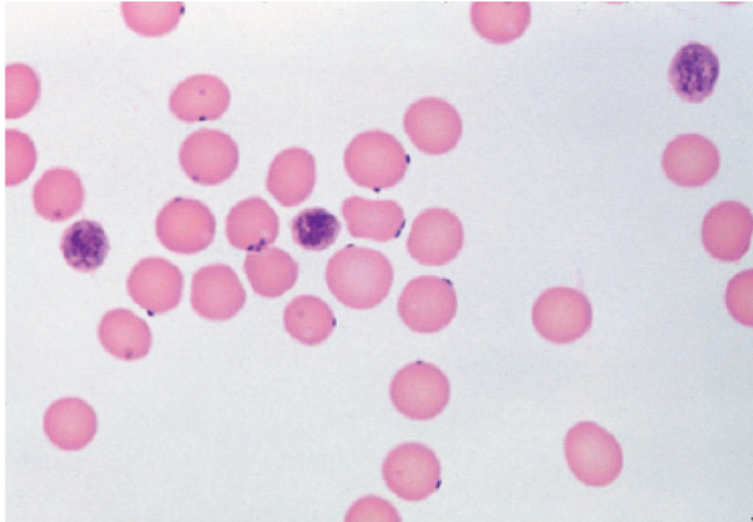


## Hovedopgave: Fagdyrlægeuddannelse for hund og kat 2007



### Prævalensundersøgelse af hæmoplasma hos katte i Svendborgområdet.

Analyse af risikofaktorer, hæmatokrit og hæmoglobinkoncentration i relation til hæmoplasmainfektionsstatus.



**Jens Jørgen Abildskov**  
Svendborg Dyrehospital  
Ryttervænget 6  
5700 Svendborg

## Indholdsfortegnelse:

Sammendrag:	2
Indledning:	3
Materialer og metode:	5
Resultater:	7
Diskussion :	12
Konklusion:	15
Tak	15
Litteraturliste	15

### Sammendrag:

I denne undersøgelse blev der undersøgt blodprøver fra 45 katte. Inklusionskriteret var at kattene kom til dyrlæge pga. en sygdom, der medførte, at kattene skulle have udtaget blodprøve i forbindelse med dyrlægeundersøgelsen.

Hæmoplasmainfektioner blev tidligere påvist ved cytologisk påvisning på blodudstrygning.

Hæmoplasma ses som små epierythrocytære parasitter på erythrocytternes overflade.

Tidligere blev agens betegnet hæmobartonella felis, og den blev beskrevet som årsag til felin infektiøs anæmi.

På grundlag af sekvensanalyser af DNA blev agens reklassificeret til en ny gruppe af mycoplasma. Disse mycoplasma blev pga. hæmotrofe egenskaber betegnet hæmoplasma. Der er påvist tre arter nemlig *Mycoplasma hæmofelis*, *Candidatus Mycoplasma hæmominutum* og *Candidatus Mycoplasma turicensis*.

Denne prævalensundersøgelse var baseret på kvantitativ real-time PCR. Dette er en hurtig, sensitiv og specifik diagnostisk metode.

I undersøgelsens stikprøve blev den samlede hæmoplasmaprævalens bestemt, samt prævalensen for hver af arterne. Der blev undersøgt om hæmoplasmareultatene kunne korreleres til kattenes køn og alder, samt til hæmatokritværdi og hæmoglobinmåling.

I denne undersøgelse blev der fundet en hæmoplasmaprævalens på 48,9 %. Den hyppigst påviste var *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*(46,7 %), derefter *Mycoplasma hæmofelis*(11,1 %) og *Candidatus Mycoplasma turicensis*(4,4 %).

I undersøgelsen havde hankatte ikke større forekomst af hæmoplasma end hunkatte, men forekomsten blandt katte på 7 år og derover var større end hos katte under 7 år.

Der er ikke fundet nogen statistisk forskel på hæmatokrit- og hæmoglobinresultaterne mellem infektionsgrupperne *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*, blandingsinfektion med *Candidatus Mycoplasma hæmominutum* og *Mycoplasma hæmofelis* samt den hæmoplasmanegative gruppe.

Der er ikke fundet sammenhæng mellem infektionsgraden og hæmatokritværdi eller hæmoglobinindholdet.

## Indledning:

I Sydafrika beskrev Clark i 1942 en eperythrozooninfektion hos en anæmisk kat for første gang. Agens fik navnet *Eperythrozoon felis*(1). I 1953 blev et lignende agens beskrevet i USA. Dette agens fik senere benævnelsen *hæmobartonella felis* (2). Dette agens blev betragtet som årsag til sygdommen, der benævntes felin infektiøs anæmi eller felin hæmobartonellose(3). Agens var klassificeret under ordnen *Rickettsiales*. Ved hjælp af PCR metoden blev der med sekvensanalyser af 16rRNA genet påvist tættere slægtskab med mycoplasmaarter. Dette fylogenetiske slægtskab medførte at agens nu klassificeres under slægten *Mycoplasma*. Agens tilhører en ny gruppe af mycoplasma, der parasitterer erythrocytter. Disse patogener egenskaber har ikke tidligere været kendt blandt mycoplasma. Disse hæmotrofe mycoplasma har fået fællesbetegnelsen hæmoplasma. Tidligere kendte man to stammer af *Hæmobartonella felis*. Den store form (Ohio stammen) har fået betegnelsen *Mycoplasma hæmofelis* (4;5). Den lille form (California stammen) har fået betegnelsen *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*, den er fylogenetisk tættere beslægtet med *Mycoplasma haemosuis* (91 %) end med *Mycoplasma hæmofelis*(83 % )(4;6). I 2005 blev der ved Real-time PCR identificeret en ny felin hæmoplasmaart kaldet *Candidatus Mycoplasma turicensis* hos en kat med hæmolytisk anæmi. Fylogenetisk undersøgelse viste, at agens var tættest beslægtet med to hæmotrofiske mycoplasmaarter fra gnavere (7).

Ved elektronmikroskopisk undersøgelser er det blevet vist, at hæmoplasma parasitterer på erythrocyternes overflade, og at de ikke penetrerer erythrocytterne. Størrelsen af hæmoplasma er 0,3 til 0,8µm.(3).

Patogenesen ved hæmoplasmainfektioner er, at der induceres anæmi dels ved hæmolyse og dels ved isolering af erythrocytter fra kredsløbet. Hæmolyse er en følge af den skade, der sker på erythrocyternes cellemembran ved tilhæftninger af hæmoplasma. Erythrocytmembranskade menes tillige at inducere produktion af antistoffer mod erythrocytterne. Den væsentligste hæmolyse sker ekstravaskulært i milt og lever. Hæmoplasmaangrebne erythrocytter kan isoleres i milten, hvor makrofager kan fjerne hæmoplasma fra erythrocyternes cellemembran. Pludselig frigivelse fra milten af disse isolerede erythrocytter kan forklare den hurtige stigning i hæmatokrit, der kan ses hos nogle katte. Isolering af erythrocytter fra blodkredsløbet kan have et cyklisk forløb, og resultere i pludselige stigninger eller fald i hæmatokrit (8;9).

