSTAVA SEROPREVALENSSI

6.1. Aineisto

Tutkimukseen käytettiin hevosten pakastettuja seeruminäytteitä, jotka oli hankittu aiemmin tehtyjä lisensoitettuja tutkielmia varten. Näytteet oli pyritty keräämään eri puolilta Suomea siten, että näytteiden määrä oli suhteessa eri alueilla elävien hevosten määrään. Näytteenottoon liittyvistä käytännön syistä johtuen joiltakin alueilta saatiin kuitenkin suhteessa enemmän näytteitä kuin toisilta. Eri alueiden hevospääntauti selvitettiin alueellisten hevosjalostusliittojen rekistereistä. Suomessa on 16 alueellista Suomen Hippoksen alaista hevosjalostusliittoa, jotka tilastoivat hevosten lukumääriä omilla alueillaan. Suurin osa verinäytteistä oli kerätty eläinlääketieteen opiskelijoiden avulla vuosien 2012 – 2013 aikana Manner-Suomesta. Ahvenanmaalaisten hevosten verinäytteet olivat paikallisten eläinlääkärien tammi-maaliskuun 2015 aikana ottamia.

Pääntautivasta-aineet määritettiin kaikkiaan 305 hevosen seeruminäytteestä, mutta näytteiden huonon laadun vuoksi 119 näytettä jouduttiin sulkemaan pois analyysistä. Niinpä lopulliseksi otokseksi jäi 186 hevosen näytteet.

6.2 Menetelmät

6.2.1 Näytteiden käsittely

Hevosten verinäytteiden otto ja seerumin erotus tapahtui vuosien 2012 – 2013 aikana. Seeruminäytteet säilytettiin pakastimessa -20 asteessa. Näytteet analysoitiin keväällä 2015. Seeruminäytteet sulatettiin huoneen lämmössä ennen ELISA-testiä.

6.2.2 Näytteiden analysointi

Tutkimuksessa käytettiin epäsuoraa kvantitatiivista ELISA-testiä (ID Screen Streptococcus equi Indirect IDvet), joka on kaupallinen ja yleisesti kliinisessä käytössä. Testi suoritettiin valmistajan ohjeiden mukaan ja kuoppalevyjen OD-arvot luettiin 450 nm aallonpituudella Victor³ levylukijalla (Perkin Elmer, Boston, MA, USA).

6.2.3 Tilastollinen analyysi

Aineiston tilastollisen analyysin tekemisessä käytettiin SSPS-ohjelmaa (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.). Muuttujien välisiä yhteyksiä analysoitiin ristiintaulukoinnilla. Ristiintaulukoinnissa käytettiin Chi-Square -testiä ja Pearson Chi-Square p-arvoa. Merkitseviksi katsottiin p-arvot, jotka olivat $< 0,05$. 95 prosentin luottamusvälit frekvensseille laskettiin EpiTools-ohjelmalla (Sergeant, ESG, 2015. EpiTools epidemiological calculators. AusVet Animal Health Services and Australian Biosecurity Cooperative Research Centre for Emerging Infectious Disease) käyttäen Jeffreysin intervallia (Brown, LD, Cat, TT and DasGupta, A (2001). Interval Estimation for a proportion. *Statistical Science* 16: 101-133.)

6.3 Tulokset

6.3.1 Aineiston jakautuminen eri muuttujien suhteen

Seeruminäytteiden laatu vaihteli suuresti ja osa näytteistä (119 kpl) jouduttiin jättämään pois analyyseistä huonon laadun vuoksi. Näytteet jaettiin aistinvaraisen laadun perusteella kolmeen ryhmään: 1) näytteet, joissa ei muutoksia (99 kpl), 2) hemolyytiset näytteet (87 kpl) ja 3) veriset, pilaantuneet näytteet (119 kpl). SSPS-tilasto-ohjelmalla tehty ristiintaulukointi seerumin laadun ja ELISA-tuloksen välillä osoitti, että ryhmän 3 näytteiden sisällä prevalenssi oli matalampi ja erosi merkitsevästi ryhmien 1 ja 2 prevalensseista. Ryhmien 1 ja 2 näytteet olivat keskenään vertailukelpoisia. Pilaantuneiden näytteiden poistaminen ei olennaisesti muuttanut hevosten jakautumista eri muuttujien suhteen. Isompia eroja alkuperäisen ja lopullisen otoksen välillä hevosten jakautumisessa on vain käyttötarkoituksen osalta.

