

# Genetisk fingerprintning af *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isoleret fra hoppers kønsorganer ved brug af Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE)

MARIA MATHILDE HAUGAARD<sup>1</sup> • MORTEN RØNN PETERSEN<sup>2</sup> • ANDERS MIKI BOJESEN<sup>3</sup>

<sup>1</sup>DYRLÆGE, RÆVEHOLMSVEJ 43, 2690 KARLSLUNDE

<sup>2</sup>DYRLÆGE, PH.D., DACT, ADJUNKT, VETERINÆR REPRODUKTION OG OBSTETRIK, INSTITUT FOR PRODUKTIONSDYR OG HESTE, KU LIFE, DYRLÆGEVEJ 68, 1870 FREDERIKSBERG C

<sup>3</sup>DYRLÆGE, PH.D., LEKTOR, MIKROBIOLOGI, INSTITUT FOR VETERINÆR SYGDOMSBIOLOGI, KU LIFE, STIGBØJLEN 4, 1870 FREDERIKSBERG C.

## Introduktion

Sub- og infertilitet som følge af bakteriell infektion i endometriet er et velkendt problem i arbejdet med reproduktion hos heste og medfører store tab i hesteavlen (1,2,3). Viden om patogenesen ved bakteriell endometritis er fortsat mangelfuld trods en langvarig forskningsindsats på området. En række mikroorganismer kan isoleres fra uterine svabre og biopsier, men

ganske få anses for betydelige patogener. En af de vigtigste patogener er den betahæmolytiske *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* (*S. zooepidemicus*) (4,1). Sammen med *Escherichia coli* udgør disse to bakteriearter  $\geq 80\%$  af de isolerede patogener fra endometriet (4). *S. zooepidemicus* er en del af den naturlige bakterieflora i de øvre luftveje og nedre reproduktionsveje hos flere dyrearter, heriblandt

heste. *S. zooepidemicus* er ligeledes en opportunistisk patogen, der under særlige forhold forårsager infektion, blandt andet i uterus (5).

Formålet med nærværende undersøgelse er at belyse den genetiske diversitet af *S. zooepidemicus* isoleret fra endometriet, vagina og fossa clitoridis hos en gruppe individuelle hopper ved hjælp af typningsmetoden Pulsed Field Gel Electrophoresis.

## Sammendrag

I studiet blev fossa clitoridis, vagina og endometriet undersøgt bakteriologisk på 29 hopper med henblik på at karakterisere den genetiske diversitet af *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*. Op til tre isolater af *S. zooepidemicus* fra hver lokalisation blev efterfølgende karakteriseret med den molekylære typningsmetode Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Af de i alt 88 undersøgte isolater, blev der identificeret 44 forskellige PFGE profiler, hvilket overordnet indikerede en høj genetisk diversitet blandt *S. zooepidemicus*, isoleret fra

hoppers kønsorganer. Ved karakterisering og evaluering af isolaterne fra endometriet fandtes en høj genetisk diversitet, når isolater fra forskellige hopper sammenlignedes, hvorimod endometriisolaterne fra samme hoppe var identiske. Isolaterne fra hhv. fossa clitoridis og vagina fandtes genetisk forskellige fra stammer isoleret fra endometriet, mens der hos 75 % af hopperne med isolater fra både klitoris og vagina kunne genfindes samme klon fra begge anatomiske lokalisationer. Til trods for den overordnede store gene-

tiske diversitet af *S. zooepidemicus* fra hoppers kønsorganer ser det således ud til, at isolater, der er isoleret i forbindelse med endometritis, udgør en selvstændig gruppe, der tilsyneladende er forskellig fra *S. zooepidemicus* isolater fra de mere distale dele af kønsorganerne. Dette kunne indikere, at endometritisisolater besidder specifikke egenskaber, som adskiller dem fra isolater fra hhv. vagina og klitoris, og at det normalt ikke er isolater fra de nedre kønsorganer, der er årsag til endometritis.

## Velkendt typningsmetode

Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) er en hyppigt anvendt molekylær typningsmetode, der muliggør bestemmelse af slægtskabet mellem forskellige bakterieisolater inden for den samme art. Typningsmetoden kan således afgøre, om forskellige isolater er identiske, også kaldet klonale, eller må betragtes som to forskellige stammer inden for samme art.