Hæmoplasma kan ikke dyrkes, og serologiske tests har ikke været tilgængelige for praksis. Derfor var diagnostik tidligere udelukkende baseret på cytologisk påvisning af hæmoplasma på blodudstrygning. Hæmoplasma påvises på overfladen af erythrocytten, hvor de erkendes enkeltvis, i par eller i kæde ved alvorligere infektioner. Undtagelsesvis kan hæmoplasma påvises frit, hvis tilhæftningen til erythrocytten er mistet. Falske positive diagnoser kan forekomme på grund af farvepræcipitater og Howell-Jollylegemer. Falske negative diagnoser er et stort problem. Ved akut infektion kan der påvises mange hæmoplasma, men infektionsgraden kan falde meget hurtigt. Der kan således kun få timer senere påvises ganske få eller ingen hæmoplasma. Negativt fund ved cytologisk undersøgelse udelukker derfor ikke diagnosen hæmoplasmainfektion(2).

Sensitiviteten ved cytologisk undersøgelse blev sammenlignet med PCR i en nyere undersøgelse, her fandtes en påvisningsfrekvens på 37,5 % ved cytologi i forhold til 100 % ved en PCR metode (10). PCR analyser har vist, at hæmoplasmainfektioner er mere almindelige end tidligere kendt. Efter eksperimentel infektion var det muligt med PCR teknikken, at påvise en akut hæmoplasmainfektion, hvor hæmoplasma påvisningen toppede, efterfulgt af et kronisk bærerstadie. Ved PCR var det i modsætning til cytologi tillige muligt at skelne mellem *Mycoplasma haemofelis* (*Mhf.*), *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (*CMhm.*) og *Candidatus Mycoplasma turicensis* (*CMtr.*) (10-12).

Risikofaktorer for hæmoplasma har været undersøgt i flere PCR studier. Nogle undersøgelser har vist at hankatte havde større sandsynlighed for at blive inficeret med *CMhm* eller *Mhf.* Ældre katte, ikke racekatte og udekatte havde større risiko for *CMhm* infektion (13-15). Undersøgelse blandt vildkatte i USA viste, at FeLV-infektion var forbundet med forstørret risiko for samtidig infektion med *CMhm.* FIV-infektion var forbundet med forøget risiko for samtidig infektion med *CMhm* og *Mhf.* (13).

Katte af hankøn og katte med infektion med *CMhm* eller *Mhf* havde en øget risikoen for en *CMtr* infektion (16).

Smitteoverførelse af feline hæmoplasma med blodsugende arthropoder er i mange undersøgelser blevet anset, som en vigtig smittevej. Ved indsamling af flåter fra vegetationen blev *CMhm* påvist i to flåterarter (17;18).

Undersøgelser har vist at hæmoplasmainfektion (*CMhm/Mhf*) kunne findes både hos lopper og i blodet fra de katte, lopperne levede på (17;19). Det blev for *CMhm* og *Mhf* vist, at de kunne blive optaget af kattelopper *Ctenocephalides felis*, når kattelopper levede på eksperimentelt smittede katte. DNA fra begge disse hæmoplasmaarter blev påvist i loppefæces og loppeæg (20). Det blev ligeledes vist i en enkelt undersøgelse, at *Mhf* kunne overføres via lopper til en modtagelig kat (19). Ud fra resultater i andre undersøgelser blev det antaget, at kattebid var en vigtig smittevej (13). En undersøgelse viste, at det var vigtigt, at screene bloddonorer for at undgå smitte ved blodtransfusion (21).

De kliniske symptomer ved hæmoplasmainfektioner afhæng bl.a. af hæmoplasmaarten, og infektionsstadiet. Efter ophør af den akutte fase kunne der ved nogle katte ses et cyklisk forløb med periodisk reaktivering af infektionen (12).

Det var specielt graden af anæmi, der bestemte, hvor udtalte symptomer katten havde (8).

Ved feline infektiøs anæmi fandtes typisk en makrocytær, normokrom, regenerativ anæmi med en hæmatokrit under 20 %. Hæmatokrit lå ofte mellem 15-18 % (8;9).

Ved tilfælde hvor anæmi udvikles kunne der ses anorexi, depression, blege slimhinder, feber, tachycardi, tachypnoe og dehydrering. Feberen var intermitterende afhængig af parasitæmien. Splenomegali, mesenterial lymfadenopati og ikterus kunne eventuelt ses (10;12;22;23).

En undersøgelse af *Willi* et al. viste derimod at hæmoplasmainfektion ikke var associeret med anæmi, og at mængden af hæmoplasma i blodet ikke var korreleret med hæmatokritværdien (16). Dette var for *Mhf.* i direkte kontrast til tidligere undersøgelser (10;12;15).

Det blev foreslået, at akut infektion med *Mhf* kunne medføre alvorlig hæmolyse, når hæmoplasmamængden i blodet var højt, men at kronisk inficerede katte, der var kommet over den akutte sygdom, kunne mangle kliniske symptomer selv i tilfælde med meget høje mængder hæmoplasma i blodet. Infektion med *CMhm* eller *CMtr* alene gav normalt ikke alvorlig anæmi. Andre faktorer eller infektioner havde betydning for, om klinisk sygdom kunne udvikles(12;16;24).

Undersøgelser har vist, at katte, der var FeLV positive, havde større risiko for at blive inficeret med hæmoplasma. Katte der var FeLV positive blev mere syge og anæmiske ved infektion med hæmoplasma(25-27).

En tilstedeværende FeLV infektion eller blandingsinfektion med FeLV og FIV hos klinisk raske katte potenserede graden af anæmi ved en efterfølgende infektion med *CMhm* (24).

En tilstedeværende infektion med FIV havde ingen indflydelse på mængden af *CMhm* i blodet eller hæmatologiske forandringer efter infektion med *CMhm* (28).

Undersøgelser viste, at *CMhm* eller *CMtr* alene normalt ikke gav anledning til signifikant anæmi, og at andre faktorer spillede ind, for at sygdom kunne udvikles. *Willi* et al. antog ud fra at hæmoplasmaprævalensen og hæmoplasmainfektionsgraden var ens i en retrovirusinficeret (FeLV/FIV) gruppe og i en ikke retrovirusinficeret gruppe, at det ikke var retrovirusinfektionen alene, der var tilstrækkelig til at inducere kliniske symptomer ved hæmoplasmainfektionen, men at det var den retrovirusinducerede immunosuppression, der var grundlaget for, at *CMhm* og *CMtr* kunne udvikle anæmi (12;16;24).