Taulukossa 1 on esitetty tutkittujen hevosten jakautuminen sukupuolen, rodun, iän, asuinalueen, käyttötarkoituksen ja seeruminäytteen laadun mukaan. Frekvenssit ja luottamusvälit on esitetty erikseen alkuperäiselle ja lopulliselle otokselle. Hevosten ikä vaihteli suuresti, mutta kaikki olivat vähintään yksivuotiaita. Vanhin tutkimukseen osallistunut hevonen oli 28-vuotias. Aineiston käsittelyä ja tilastollista analyysiä varten hevoset on jaettu kuuteen ryhmään aluehallintovirastojen mukaisesti. Pohjois-Suomen ja Lapin aluehallintovirastojen alueet on yhdistetty. Rodut on jaettu karkeasti neljään eri ryhmään.

Taulukko 1. Hevosten jakautuminen eri muuttujien osalta.

Muuttuja		pilaantuneet näytteet karsittu		kaikki näytteet	
		% (n)	Luottamusväli (95%)	% (n)	Luottamusväli (95%)
Sukupuoli	Tamma	50,5 (94)	43,4 – 57,7	53,4 (163)	47,8 – 59
	Ruuna	41,9(78)	35 – 49,1	39,7 (121)	34,3 – 45,2
	Ori	4,3 (8)	2,1 – 8	3,9 (12)	2,2 – 6,6
	Ei tiedossa	3,2 (6)	1,4 – 6,5	3 (9)	1,5 – 5,3
Rotu	Suomenhevonen	14,5 (27)	10 – 20,1	18,4 (56)	14,3 – 23
	Lämminveriravuri	15,1 (28)	10,5 – 20,7	15,7 (48)	12 – 20,1
	Poni	12,4 (23)	8,2 – 17,7	12,8 (39)	9,4 – 16,9
	Ratsu	24,7 (46)	19 – 31,3	27,9 (85)	23,1 – 33,1
	Ei tiedossa	33,3 (62)	26,9 – 40,3	25,2 (77)	20,6 – 30,3
Ikä	1 - 2 v.	3,8 (7)	1,7 – 7,2	3,6 (11)	1,9 – 6,2
	3 - 5 v.	12,4 (23)	8,2 – 17,7	14,1 (43)	10,5 – 18,3
	6 - 15 v.	57,5 (107)	50,4 – 64,5	56,4 (172)	50,8 – 61,9
	> 16 v.	23,1 (43)	17,5 – 29,6	22,6 (69)	18,2 – 27,6
	Ei tiedossa	3,2 (6)	1,4 – 6,5	3,3 (10)	1,7 – 5,7
Alue	Etelä-Suomi	27,4 (51)	21,4 – 34,1	29,8 (91)	24,9 – 35,1
	Itä-Suomi	16,1 (30)	11,4 – 21,9	11,1 (34)	8 – 15
	Lounais-Suomi	15,1 (28)	10,5 – 20,7	14,8 (45)	11,1 – 19,1
	Länsi-Suomi	18,3 (34)	13,2 – 24,3	23,9 (73)	19,4 – 29
	Pohjois-Suomi ja Lappi	11,3 (21)	7,3 – 16,4	12,1 (37)	8,8 – 16,1
	Ahvenanmaa	9,1 (17)	5,6 – 13,9	5,6 (17)	3,4 – 8,6
	Ei tiedossa	2,7 (5)	1 – 5,8	2,6 (8)	1,2 – 4,9
Käyttötarkoitus	Ravuri	8,1 (15)	4,8 – 12,6	13,1 (40)	9,7 – 17,2
	Ratsu	31,2 (58)	24,9 – 38,1	34,1 (104)	28,9 – 39,5
	Ratsastuskoulu	12,4 (23)	8,2 – 17,7	28,5 (87)	23,7 – 33,8
	Muu	31,7 (59)	25,4 – 38,7	12,1 (37)	8,8 – 16,1
	Ei tiedossa	16,7 (31)	11,8 – 22,5	12,1 (37)	8,8 – 16,1
Seerumin laatu	Hyvä	53,2 (99)	46,1 – 60,3	32,5 (99)	27,4 – 37,9
	Hemolyyttinen	46,8 (87)	39,7 – 53,9	28,5 (87)	23,7 – 33,8
	verinen	0 (0)	0 – 1,3	39 (119)	33,7 – 44,6