Måden PFGE virker på er at sammenligne DNA fragmenter, der er fremkommet efter skæring af bakteriens kromosomale DNA med restriktionsenzymmer. Grundtanken bag denne sammenligning er, at hvis to isolater af en bakterie er klonale, vil DNA'et klippes identiske steder, og afstanden mellem hvert klip vil være ens. Efter skæring af DNA'et med restriktionsenzymet adskilles DNA fragmenterne ved at køre DNA'et gennem en agarosegel, hvorved DNA fragmenter vandrer med forskellig hastighed afhængig af størrelse. Efter farvning af gelen kan de forskellige DNA fragmenter visualiseres og sammenlignes ved hjælp af computerprogrammer.

PFGE adskiller sig fra klassisk gelelektroforese ved at strømmen, som ledes gennem gelen, kommer fra skiftende retninger. Når strømmens retning ændres i forudbestemte intervaller, vil mindre DNA fragmenter hurtigere være i stand til at ændre deres vandringsmønster end større fragmenter, og derved fremkommer en mere tydelig adskillelse af DNA-

båndene. Det er især blandt fragmenter med mange basepar (store fragmenter), at PFGE har sin styrke sammenlignet med klassisk gelelektroforese.

For at kunne udsætte det kromosomale DNA for restriktionsenzymerne, skal DNA'et isoleres fra de enkelte bakterieceller. Dette opnås ved at inkorporere hvert enkelt bakterieisolat i en agaroseblok, som herefter inkuberes i væske indeholdende et enzym, der forårsager cellelysis. Efter flere omganges vask af DNA'et tilsættes restriktionsenzym, og agaroseblokkene indeholdende det klippede DNA er nu klar til at blive karakteriseret ved PFGE.

## Materialer og metode

I alt 88 isolater af *S. zooepidemicus* fra 29 forskellige hopper, er inkluderet i undersøgelsen. I studiet er der ikke lagt vægt på hoppers race eller alder, sidstnævnte varierer fra 3-21 år. Størstedelen af de undersøgte hopper (18/29) havde på prøvetidspunktet kliniske symptomer på endometritis, inklusiv fri væske i uterus og/eller patologisk flåd fra vulva. Et mindre antal hopper uden indikation på sygdom i endometriet er ligeledes inkluderet i studiet. Hopper i såvel østrus som diøstrus er repræsenteret. Indsamling af isolater er foretaget i perioden april til juli 2007.

## Prøveudtagning

Der indgik tre prøveudtagninger fra hver hoppe: En fra fossa clitoridis, en fra va-

gina og en fra endometriet. Inden vask af perinealområdet blev der udtaget en svaberprøve fra fossa clitoridis ved at den ventrale del af labia vulva blev separeret og klitoris eksponeret. Prøven blev udtaget uden berøring af labia vulva. Der blev anvendt en udækket svaber BBL™CultureSwab™ (In Vitro Diagnostics®). Hvis fossa clitoridis var tør ved prøvetagningen, blev svaberen fugtet med enten sterilt saltvand eller transportmedie inden prøveudtagning. Efter udtagning af klitorisprøven blev svaberen placeret i transportmedie.

De eksterne genitalier og perinealområdet blev herefter vasket i varmt vand og aftørret med papir, inden prøver fra hhv. den craniale del af vagina og endometriet blev udtaget. Svaberprøven fra vagina blev udtaget med en dækket svaber (Equi-Vet®; Kruse). Den dækkede svaber førtes til bunden af vagina, hvor selve svaberdelen blev skubbet frem, hvorved svaberen kom i kontakt med vaginalslimhinden. Svaberen blev roteret og holdt i kontakt med slimhinden i minimum 30 sekunder. Svaberen med prøvematerialet blev herefter trukket tilbage i sit hylster, inden den samlede dækkede svaber blev ført tilbage gennem vagina. På denne måde minimeredes risikoen for kontaminering.