Flere undersøgelser har vist, at real-time PCR var et vigtigt redskab til kvantitativt at monitorere hæmoplasmainfektioner under og efter behandlingen (29;30)

Der var dokumenteret effekt af behandling af katte med hæmoplasmainfektioner med doxycyclin 10 mg/kg/dag i 14 dage og enrofloxacin 5-10 mg/kg/dag i 14 dage. Begge antibiotika kunne reducere *Mhf* infektionen. Behandlingen kunne ofte medføre et kraftigt fald i infektionsgraden i løbet af en uge, men kattene vedblev med at være kroniske bærere og at være PCR positive(30;31). I et tilfælde blev det vist, at 6 ugers doxycyklinbehandling (5mg/kg/dag) kunne resultere i negativ PCR status både 91 og 425 dage efter præsentationen (29).

Formålet med undersøgelsen var at undersøge prævalensen for hæmoplasma samlet, samt for hver af arterne *Mhf*, *CMhm* og *CMtr* i blodprøver indsamlet fra katte i Svendborgområdet ved real-time PCR metoden. Desuden undersøges om resultaterne kunne korreleres til risikofaktorerne køn og alder, samt til hæmatokrit-og hæmoglobinresultater.

## Materialer og metode

### *Blodprøve og dataindsamling:*

Inklusionskriteret til denne undersøgelse var, katte der kom til dyrlæge pga. en sygdom, der medførte, at kattene skulle have udtaget blodprøve i forbindelse med dyrlægeundersøgelsen.

Blodprøver blev udtaget på Svendborg Dyrehospital i perioden nov. 2006 til feb. 2007. En del af den udtagne EDTA blodprøve blev anvendt i denne undersøgelse. Patientdataoplysninger blev indsamlet samtidig med udtagelse af blodprøven. For hver kat blev der indsamlet oplysninger om kattens race, alder, køn, levevis som kun indekat eller ude- og indekat.

For hver kat blev hæmatokrit og hæmoglobin bestemt ved en hæmatologisk undersøgelse i eget laboratorium( $\alpha$ ). Resten af EDTA blodprøven blev sendt til Langford Veterinary Diagnostics, Bristol, UK til real-time PCR.

Fra EDTA-blodprøverne blev DNA udvundet fra 100 $\mu$ l blod med Macherey-Nagel Nucleospin Blood kit ( $\beta$ ) efter producentens protokol og udvasket med 100 $\mu$ l eluerings buffer.

### *PCR analyse*

Real-time PCR blev lavet som en dobbeltprøve for hver hæmoplasmaart og kattens 28rDNA gen med Qiagen HotStarTaq Master Mix( $\gamma$ ) med 200nm sense og antisense primer, 100nm sonder, MgCl<sub>2</sub> til en slutkoncentration på 4,5mmol og 5 $\mu$ l af DNA i en samlet volumen på 25  $\mu$ l. Alle reagenterne blev blandet sammen som en master miks og delt ud på PCR plader ( $\delta$ ) før tilsætning af 5 $\mu$ l prøven.

Positiv (DNA fra en kendt inficeret kat) og negativ (vand) kontrolprøve var inkluderet i hver prøvekørsel. PCR undersøgelsen blev udført i en iCycler IQ ( $\epsilon$ ) med en initial inkubationstemperatur på 95 °C i 15 minutter. Derefter 45 cyklus på 95 °C i 10 sekunder og 60 °C i 30 sekunder i løbet af disse 45 cyklus blev fluorescens data registreret(32).

Måleenheden for de kvantitative PCR resultaterne angives i enheden CT.

CT er et mål for et antal cyklus. Næmlig det antal cyklus, hvor fluorescensen svarer til en forudindstillet værdi. Prøver med højt indhold af DNA skabeloner har lave CT værdier, modsat prøver med meget lavt indhold af DNA skabeloner har høje CT værdier. CT måles i enheder op til 45, som svarer til at PCR analysen har løbet i 45 cyklus og standses. Forskellen mellem to CT værdier svarer til forskellen i antal cyklus. En forskel på 3,3 i CT enheden svarer til en 10 folds forskel i DNA mængde. Ved prøveresultaterne CT 21 og CT 24, har den første ca. 10 gange højere mængde DNA end den sidste prøve. Udtrykket: 2 power delta CT, bruges til at beregne forskellen mellem resultater. Resultaterne blev lavet til diagnostisk brug, derfor blev det en relativ kvantificering. Der blev ikke lavet standardkurver for at få absolutte værdier (33).

( $\alpha$ ) QBC VetAutoReader(Kruuse).

( $\beta$ ) Macherey-Nagel Nucleospin Blood kit (ABgene,Epsom,United Kingdom)

( $\gamma$ ) Qiagen HotStarTaq Master Mix(Crawley,SB)

( $\delta$ ) PCR plader (Termofast, ABgene, Epsom, Surrey)

( $\epsilon$ ) iCycler IQ (Bio-Rad Laboratories Ltd, Hemel Hempstead, UK)

### *Statistik:*

Ud fra litteraturgennemgang blev den forventet prævalens sat til 15 %. Den estimerede stikprøvestørrelse blev herefter beregnet i Win Episcope til 45 katte(34).

Den samlede prævalens i stikprøven blev udregnet for hæmoplasmainfektioner. Prævalensen for hver af arterne *Mhf.*, *CMhm* og *CMtr* og for fundne dobbeltinfektioner i stikprøven, blev desuden beregnet i VassarStats.html. Prævalensen i populationen illustreres ved at udregne konfidensintervaller for de samme grupper(35).

### *Patientdata:*

For de kategoriske variable blev chi<sup>2</sup>test anvendt til udregning af P-værdi for at afgøre, om der var signifikant forskel i den samlede hæmoplasmaprævalens mellem grupperne. Der blev testet om grupperne hankatte og hunkatte var forskellige. Ud fra et ønske om at undersøge om ældre katte havde højere prævalens end yngre katte blev patientmaterialet delt ved syv år i to ca. lige store aldersgrupper. Der blev testet om alder på syv år eller derover var forskellig fra katte under syv år (36).

Desuden blev relativ risiko(RR) udregnet(37).

### *Hæmatologiske data:*

Kontinuerte værdier for hæmatokrit og hæmoglobin blev sammenlignet mellem relevante infektionsgrupper ved hjælp af GraphPad Prism 4, der med Kruskal-Wallis-analysetest (one-way ANOVA) kunne afklare, om der var signifikant forskel mellem gruppernes hæmatologiske resultater.

Der blev analyseret med en lineær regressions analyse om der var sammenhæng mellem de kontinuerte variable hæmatokritresultater og kvantitative PCR resultater, målt med CT enheder. Samme analyse blev udført for hæmoglobinresultaterne. Korrelationen blev analyseret med "two tailed Spearman rank" korrelationstest (r)(38).

Signifikansniveauet i alle test blev sat til 0,05.

## **Resultater:**

Samlet oversigt over data fra undersøgelsen findes i tabel 1.