6.3.2 Seroprevalenssi

Alkuperäisen otoksen (305 näytettä) seroprevalenssiksi saatiin 43,6 prosenttia. Kun veriset seeruminäytteet (119 näytettä) hylättiin, lopulliseksi seroprevalenssiksi saatiin 52,2 prosenttia. Taulukossa 2 on esitetty lopullisen otoksen positiivisten ja negatiivisten näytteiden määrät ja osuudet luottamusväleineen.

Taulukko 2. Positiivisten ja negatiivisten näytteiden määrät ja osuudet ELISA-testissä.

Tulos	% (n)	Luottamusväli (95%)
Positiivinen	52,2 (97)	45 – 59,2
Negatiivinen	47,8 (89)	40,8 – 55

6.3.3 Assosiaatiot muuttujittain

Merkitseviä eroja seropositiivisuudessa esiintyi sukupuolen ja iän suhteen. Tammojen seeruminäytteissä vasta-aineita esiintyi kaikkein yleisimmin – noin 60 prosenttia tutkituista tammoista oli seropositiivisia. Ruunista melkein puolet olivat seropositiivisia, kun taas oriiden näytteistä vasta-aineita löytyi vain yhdeltä. Iän suhteen seropositiivisuus oli yleisintä keski-ikäisillä hevosilla. 6 – 15 vuotiaat hevoset oli ainoa ikäryhmä, jossa positiivisten näytteiden määrä oli suurempi kuin negatiivisten.

Alueellisesti seropositiivisia näyttäisi olevan eniten Länsi-Suomessa ja vähiten Ahvenanmaalla. Tässä tutkimuksessa hevosen asuinalueen vaikutus seropositiivisuuteen ei kuitenkaan ollut tilastollisesti merkitsevä p-arvon ollessa 0,066. Hevosen rodun ja käyttötarkoituksen suhteen erot eivät olleet merkitseviä. Positiivisten ja negatiivisten näytteiden jakautuminen eri muuttujien suhteen on esitetty taulukossa 3.

Taulukko 3. Positiivisten ja negatiivisten näytteiden jakautuminen muuttujittain.

Merkitsevät p-arvot (< 0,05) lihavoitu.

Muuttuja		Negatiivinen	Positiivinen	p-arvo
		% (n)	% (n)	
Sukupuoli	Tamma	41,6 (37)	58,8 (57)	0,031
	Ruuna	47,2 (42)	37,1 (36)	
	Ori	7,9 (7)	1,0 (1)	
	Ei tiedossa	3,4 (3)	3,1 (3)	
Rotu	Suomenhevonen	12,4 (11)	16,5 (16)	0,286
	Lämminveriravuri	16,9 (15)	13,4 (13)	
	Poni	15,7 (14)	9,3 (9)	
	Ratsu	19,1 (17)	29,9 (29)	
	Ei tiedossa	36 (32)	30,9 (30)	
Ikä	1 - 2 v.	5,6 (5)	2,1 (2)	0,039
	3 - 5 v.	16,9 (15)	8,2 (8)	
	6 - 15 v.	46,1 (41)	68 (66)	
	> 16 v.	28,1 (25)	18,6 (18)	
	Ei tiedossa	3,4 (3)	3,1 (3)	
Alue	Etelä-Suomi	28,1 (25)	26,8 (26)	0,066
	Itä-Suomi	13,5 (12)	18,6 (18)	
	Lounais-Suomi	19,1 (17)	11,3 (11)	
	Länsi-Suomi	12,4 (11)	23,7 (23)	
	Pohjois-Suomi ja Lappi	10,1 (9)	12,4 (12)	
	Ahvenanmaa	14,6 (13)	4,1 (4)	
	Ei tiedossa	2,2 (2)	3,1 (3)	
Käyttötarkoitus	Ravuri	10,1 (9)	6,2 (6)	0,591
	Ratsu	33,7 (30)	28,9 (28)	
	Ratsastuskoulu	11,2 (10)	13,4 (13)	
	Muu	27 (24)	36,1 (35)	
	Ei tiedossa	18 (16)	15,5 (15)	