En uterusbiopsi blev udtaget fra endometriet. Til denne procedure blev anvendt udstyr og metode som beskrevet af Nielsen (2005), hvor anvendelse af sterilt stålspekulum og udtagning af

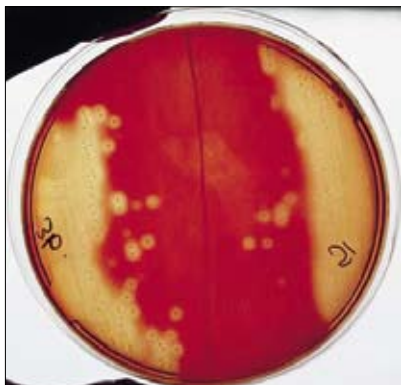


## Summary

In the current investigation, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolates were obtained from the fossa clitoridis, vagina and the endometrium of 29 mares with the aim of characterizing the genetic diversity by Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE). Up to three isolates per localization were obtained from each mare. From a total of 88 isolates, 44 different PFGE profiles were outlined and thus revealed a high overall genetic diversity. However, when comparing endometrial isolates from individual mares the genetic diversity was extreme-

ly limited meaning that only one clone was involved in the endometritis of each mare. Furthermore, when comparing all *S. equi* subsp. *zooepidemicus* isolates from endometritis with isolates from the lower reproductive tract isolates, the endometritis isolates formed a distinct group only distantly related to isolates from the fossa clitoridis and the vagina. Identical clones originating from the vagina and the fossa clitoridis in 75 % of mares suggested a high level of exchange of bacteria between these two localities. In conclusion, no specific

strain of *S. zooepidemicus* cause bacterial endometritis in the mare. However, isolates from endometritis appeared to belong to a distinct group only distantly related to the normal flora of the lower reproductive tract. Consequently, endometrial isolates are likely to possess specific traits enabling them of causing endometritis that may not be common to *S. zooepidemicus* from the normal flora of lower reproductive tract.



Kolonier af *Strep. equi subsp. zooepidemicus*.

biopsien uden samtidig rektalpalpation markant minimerer risiko for kontaminering af prøven.

#### Mikrobiologi

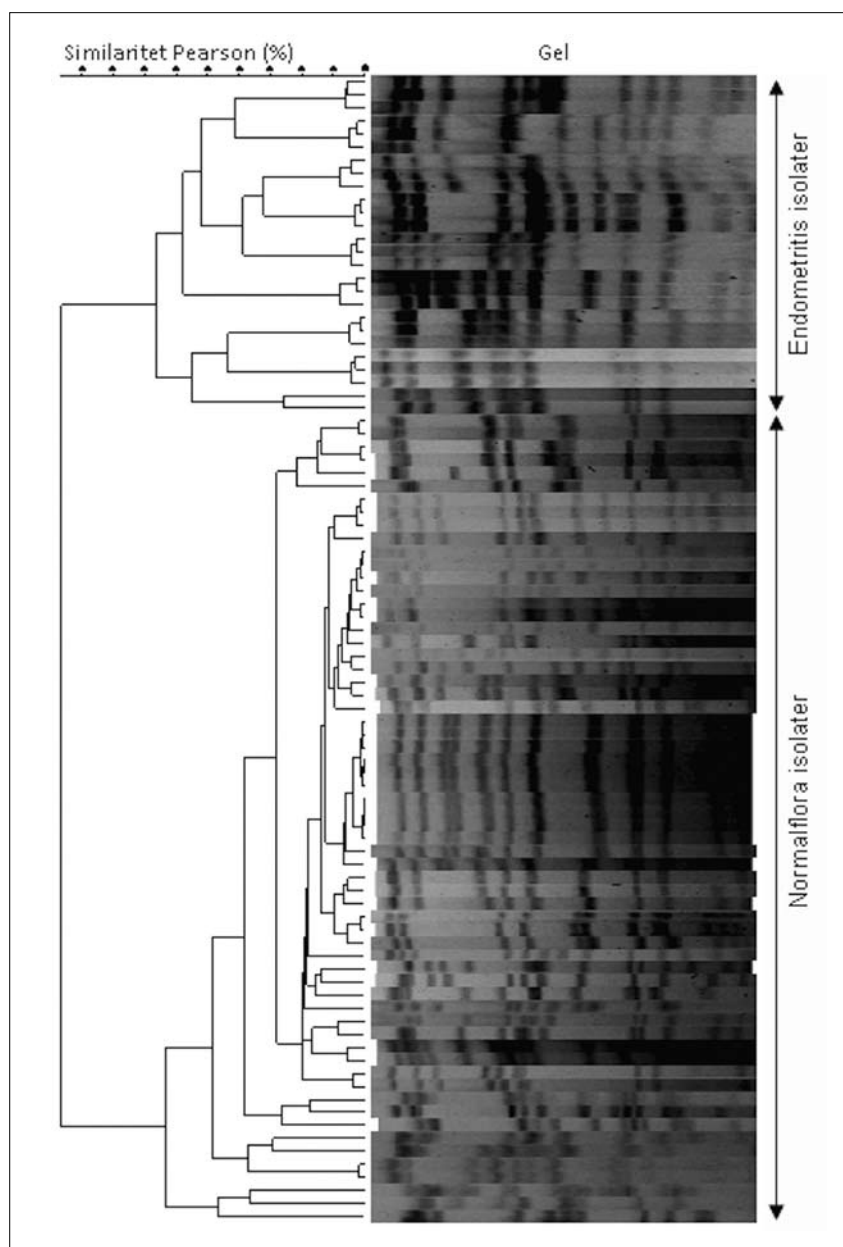
Alt prøvemateriale blev udstrøget på blodagarplader (5 % kalveblod) inden for 8 timer efter indsamling. Vækst blev evalueret efter 24 timers inkubation ved 37°C. Fra vaginal- og endometrieprovér blev udelukkende vækst i renkultur anset som positiv vækst, og i dette studie blev renkultur defineret ved at  $\geq 90$  % af kolonierne på pladen var af samme art.