Kat nr. 1, 4 og 17 udgår pga. manglende hæmatologisk analyseresultater.

**Table 1: Samlet resultatoversigt over PCR analyse for *Mycoplasma hæmofelis*(Mhf), *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*(CMhm) og *Candidatus Mycoplasma turisensis*(CMtr), køn, alder, hæmatokrit (Hkt), hæmoglobin (Hgb) og kontaktårsag/diagnose.**

Kat nr.	Mhf-CT	CMhm-CT	CMtr-CT	Køn	Alder (år)	Hkt (%)	Hgb (g/dl)	Kontaktårsag Diagnose
1				♀	1	Udgår		Gastroenteritis
2			42,5	♀	7	21,6	7	Byld
3	24,0	22,8		♀	7	27,4	8,9	Tandsten
4				♀	13	Udgår		Byld
5		34,4		♂	9	21,2	6,9	Stomatitis, cystitis
6	40,7	24,8		♂	11	35,0	11,3	Tandsten, stomatitis
7	21,4	26,4		♂	11	19,1	6,1	Obs. Nefrose
8		27,4	40,9	♂	13	43,3	13,2	Tandsten, stomatitis
9				♀	2	29,9	9,6	Byld
10	25,0	22,6		♂	12	25,0	7,9	Byld
11		30,5		♂	16	19,2	6,2	Pelsproblem
12		27,8		♂	10	28,7	9,3	Cystitis
13				♀	12	29,1	9,3	Loppeallergi
14				♂	½	18,9	5,8	Luftvejsinfektion
15				♀	1	39,6	11,7	Gastroenteritis
16				♀	½	34,5	10,7	Byld
17		24,4		♂	2	Udgår		Tandbyld
18	23,3	27,9		♂	8	24,5	7,9	Crusiatum ruptur
19		41,0		♀	10	21,7	6,9	FUS
20				♂	2	21,1	6,5	Byld
21		33,6		♀	4	24,2	7,9	Byld
22				♀	10	36,3	11,5	Obs. Leverlidelse
23				♂	10	29,1	9,5	Arthrose
24				♀	5	29,1	9,5	Sårinfektion
25		25,7		♂	2	17,9	5,9	Fraktur af tænder
26		25,1		♂	7	33,4	10,8	Byld
27				♂	11	23,3	7,3	Stomatitis
28				♀	½	36,6	11,5	Influenza, conjunktivitis
29				♂	1	30,6	9,2	Byld
30		27,3		♂	3	29,9	10,0	Byld
31		22,7		♂	3	28,9	9,4	Byld
32				♀	2	41,2	13,3	Eksem
33		21,0		♀	2	31,8	10,2	Hudinfektion
34		26,4		♀	3	21,9	7,2	Tumor
35				♂	13	32,9	10,3	Diarre, byld
36				♀	7	42,1	13,7	Cyste i øre
37				♂	8	38,7	12,3	Diarre
38				♂	3	27,0	8,6	Påkørt
39		27,7		♂	12	39,8	12,0	Hyperthyreodisme
40				♀	½	32,4	10,4	Diarre
41		23,1		♀	8	32,7	11,1	Diarre
42				♂	2	31,8	9,9	Byld
43				♀	1	22,4	6,6	Diarre
44				♀	5	36,3	11,4	CNS symptomer
45				♂	1	39,1	12,9	Cystitis, gingivitis
46				♂	3	28,5	9,1	Conjunktivitis
47		27,8		♂	1	31,7	9,9	Arthritis, byld
48		29,4		♀	7	36,0	11,9	Influenza, conjunktivitis



### **Hæmoplasmaprævalens: real-time PCR reaktion**

Der blev undersøgt 45 blodprøver ved real-time PCR. Ud fra de kliniske symptomer var der ikke mistanke om hæmoplasmainfektion hos en eneste af kattene.

Der blev fundet 22 (48,9 %) blodprøver positive for hæmoplasma. For hver af hæmoplasmaarterne blev følgende blodprøveresultater fundet: 21 (46,7 %) var positiv for CMhm, 5 (11,1 %) var positiv for Mhf og 2 (4,4 %) var positiv for CMtr, se tabel 2.

Tabel 2: Hæmoplasmaprævalens i stikprøven samlet og grupperet efter hæmoplasmaart(35).

	Antal katte	Prævalens	95 % KI
Hæmoplasma total	22	48,9 %	33,94 – 64,02
<i>Candidatus Mycoplasma hæmominutum</i> i alt	21	46,7 %	31,94 – 61,97
<i>Mycoplasma hæmofelis</i> i alt	5	11,1 %	4,14 – 24,85
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i> i alt	2	4,4 %	0,77 – 16,36

Den samlede hæmoplasmaprævalens på 48,9 % har brede konfidensintervaller [33,94-64,02] på resultaterne. Det viser, at undersøgelsens stikprøvestørrelse var for lille.

I undersøgelsen var flere af kattene inficerede med to hæmoplasmaarter. Fordelingen mellem katte inficeret med kun en hæmoplasmaart og katte inficeret med to hæmoplasmaarter fremgår af tabel 3.

Tabel 3: Hæmoplasmaprævalens i stikprøven grupperet efter om de var inficeret med en eller to hæmoplasmaarter (35).

	Antal katte	Prævalens	95 % KI
<i>Candidatus Mycoplasma hæmominutum</i>	15	33,33 %	20,44 – 49,05
<i>Mycoplasma hæmofelis</i>	0		
<i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	1	2,22 %	0,12 – 13,23
<i>Candidatus Mycoplasma hæmominutum</i> og <i>Mycoplasma hæmofelis</i>	5	11,10 %	4,16 – 24,85
<i>Candidatus Mycoplasma hæmominutum</i> og <i>Candidatus Mycoplasma turicensis</i>	1	2,22 %	0,12 – 13,23

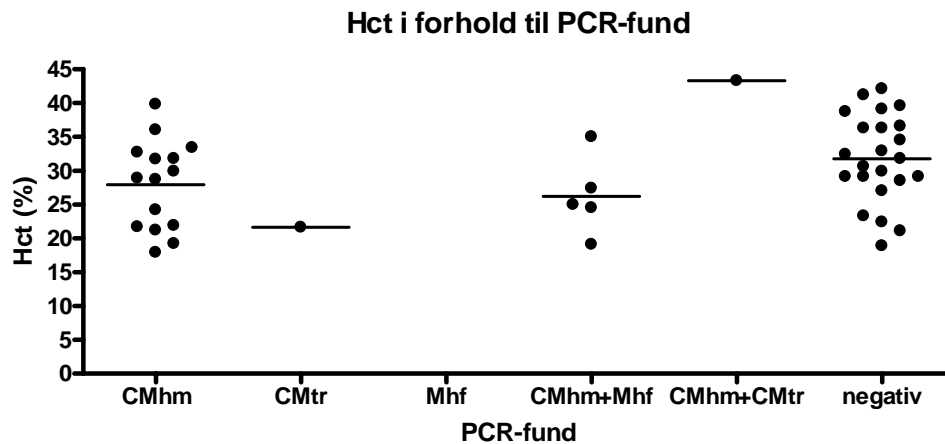
Af de tidligere kendte risikofaktorer var der i undersøgelsen kun undersøgt for køn og alder, da alle kattene i stikprøven var ikke racerene huskatte og havde en levevis som helt eller delvis udekatte. Hankatte havde i denne undersøgelse ikke større risiko for at erhverve hæmoplasmainfektioner, end hunkatte havde. Der var ikke statistisk signifikant forskel i prævalensen mellem hankatte og hunkatte (P= 0,879).