7 POHDINTA

7.1 Näytteiden laatu

Tutkimuksessa käytettiin pakastettuja aiemmin kerättyjä seeruminäytteitä. Näytteiden laatu vaihteli suuresti – osa oli moitteettomassa kunnossa, mutta mukana oli myös hemolysoituneita ja jopa verisiä, punasoluja sisältäviä, näytteitä. Verisissä näytteissä oli havaittavissa myös pahaa hajua.

On todennäköistä, että punasoluja sisältävissä, pahanhajuisissa seeruminäytteissä oli alkanut tapahtua autolyysiä ja mikrobiologista pilaantumista. Proteolyysin seurauksena vasta-aineiden hajoaminen on mahdollista ja jopa todennäköistä. Vasta-aineiden hajoaminen selittäisi sen, että kaikista näytteistä koostuvan otoksen seroprevalenssi oli matalampi kuin otoksen, josta pilaantuneet näytteet oli poistettu.

Näytteiden huono laatu tuli ilmi vasta näytteiden analysointivaiheessa. Näytteiden huonon laadun syynä lienee virhe seerumin erotuksessa. Näytteitä jouduttiin hylkäämään tutkimuksesta huomattava määrä, 119 kpl, ja otoskoko pieneni 305 hevosesta 186:een. Tulosten luotettavuuden kannalta alkuperäisenkin otoskoko oli liian pieni. Epi-Tools-ohjelman mukaan otoskoko pitäisi olla yli 800 hevosta.

7.2 Assosiaatiot muuttujiin

Sukupuolten ja ikäryhmien välillä seropositiivisuudessa oli tilastollisesti merkitseviä eroja. Oriilta vasta-aineita löytyi paljon harvemmin kuin ruunilta ja tammoilta. Vain yksi kahdeksasta tutkitusta oriista oli seropositiivinen, kun taas tammoista 61 prosenttia ja ruunista 46 prosenttia olivat seropositiivisia. Oriiden huomattavasti alhaisempi seroprevalenssi selittyy todennäköisesti vähäisemmällä kontaktien määrällä. Oriit käyttäytyvät usein tammoja ja ruunia aggressiivisemmin, minkä takia ne usein tarhataan yksin ja saatetaan tallissakin sijoittaa muista erilleen. Samasta syystä niitä harvemmin

käytetään ratsastuskouluissa tuntihevosina. Keinosiemennyksen ansiosta oriit eivät ole kontaktissa tammoihinkaan.

Myös ikäryhmien välillä kontaktien määrä lienee tärkein tekijä eroihin. Ainoa ryhmä, jossa seropositiivisia oli enemmän kuin negatiivisia, oli keski-ikäiset, 6 – 15-vuotiaat hevoset. Keski-ikäiset hevoset ovat useimmin aktiivisesti käytössä ratsastuskouluissa tai kilpahevosina. Ratsastuskouluhevosilla merkittäviä kontakteja ovat vaihtuvat ratsastajat ja hoitajat, jotka usein käyvät muillakin talleilla. Ratsastuskoulutalleilla voi olla myös kilpahevosiä, jotka käyvät muilla talleilla kilpailemassa. Kilpahevosilla kontaktit liittyvät usein kilpailu- ja valmennusmatkoihin. Toisaalta tiedetään myös, että pääntaudille altistumisen jälkeen vasta-aineet säilyvät veressä yleensä useita vuosia. Keski-ikäisillä hevosilla on ollut nuorempiin hevosiin verrattuna enemmän aikaa altistua pääntaudille ja hankkia vasta-aineita.

Alueellisia eroja seropositiivisuuden suhteen analysoitaessa p-arvoksi saatiin 0,066 eli eroja ei voida pitää tilastollisesti merkitsevinä. Tilastollisen analyysin perusteella kuitenkin näyttäisi siltä, että Länsi-Suomessa seropositiivisuutta olisi keskimääräistä enemmän ja Ahvenanmaalla keskimääräistä vähemmän. Ahvenanmaan suhteen tilastollinen analyysi voi hyvinkin pitää paikkansa, koska maantieteellinen sijainti rajoittaa hevosten liikkumista. Lisäksi Ahvenanmaalta saadut seeruminäytteet olivat kaikki hyvälaatuisia eikä yhtään näytettä jouduttu sulkemaan pois tutkimuksesta.