Klitorisprøverne viste hyppigst vækst i blandingskultur, hvilket var forventet på grund af eksponering overfor hestens ydre omgivelser, fæces mv. Kolonier med hæmolyse og morfologi som *S. zooepidemicus* blev isoleret og karakteriseret yderligere.

Fra alle plader, uanset prøvelokalisation, med positiv vækst af *S. zooepidemicus*, isoleredes om muligt tre individuelle kolonier, som blev subkultiveret på en ny blodagarplade for at etablere monokultur af hvert enkelt isolat. Alle isolater blev identificeret som *S. zooepidemicus* ud fra kolonimorfologi, mikroskopi, negativ kaliumhydroxidtest samt evnen til at fermentere lactose, sorbitol og ribose, men ikke trehalose. Ethvert isolat af *S. zooepidemicus* blev herefter inkuberet i BHI bouillon i 24 timer ved 37°C, før de opbevares nedfrosset ved -80°C. Fryseblandingen består af 300  $\mu$ l 50 % glycerol og 700  $\mu$ l BHI-overnatskultur.

#### Molekylær typning

Alle isolater er karakteriseret ved PFGE som beskrevet i tidligere afsnit. Hvert isolat indstøbes i agaroseblokke (Certified™ Megabase Agarose, Biorad Laboratories), og blokkene inkuberes natten over med lysisbuffer og mutanolysin (Sigma-Aldrich®) ved 37°C for at opnå lysis af bakteriecellerne. Efter vask af blokkene i TE-buffer, tilsættes ES-buffer



Figur 1. Dendrogram indeholdende 88 *S. zooepidemicus* isolater isoleret fra kønsorganerne hos 29 individuelle hopper samt visning af tilhørende geler. Isolaterne falder i to hovedgrupper bestående af hhv. isolater fra uterus og isolater fra de nedre kønsveje. Isolater anses for klonale, når antallet af bånd samt disses størrelse er ens eller kun afviger med et enkelt bånd.

Når antallet af bånd eller disses størrelse afviger med 2-3 bånd mellem isolater anses disse for tæt relaterede kloner. Når dette antal af afvigende bånd stiger til 4-6 bånd, er isolaterne sandsynligvis relaterede, mens afvigelser på 7 eller flere bånd betyder, at isolaterne ikke er relaterede til hinanden (14).

	Klitoris	Vagina	Uterus
Simpsons index (D)	0,045	0,065	0,058

Tabel 1. Værdi af Simpsons indeks for hver af de tre anatomiske isolationssteder. 0 = ultimativ høj diversitet. 1 = komplet klonalitet. Den anvendte formel er:  $D = \sum n(n-1) / N(N-1)$ .