Katte på syv år eller derover havde større prævalens af hæmoplasmainfektioner end katte under syv år. Med en sikkerhed på P= 0,025 var der statistisk signifikant forskel i prævalensen blandt aldersgrupperne.

Prævalensen blandt katte på syv år eller derover var 68 %. Prævalensen blandt katte yngre end syv år på var 32 %. Den relative risiko for at være smittet for katte på syv år eller derover var 2,24. Da effekten af alder på syv år eller derover var signifikant, blev andre risikofaktorer gennemgået. Af mulige confounding faktorer findes race og levevis, men da alle katte var huskatte og udekatte, blev der ikke stratificeret.

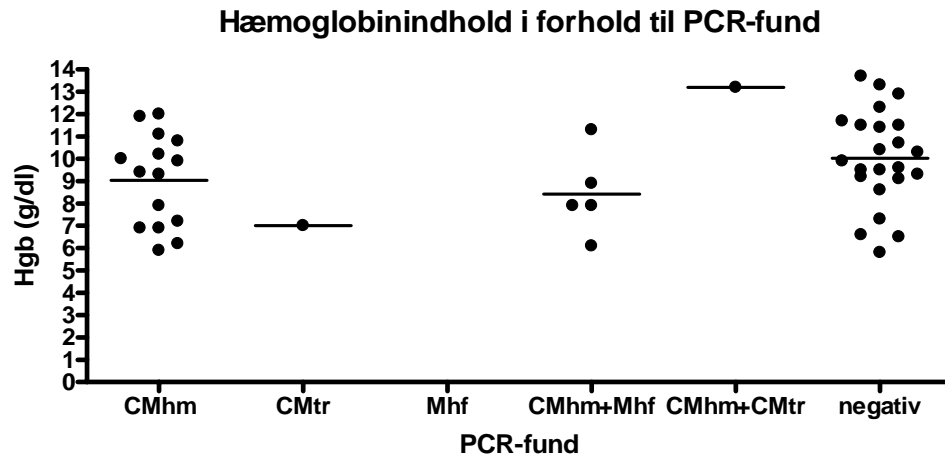
Hæmoplasmainfektionerne blev samlet gruppevis afhængig af hvilken hæmoplasmaart de var inficeret med, samt om de kun var inficeret med en hæmoplasmaart eller de var inficeret med to hæmoplasmaarter.

Af figur 1 fremgår hæmatokritresultaterne angivet for hver af disse infektionsgrupper(38).



Figur 1: Diagram, der viser hæmatokrit (Hct) grupperet for hver hæmoplasma-  
art og for dobbeltinfektioner. Hvert punkt angiver et måleresultat. Median  
angivet med en streg. Hct resultaterne af *Candidatus Mycoplasma*  
*hæmominutum*(CMhm), *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*(CMhm) og  
*Mycoplasma hæmofelis* (Mhf), samt hæmoplasma negativ gruppe adskiller  
sig ikke signifikant( $P=0,1117$ )(38).

Af figur 2 fremgår hæmoglobinresultaterne angivet for hver af infektionsgrupperne(38).

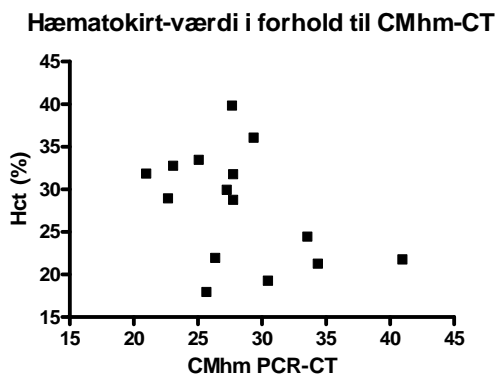


Figur 2:

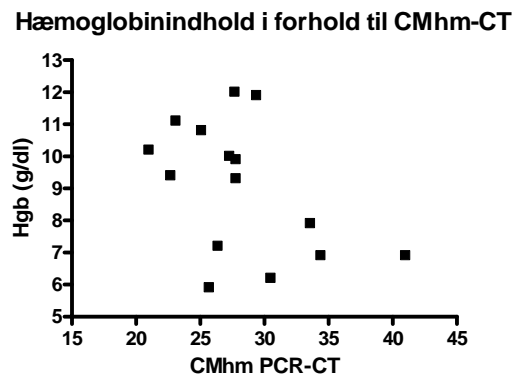
Diagram, der viser hæmoglobinindhold(Hgb) i g/dl grupperet for hver hæmoplasmaart og for dobbeltinfektioner. Hvert punkt angiver et måleresultat. Median angivet med en streg. Hæmoglobinresultaterne for *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*(CMhm), *Candidatus Mycoplasma hæmominutum*(CMhm) og *Mycoplasma hæmofelis* (Mhf), samt hæmoplasma negativ gruppe adskiller sig ikke signifikant( $P=0,1992$ )(38).

Der blev ikke fundet nogen statistisk forskel på resultaterne af hæmatokrit- og hæmoglobinresultaterne mellem infektionsgrupperne: Alene CMhm inficeret gruppe, CMhm og Mhf inficeret gruppe, og den hæmoplasma negative gruppe. Der var ingen katte, der kun var inficeret med Mhf. Der var kun en kat, der alene var inficeret med CMtr og kun en, der var inficeret med både CMtr og CMhm. Da der enten ingen eller kun en enkelt kat var for disse tre infektionsgrupper blev disse ikke testet.

Der blev undersøgt, om der var sammenhæng mellem hæmoplasmainfektionens sværhedsgrad og de hæmatologiske resultater for hæmatokrit og hæmoglobin. Som ovenfor beskrevet var der i infektionsgrupperne Mhf ingen og i CMtr kun en enkelt måling. I infektionsgrupper, der var inficeret med to hæmoplasmaarter var det ikke muligt at skelne den ene arts betydning i forhold til den anden art. Analyse for sammenhæng mellem infektionens sværhedsgrad udtrykt ved CT værdien og hæmatokrit og hæmoglobin blev derfor kun udført for CMhm. Resultaterne er vist i fig.3 og fig.4.



Figur 3: korrelation mellem hæmatokrit (Hct) i % på y-aksen i forhold til CMhm mængden på x-aksen angivet som CT tallet(38).