Hevosen käyttötarkoituksella ja rodulla ei ollut vaikutusta seropositiivisuuteen. Tiedot poimittiin taulukoista, jotka oli koottu aiempiin lisenssiaatin tutkielmiin liittyvistä kyselylomakkeista. Alkuperäisen kyselylomakkeen muoto ei ole täysin selvillä, mutta ilmeisesti siinä oli käyttötarkoituksen suhteen tulkinnanvaraa. Siksi esimerkiksi ratsuksi on voitu ilmoittaa niin kilparatsu, harrasteratsu kuin ratsastuskouluhevonkin. Hevosen käyttötarkoitus vaikuttaa muun muassa kontaktien ja stressitekijöiden määrään, joten riittävän suurella otoskoolla ja hyvin suunnitellulla kyselylomakkeella tai haastattelulla toteutettava tutkimus voisi tuoda esille merkitseviä eroja.

7.3 Korkea seroprevalenssi

186 hevosta käsittäneessä tutkimuksessamme pääntaudin seroprevalenssiksi saatiin 52,2 prosenttia, mikä on varsin korkea luku. Vaikka pilaantuneet näytteet laskettaisiin mukaan, seroprevalenssi olisi edelleen 43,6 prosenttia. Etelä-Afrikassa 109 hevosella tehdyssä tutkimuksessa seroprevalenssiksi saatiin 10,1 prosenttia ja rajatapauksia oli 11 prosenttia (Ling ym. 2011). Irlannissa tehdyssä tutkimuksessa tulokset olivat hyvin saman suuntaisia – seropositiivisia 9,9 prosenttia ja rajatapauksia 10,5 prosenttia (Shirlow & Duggan 2015). Irlannin tutkimus käsitti 162 laukkahevosta, joista 83 oli siitostammoja ja 79 aktiivisessa valmennuksessa (Shirlow & Duggan 2015). Etelä-Afrikan ja Irlannin tutkimuksissa käytettiin AHT:n ELISA-testiä, joka perustuu kahteen *S.equi* -bakteerille spesifiseen antigeeniin (Ling ym. 2011, Shirlow & Duggan 2015), kun taas meidän tutkimuksessamme käytettiin SeM-proteiiniin perustuvaa ELISA-testiä (IDvet). AHT:n testi perustuu antigeeneihin A ja C, mutta valmistaja ei kerro, mitä kyseiset antigeenit ovat.

ELISA-testien spesifisyydet eroavat toisistaan – AHT:n testin spesifisyys on 88 prosenttia ja IDvet:n testin vain 77 prosenttia (Knowles 2011, Waller 2013). SeM-proteiiniin perustuvaa testiä käytettäessä ristireagointi vaikeuttaa tulosten tulkintaa (Ling ym. 2011). *S.zooepidemicus* -bakteerin SzM-proteiinin rakenne on niin lähellä SeM-proteiinia, että SzM-spesifiset vasta-ainemolekyylit aiheuttavat ELISA-testissä virhepositiivisia tuloksia (Robinson ym. 2013). Olisi mielenkiintoista nähdä, minkälaiseen seroprevalenssiin Suomessa päästäisiin käyttämällä AHT:n testiä. *S.zooepidemicus* -bakteerin aiheuttamat virhepositiiviset tulokset voitaisiin välttää myös siten, että ristireagoivat vasta-aineet poistettaisiin inkuboimalla seerumia tapettujen *S. zooepidemicus* -bakteerien kanssa ennen varsinaista ELISA-testiä (Waller 2013).