Figur 4: Korrelation mellem hæmoglobin (Hgb) i g/dl på y-aksen i forhold til CMhm mængden på x-aksen angivet som CT tallet (38).

Umiddelbart ser der ikke ud til at være sammenhæng mellem CT – værdien og henholdsvis hæmatokritværdi eller hæmoglobinindholdet.

Ved Spearman-korrelationsanalyse af PCR-CT i forhold til hæmatokritværdi henholdsvis hæmoglobinindhold (g/dl) blev der ikke fundet signifikant sammenhæng, se tabel 4.

Tabel 4: Korrelationen mellem CT-tallet for *Candidatus Mycoplasma haemominutum* (CMhm) og hæmatokritværdi og hæmoglobinindhold (g/dl). Spearman-korrelationstest. Der er ingen signifikant sammenhæng mellem CT og hæmatokritværdien eller hæmoglobinindholdet ( $P > 0,05$ )

	N	Spearman r	P
<b>Hkt (%)</b>			
CMhm	15	-0,3843	0,1573
<b>Hgb (g/dl)</b>			
CMhm	15	-0,3989	0,1408

## Diskussion:

Dette er den første danske prævalensundersøgelse af hæmoplasmainfektion hos katte baseret på PCR diagnostik. Undersøgelsen viser, at alle tre hæmoplasmaarter, der er isoleret fra katte, findes i Danmark. I studiet findes prævalensen af hæmoplasmaarterne *Mhf*, *CMhm* og *CMtr* i en stikprøve i Danmark. Katteblodprøverne er analyseret med en sensitiv og specifik kvantitativ real-time PCR-undersøgelse (7;39).

Den samlede hæmoplasmaprævalens på 48,9 % i denne undersøgelse, viser generelt højere prævalenser af *CMhm* og *Mhf* end tidligere udenlandske undersøgelser har vist, se Tabel 5(13-15;23;40;41).

**Tabel 5:** Resultater fra nogle prævalensundersøgelser baseret på PCR teknik(13-15;23;40;41).

Resultater fra tidligere Hæmoplasma prævalensundersøgelser PCR studier	UK studie (14;41)	USA studie (23)	USA studie (13)	Australien studie (15;41)	Sydafrika Studie (40;41)
	426 huskate mistanke + kontrolgruppe	220 huskate mistanke + kontrolgruppe	484 vildkate	147 huskate forskellige sygdomme	78 huskate forskellige sygdomme
<i>Mycoplasma hæmofelis</i> alene % positive	1,4	4,5	4,3	4,1	6,4
<i>Cand. M. hæmominutum</i> alene % positive	16,9	12,7	8,3	23,1	32,1
Både <i>Mycoplasma hæmofelis</i> og <i>C.M.hæmominutum</i> % positive	0,2	2,3	3,9	0,7	6,4

Resultater for efterfølgende us. for <i>C. M. turicensis</i> (41)					
<i>Cand. M. turicensis</i> alene, % positive	2,3			10,1	13,0*
Både <i>C. M. hæmominutum</i> og <i>C.M. turicensis</i> , % positive	1,4			5,4	13,0*

\* I undersøgelsen af de sydafrikanske katteblodprøver indgik kun blod fra 69 katte.

Tidligere undersøgelser har vist en prævalens for infektion alene med *Mhf.* på 1,5-6,4 % (14;15;40). I denne stikprøve fandtes slet ingen infektioner alene med *Mhf.*

Der var derimod relativt mange, der var inficeret med både *Mhf.* og *CMhm*. Undersøgelsen fandt en prævalens på 11,1 %, hvor andre undersøgelser viser en prævalens mellem 0,2 – 6,4 % (14;15;40). Det var kun en prævalensundersøgelse fra Sydafrika, der havde en tilsvarende høj samlet prævalens på 12,8 % for *Mhf.* (40).

Den fundne prævalens på 33 % for infektioner alene med *CMhm* er også høj i forhold til tidligere undersøgelser, der viser en prævalens på 8,3 – 32,1 %. For den samlede prævalens af *CMhm* på 46,9 % er det igen kun den sydafrikanske prævalensundersøgelse(38,5 %), der opnåede en prævalens, der nærmede sig samme niveau (14;15;40).

I denne undersøgelse blev der fundet en samlet prævalens på 4,4 % for *CMtr* mod tidligere undersøgelser, der viste en prævalens på 3,7 – 26,0 % (41).

Denne undersøgelse viser at *CMhm* var den hyppigste hæmoplasmaart i Danmark, dette svarer til tidligere undersøgelser fra udlandet(14;15;23).

Dette studie viser, at infektion med to hæmoplasmaarter er hyppigt forekommende.

Det tyder på, at der ikke findes krydsimmunitet mellem hæmoplasmaarterne. Tidligere undersøgelser tyder også på, at der ikke findes krydsimmunitet mellem *Mhf* og *CMhm*(10). Der er i 2006 publiceret en undersøgelse, der dokumenter, at to katte samtidig er inficeret med alle tre hæmoplasmaarter(41). Det kunne være en følge af, at hæmoplasmaarterne har samme smitteveje, samt at risikofaktorerne for smitte for alle tre arter er de samme.

Dette studie er udført på blodprøver af katte, der i forvejen skulle have udtaget blodprøve i forbindelse med dyrlægeundersøgelsen. Ønsker man den rette prævalens i populationen, skal stikprøven være repræsentativt, og kattene skal udvælges tilfældigt. Sikkerheden i denne prævalensundersøgelse kunne ønskes højere. Det viste sig, at stikprøven var for lille, da prævalensen af hæmoplasma var væsentlig højere end forventet.

Direkte sammenligning mellem fundne prævalenser og prævalenser i tidligere undersøgelser har kun begrænset værdi, da der er forskel på de populationer, der indgik i undersøgelserne. Prævalensundersøgelser fra England, Australien og USA blev udført på blodprøver fra katte, hvor der for en del af kattene var mistanke om en hæmoplasmainfektion (14;15;23). I den Sydafrikanske undersøgelse indgik blodprøver fra praktiserende dyrlæger, hvor kattene alle havde fået stillet diagnosen hæmoplasmainfektion cytologisk (40).

Prævalensundersøgelses resultater er også afhæng af, om der er brugt cytologisk undersøgelse, konventionel PCR eller real-time PCR til diagnostik.

En randomiseret undersøgelse er svær at opnå under praksisforhold.

Denne undersøgelse viser, at hæmoplasmainfektioner under praksisforhold er hyppigt forekommende blandt katte, og at de absolut bør indgå i ens diagnostiske overvejelser.

Tidligere undersøgelser har vist at en højere alder, hankøn og lavere Hkt. udgjorde risikofaktorer for hæmoplasma (13-15).

Der er i denne undersøgelse ikke fundet større risiko for hæmoplasma blandt hankatte end hos hunkatte. Nogle undersøgelser har vist, at der ikke er nogen kønsdisponering, mens andre modsætningsvis har vist, at hankatte havde en større risiko (13).

Denne undersøgelse viste, at forekomsten blandt katte på syv år eller ældre er højere end blandt katte yngre end syv år. Flere undersøgelser har vist, at når katte var blevet inficeret med hæmoplasma, vedblev de med at være inficeret (10;12). Tasker et al. har vist en stigende odds ratio for CMhm med stigende alder. Dette tolkes som en kumulativ risiko for eksponering til hæmoplasma med stigende alder(14).

I denne undersøgelse fandtes ikke nogen forskel på hæmatokrit- og hæmoglobinindholdet i blodet på kattene, om de kun var inficeret med CMhm, var inficeret med både CMhm og *Mhf*, eller om de var hæmoplasmanegative. En undersøgelse fra 2006 viste ligeledes, at hæmoplasmainfektioner ikke havde sammenhæng med anæmi (16). Disse resultater var dog i modsætning til lidt ældre eksperimentelle undersøgelser, der viste at specielt *Mhf* kunne give anæmi (10;12;15). Mange studier har ikke fundet hæmatologiske forandringer ved CMhm, men enkelte har dokumenteret en mild til moderat forbigående anæmi. Dette kunne være et udtryk for at CMhm under visse omstændigheder kan resultere i anæmi (10;12;15;24)

I denne undersøgelse blev der ikke fundet korrelation mellem infektionens sværhedsgrad målt i CT værdi for CMhm og hæmatokritværdi henholdsvis hæmoglobinindhold (g/dl). Flere tidligere undersøgelser har ikke kunnet vise nogen korrelation. En undersøgelse kunne dog undtagelsesvis påvise en korrelation mellem hæmatokrit og mængden af *Mhf* DNA (15;16). Dette har ført til en hypotese om, at katte med højt indhold af DNA skabelon i blodet ved akut infektion med *Mhf* kan udvikle alvorlig hæmolyse, men at kronisk inficerede katte, der er kommet over den akutte sygdom, kan mangle kliniske symptomer selv under tilstedeværelse af højt indhold af DNA skabelon i blodet(16).

Det kunne være interessant at få afklaret, om de kliniske tilfælde af hæmoplasmainfektioner, der diagnosticeres, er katte i den akutte fase af infektionen. Dette er måske nok hyppigst tilfældet for *Mhf*. Meget tyder på, at den overvejende del af hæmoplasmainfektioner, der giver kliniske symptomer, er forårsaget af *Mhf*. Der er muligvis kun *Mhf*, der kan fungere som en primær patogen ved hæmoplasmainfektioner.

Mens andre tilfælde af hæmoplasmainfektioner med kliniske symptomer snarere er en følge af suppression af det humerale- eller cellulæreimmunsystem, hvor hæmoplasmainfektionen snarere er et sekundært problem. Dette er nok hyppigst tilfældet, når CMhm eller CMtr påvises i forbindelse med kliniske tilfælde af hæmoplasmainfektioner.

Da positive PCR resultater ofte findes ved asymptomatiske katte, skal betydningen af positiv PCR-resultat altid sammenholdes med kliniske symptomer og hæmatologiske fund og evt. tilstedeværelse af anden samtidig sygdom eller infektion.

## **Konklusion:**

Undersøgelsen viser, at de tre hæmoplasmaarter *Mhf*, CMhm og CMtr, der er isoleret fra katte, findes i Danmark.

Denne undersøgelse viser, at CMhm er den hyppigste hæmoplasmaart i Danmark, samt at infektion med to hæmoplasmaarter er hyppigt forekommende.

I denne undersøgelse er forekomsten blandt katte på syv år og ældre højere end hos katte yngre end syv år. Der fandtes ikke nogen forskel på hæmatokrit- og hæmoglobinindholdet i blodet på kattene, om de kun var inficeret med CMhm, var inficeret med både CMhm og *Mhf*, eller om de var hæmoplasmanegative.

Denne undersøgelse viser, at hæmoplasmainfektioner under praksisforhold er hyppigt forekommende blandt katte.

## **Tak:**

Tak til laboratoriet Langford Veterinary Diagnostics, Bristol for økonomisk hjælp, samt til Severine Tasker, Bristol.

## **Litteratur liste:**

### Reference List

1. Clark R. *Eperythrozoon felis* (sp. Nov) in a cat. *Journal of the South African Veterinary Medical Association* 1942;**13**:15-16.
2. Tasker SLMR. *Haemobartonella felis*: recent developments in diagnosis and treatment. *Journal of Feline Medicine and Surgery* 2002;**4**:3-11.
3. Sykes JE. Feline hemotropic mycoplasmosis (feline hemobartonellosis). *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003 January 1;**33**(4):773-789.

4. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of 'Candidatus *Mycoplasma haemofelis*', 'Candidatus *Mycoplasma haemomuris*', 'Candidatus *Mycoplasma haemosuis*' and 'Candidatus *Mycoplasma wenyonii*'. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001 May;**51**(Pt 3):891-899.
5. Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int J Syst Evol Microbiol* 2002 March;**52**(Pt 2):683.
6. Berent LM, Messick JB. Physical map and genome sequencing survey of *Mycoplasma haemofelis* (*Haemobartonella felis*). *Infect Immun* 2003 June;**71**(6):3657-3662.
7. Willi B, Boretti FS, Cattori V, Tasker S, Meli ML, Reusch C et al. Identification, molecular characterization, and experimental transmission of a new hemoplasma isolate from a cat with hemolytic anemia in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2005 June;**43**(6):2581-2585.
8. Tasker S. *Haemobartonella felis*. *Feline internal medicine secrets* 2001;379-383.
9. Tasker S. Current concepts in feline haemobartonellosis. *In Practice* 2006;**28**(3):136-141.
10. Westfall DS, Jensen WA, Reagan WJ, Radecki SV, Lappin MR. Inoculation of two genotypes of *Haemobartonella felis* (California and Ohio variants) to induce infection in cats and the response to treatment with azithromycin. *Am J Vet Res* 2001 May;**62**(5):687-691.
11. Berent LM, Messick JB, Cooper SK. Detection of *Haemobartonella felis* in cats with experimentally induced acute and chronic infections, using a polymerase chain reaction assay. *Am J Vet Res* 1998 October;**59**(10):1215-1220.
12. Foley JE, Harrus S, Poland A, Chomel B, Pedersen NC. Molecular, clinical, and pathologic comparison of two distinct strains of *Haemobartonella felis* in domestic cats. *Am J Vet Res* 1998 December;**59**(12):1581-1588.
13. Luria BJ, Levy JK, Lappin MR, Breitschwerdt EB, Legendre AM, Hernandez JA et al. Prevalence of infectious diseases in feral cats in Northern Florida. *J Feline Med Surg* 2004 October;**6**(5):287-296.
14. Tasker S, Binns SH, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA, Helps CR et al. Use of a PCR assay to assess the prevalence and risk factors for *Mycoplasma haemofelis* and 'Candidatus *Mycoplasma haemominutum*' in cats in the United Kingdom. *Vet Rec* 2003 February 15;**152**(7):193-198.
15. Tasker S, Braddock JA, Baral R, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ et al. Diagnosis of feline hemoplasma infection in Australian cats using a real-time PCR assay. *J Feline Med Surg* 2004 December;**6**(6):345-354.
16. Willi B, Boretti FS, Baumgartner C, Tasker S, Wenger B, Cattori V et al. Prevalence, risk factor analysis, and follow-up of infections caused by three feline hemoplasma species in cats in Switzerland. *J Clin Microbiol* 2006 March;**44**(3):961-969.