Irlannin ja Etelä-Afrikan tutkimukset erosivat meidän tutkimuksestamme myös siten, että niissä tutkittavat hevospopulaatiot olivat huomattavasti homogeenisemmät kuin meillä. Irlannissa kaikki hevoset olivat täysverisiä laukkahevosia, vaikkakin vain puolet oli aktiivisessa valmennuksessa. Etelä-Afrikassa tehdyssä tutkimuksessa hevosten rotua

ei ollut määritelty, mutta kaikkia tutkimukseen osallistuneita hevosia käytettiin jonkinlaiseen työntekoon. Meidän tutkimuksemme sen sijaan sisälsi hevosia laidasta laitaan niin käyttötarkoituksen kuin rodunkin osalta. Työ- ja kilpailukäyttö sulkee otannasta vain akuutisti sairast hevoset eikä siten selitä matalampaa prevalenssia, koska vasta-aineet säilyvät veressä pitkään. Kilpailukäyttö myös lisää kontaktien määrää, kun hevoset liikkuvat paikasta toiseen, jolloin riski bakteerille altistumiselle kasvaa.

7.4 Johtopäätökset

Tulokset viittaavat siihen, että päntautia esiintyy yleisesti Suomessa.

Tutkimuksessamme oli kuitenkin puutteita, joiden takia jatkotutkimukselle olisi tarvetta. Koska *S.zooepidemicus* -bakteeria esiintyy yleisesti hevosten limakalvoilla ja sen tiedetään vaikeuttavan tulosten tulkintaa käytettäessä SeM-proteiiniin perustuvaa ELISA-testiä, kannattaisi uusi tutkimus tehdä spesifisempää testiä käyttäen.

Tilastollisesti merkitseviä eroja seropositiivisuudessa ilmeni sukupuolen ja iän suhteen. Muiden assosiaatioiden löytäminen edellyttäisi jatkotutkimuksia suuremmalla ja tarkemmin suunnitellulla otannalla sekä esitietojen keräämistä paremmalla kyselykaavakkeella tai haastattelulla.

Jotta päntaudin esiintymisestä saataisiin tietoa, olisi tärkeää, että aina päntautia epäiltäessä otettaisiin näytteet bakteriologista määrittystä varten ja ilmoitettaisiin todetuista tautitapauksista Eviraan. Jotta virhenegatiivisilta tuloksilta vältyttäisiin, tulisi käyttää mahdollisimman herkkää näytteenotto- ja laboratoriomenetelmää.

8 KIRJALLISUUS

Galan JE, Timoney JF. Mucosal Nasopharyngeal Immune Responses of Horses to Protein Antigens of *Streptococcus equi*. *Infection and Immunity* 1985a, 47: 623-628.

Galan JE, Timoney JF. Immune complexes in purpura hemorrhagica of the horse contain IgA and M antigen of *Streptococcus equi*. *The Journal of Immunology* 1985b, 135.

Gyles CL, Prescott JF, Songer JG, Thoen CO. *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*, 4th Edition. 2010. Wiley-Blackwell.

Heather Z, Holden MTG, Steward KF, Parkhill J, Song L, Challis GL, Robinson C, Davis-Poynter N, Waller AS. A novel streptococcal integrative conjugative element involved in iron acquisition. *Molecular Microbiology* 2008. 70: 1274–1292.

Hobo S, Niwa H, Anzai T, Jones JH. Changes in Serum Antibody Levels after Vaccination for Strangles and after Intranasal Challenge with *Streptococcus equi* subsp. *equi* in Horses. *J. Equine Sci.* 2010, 21: 33-37.

Knowles EJ, Serological ELISA test for *Streptococcus equi* (strangles). AHT/BEVA/DEFRA Equine Quarterly Disease Surveillance Report 2011, 7: nro2.

Lindahl S, Båverud V, Egenvall A, Aspán A, Pringle J. Comparison of Sampling Sites and Laboratory Diagnostic Tests for *S. equi* subsp. *equi* in Horses from Confirmed Strangles Outbreaks. *J Vet Intern Med* 2013, 27: 542–547.

Ling ASG, Upjohn MM, Webb K, Waller AS, Verheyen KLP. Seroprevalence of *Streptococcus equi* in working horses in Lesotho. *Veterinary Record* 2011.

Mengyao L, Benfang L. IgG Endopeptidase SeMac does not Inhibit Opsonophagocytosis of *Streptococcus equi* Subspecies *equi* by Horse Polymorphonuclear Leukocytes. *The Open Microbiology Journal*, 2010, 4, 20-25.