17. Lappin MR, Griffin B, Brunt J, Riley A, Burney D, Hawley J et al. Prevalence of Bartonella species, haemoplasma species, Ehrlichia species, Anaplasma phagocytophilum, and Neorickettsia risticii DNA in the blood of cats and their fleas in the United States. *J Feline Med Surg* 2006 April;**8**(2):85-90.
18. Taroura S, Shimada Y, Sakata Y, Miyama T, Hiraoka H, Watanabe M et al. Detection of DNA of 'Candidatus Mycoplasma haemominutum' and *Spiroplasma* sp. in Unfed Ticks Collected from Vegetation in Japan. *J Vet Med Sci* 2005;**67**(12):1277-1279.
19. Woods JE, Brewer MM, Hawley JR, Wisnewski N, Lappin MR. Evaluation of experimental transmission of Candidatus Mycoplasma haemominutum and Mycoplasma haemofelis by Ctenocephalides felis to cats. *Am J Vet Res* 2005 June;**66**(6):1008-1012.
20. Woods JE, Wisnewski N, Lappin MR. Attempted transmission of Candidatus Mycoplasma haemominutum and Mycoplasma haemofelis by feeding cats infected Ctenocephalides felis. *Am J Vet Res* 2006 March;**67**(3):494-497.
21. Hackett TB, Jensen WA, Lehman TL, Hohenhaus AE, Crawford PC, Giger U et al. Prevalence of DNA of Mycoplasma haemofelis, 'Candidatus Mycoplasma haemominutum,' Anaplasma phagocytophilum, and species of Bartonella, Neorickettsia, and Ehrlichia in cats used as blood donors in the United States. *J Am Vet Med Assoc* 2006 September 1;**229**(5):700-705.
22. Messick JB. New perspectives about Hemotrophic mycoplasma (formerly, Haemobartonella and Eperythrozoon species) infections in dogs and cats. *Vet Clin North Am Small Anim Pract* 2003 November;**33**(6):1453-1465.
23. Jensen WA, Lappin MR, Kamkar S, Reagan WJ. Use of a polymerase chain reaction assay to detect and differentiate two strains of Haemobartonella felis in naturally infected cats. *Am J Vet Res* 2001 April;**62**(4):604-608.
24. George JW, Rideout BA, Griffey SM, Pedersen NC. Effect of preexisting FeLV infection or FeLV and feline immunodeficiency virus coinfection on pathogenicity of the small variant of Haemobartonella felis in cats. *Am J Vet Res* 2002 August;**63**(8):1172-1178.
25. Bobade PA, Nash AS, Rogerson P. Feline haemobartonellosis: clinical, haematological and pathological studies in natural infections and the relationship to infection with feline leukaemia virus. *Vet Rec* 1988 January 9;**122**(2):32-36.
26. Harrus S, Klement E, Aroch I, Stein T, Bark H, Lavy E et al. Retrospective study of 46 cases of feline haemobartonellosis in Israel and their relationships with FeLV and FIV infections. *Vet Rec* 2002 July 20;**151**(3):82-85.
27. Grindem CB, Corbett WT, Tomkins MT. Risk factors for Haemobartonella felis infection in cats. *J Am Vet Med Assoc* 1990 January 1;**196**(1):96-99.
28. Tasker S, Caney SM, Day MJ, Dean RS, Helps CR, Knowles TG et al. Effect of chronic FIV infection, and efficacy of marbofloxacin treatment, on Mycoplasma haemofelis infection. *Vet Microbiol* 2006 October 31;**117**(2-4):169-179.

29. Braddock JA, Tasker S, Malik R. The use of real-time PCR in the diagnosis and monitoring of *Mycoplasma haemofelis* copy number in a naturally infected cat  
Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *J Feline Med Surg* 2004 June;**6**(3):161-165.
30. Tasker S, Helps CR, Day MJ, Harbour DA, Gruffydd-Jones TJ, Lappin MR. Use of a Taqman PCR to determine the response of *Mycoplasma haemofelis* infection to antibiotic treatment. *J Microbiol Methods* 2004 January;**56**(1):63-71.
31. Dowers KL, Olver C, Radecki SV, Lappin MR. Use of enrofloxacin for treatment of large-form *Haemobartonella felis* in experimentally infected cats. *J Am Vet Med Assoc* 2002 July 15;**221**(2):250-253.
32. Tasker S, Helps CR. Real-Time PCR methodology. *J.Clin.Microbiol.* 2007.  
Ref Type: Unpublished Work
33. Helps CR. Tolkning af CT enheden. 2007.  
Ref Type: Internet Communication
34. [http://vetschools.co.uk/EpiVetNet/Epidemiological\\_analysis\\_software.htm](http://vetschools.co.uk/EpiVetNet/Epidemiological_analysis_software.htm) ( Win Episcopo 2.0 ) [computer program]. 2007.
35. <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html> ( Proportions, Confidenceinterval of a proportion ) [computer program]. 2007.
36. Stege H; Microsoft Excel - 2by2.xls.( ChiSquare and McNemar) [computer program]. 2007.
37. Stege H; Microsoft Excel - 2by2.xls. (Measures of association) [computer program]. 2007.
38. <http://graphpad.com/prism/Prism.htm>. (GraphPad Prism 4) [computer program]. 2007.
39. Tasker S, Helps CR, Day MJ, Gruffydd-Jones TJ, Harbour DA. Use of real-time PCR to detect and quantify *Mycoplasma haemofelis* and "Candidatus *Mycoplasma haemominutum*" DNA. *J Clin Microbiol* 2003 January;**41**(1):439-441.
40. Lobetti RG, Tasker S. Diagnosis of feline haemoplasma infection using a real-time PCR assay. *J S Afr Vet Assoc* 2004 June;**75**(2):94-99.
41. Willi B, Tasker S, Re, Doherr MG, Cattori V, Meli ML et al. Phylogenetic analysis of "Candidatus *Mycoplasma turicensis*" isolates from pet cats in the United Kingdom, Australia, and South Africa, with analysis of risk factors for infection. *J Clin Microbiol* 2006 December;**44**(12):4430-4435.