Moloney E, Kavanagh KS, Buckley TC, Cooney JC. Lineages of *Streptococcus equi* ssp. *equi* in the Irish equine industry. *Irish Veterinary Journal* 2013, 66:10.

Newton JR, Wood JLN, Dunn KA, DeBrauwere MN, Chanter N. Naturally occurring persistent and asymptomatic infection of the guttural pouches of horses with *Streptococcus equi*. *Veterinary Record* 1997, 140, 84-90.

Paillot R, Robinson C, Steward K, Wright N, Jourdan T, Butcher N, Heather Z, Waller AS. Contribution of Each of Four Superantigens to *Streptococcus equi*-Induced Mitogenicity, Gamma Interferon Synthesis, and Immunity. *Infection And Immunity* 2010, 1728–1739.

Robinson C, Steward KF, Potts N, Barker C, Hammonda T, Pierce K, Gunnarsson E, Svansson V, Slater J, Newton JR, Waller AS. Combining two serological assays optimises sensitivity and specificity for the identification of *Streptococcus equi* subsp. *equi* exposure. *The Veterinary Journal* 2013, 197: 188-191.

Sheoran AS, Sponseller BT, Holmes MA, Timoney JF. Serum and mucosal antibody isotype responses to M-like protein (SeM) of *Streptococcus equi* in convalescent and vaccinated horses. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 1997, 59: 239-251.

Sumitomo T, Nakata M, Higashino M, Jin Y, Terao Y, Fujinaga Y, Kawabata S. Streptolysin S Contributes to Group A Streptococcal Translocation across an Epithelial Barrier. *The Journal of Biological Chemistry* 2011, 286: 2750–2761.

Sweeney CR, Timoney JF, Newton JR, Hines MT. *Streptococcus equi* Infections in Horses: Guidelines for Treatment, Control, and Prevention of Strangles. *J Vet Intern Med* 2005, 19: 123–134.

Taylor SD, Wilson WD. *Streptococcus equi* subsp. *equi* (Strangles) Infection. *Clinical Techniques in Equine Practice* 2006, 5:211-217.

Timoney J. The pathogenic equine streptococci. The pathogenic equine streptococci. *Veterinary Research* 2004, 35: 397-409.

Timoney JF, Kumar P. Early pathogenesis of equine *Streptococcus equi* infection (strangles). *Equine Veterinary Journal* 2008, 40: 637-642.

Timoney JF, Yang J, Liu J, Merant C. IdeE reduces the bactericidal activity of equine neutrophils for *Streptococcus equi*. *Veterinary Immunology and Immunopathology* 2008, 122: 76–82.

Timoney JF, Suther P, Velineni S, Artiushin SC. The Antiphagocytic Activity of SeM of *Streptococcus equi* Requires Capsule. *J. Equine Sci.* 2014, 25: 53-56.

Tiwari R, Qin A, Artiushin S, Timoney JF. Se18.9, an anti-phagocytic factor H binding protein of *Streptococcus equi*. *Veterinary Microbiology* 2007, 121: 105–115.

Velineni S, Timoney JF. Characterization and Protective Immunogenicity of the SzM Protein of *Streptococcus zooepidemicus* NC78 from a Clonal Outbreak of Equine Respiratory Disease. *Clinical and Vaccine Immunology* 2013, 20: 1181–1188.

Waller AS. Strangles: Taking steps towards eradication. *Veterinary Microbiology* 167 (2013) 50–60.

Waller AS, Robinson C. *Streptococcus zooepidemicus* and *Streptococcus equi* evolution: the role of CRISPRs. *Biochem. Soc. Trans.* (2013) 41, 1437–1443.

Waller AS, Paillot R, Timoney JF. *Streptococcus equi*: a pathogen restricted to one host. *Journal of Medical Microbiology* 2011, 60: 1231–1240.

Webb K, Barker C, Harrison T, Heather Z, Steward KF, Robinson C, Newton JR, Waller AS. Detection of *Streptococcus equi* subspecies *equi* using a triplex qPCR assay. *The Veterinary Journal* 2013, 195: 300–304.

Welch DD, Chaffin MK. Sequelae and complications of *Streptococcus equi* subspecies *equi* infections in the horse. Equine veterinary Education, 2009, 21: 135-141.