	Klitoris	Vagina	Uterus
<i>S. zooepidemicus</i>	(6/9) 67 %	(4/8) 50 %	(0/11) 0 %

Tabel 2. Andelen af hopper hvorfra der kunne isoleres mere end én klon fra de respektive anatomiske lokalisationer, når mere end ét isolat blev karakteriseret per hoppe pr. isolationssted.

og proteinase K (Roche Diagnostics), og blokkene inkuberes natten over ved 56°C. Tilsætning af proteinase K sikrer nedbrydning af protein og derved proteinkontaminering i prøven. Blokkene vaskes i TE-buffer og skæres herefter i stykker på 1-3 mm. Disse stykker lægges i bufferblanding i to gange en halv time, før de tilsættes restriktionsenzymblandingen. Det anvendte restriktionsenzym er *SmaI* (New England Biolabs). Stykkerne i enzymløsningen inkuberes natten over ved 25°C, hvorefter de vaskes i TE-buffer og loades i agarosegel (Seakem®GTC® Agarose, Lonza). Kørslen foregår over 20 timer ved 5,6 volt pr. cm. Anvendt buffer under kørslen er en 0,5 x TB opløsning.

Resultater er analyseret ved hjælp af programmet Gelcompar (Applied Maths, Belgien). Gelen er normaliseret ved anvendelse af markøren Midrange II PFG Markers (New England Biolabs). Alle bånd er manuelt udvalgte. Bestemmelse af klonalitetsgraden er kalkuleret ved hjælp af Pearson-koefficienten, og til klusteranalyse er anvendt Unweighted Pair group Method using Arithmetic averages (UPGMA).

## Resultater

I alt 88 isolater af *S. zooepidemicus* fra 29 forskellige hopper blev karakteriserede i dette studie. 31 isolater blev isolerede fra endometriet, mens hhv. 26 isolater stammede fra vagina og 31 isolater fra fossa clitoridis. Blot et isolat (1/89) kunne ikke karakteriseres med den anvendte PFGE-procedure, og det konkluderes, at den anvendte procedure har en høj tybbarhed til genotypning af *S. zooepidemicus* isoleret fra hoppens kønsorganer.

Når samtlige isolater sammenlignes ses en høj overordnet genetisk diversitet (Figur 1). Ved visuel vurdering og

anvendelse af Gelcompar er der i alt fundet 44 forskellige PFGE-profiler. Den visuelle vurdering har i enkelte tilfælde vægtet mere end sammenligningen i Gelcompar, idet de 88 isolater er kørt på fem forskellige geler. En svaghed ved PFGE er, at det kan være vanskeligt at sammenligne mellem geler, idet der ikke anvendes markør i alle baner, og normalisering mellem forskellige geler derfor kan være umulig.

Når de tre isolationssteder analyseres hver for sig findes en høj genetisk diversitet mellem hopperne. Dette kan matematisk vises ved at udregne Simpsons indeks (D) for hvert isolationssted (tabel 1). Resultatet af dette indeks ligger mellem 0 og 1, hvor 0 er lig med ultimativ høj genetisk diversitet, mens 1 er lig med komplet klonalitet. Af tabel 1 ses, at alle tre beregnede indeks ligger relativt tæt på 0, hvilket betyder, at den genetiske diversitet er høj imellem hopper, når isolater sammenlignes inden for klitoris-, indenfor vagina- og inden for uterusisolater (tabel 1).

12 hopper blev diagnosticeret med infektiøs endometritis forårsaget af *S. zooepidemicus*. Heraf blev der isoleret og karakteriseret mere end et isolat fra 92 % (11/12 hopper). Ved sammenligning af uterusisolaterne mellem forskellige hopper ses der også en høj genetisk diversitet, men når uterusisolaterne sammenlignes inden for den enkelte hoppe findes stammerne at være klonale hos samtlige hopper (11/11 = 100 %). (Figur 1). Det er for en enkelt hoppe i studiet (022H) lykkedes at isolere *S. zooepidemicus* fra alle tre anatomiske lokalisationer. Her findes isolaterne fra hhv. klitoris og vagina at være klonale, mens disse er genetisk forskellige fra den klon, der isoleres fra endometriet (Figur 1).

Hos tre hopper (035B, 030B, 001G)

er bakterien isoleret fra såvel vagina som uterus. Hos alle tre hopper findes vaginalstammerne at være genetisk forskellige fra stammer isoleret fra endometriet.

Hos fire hopper (010B, 018B, 019B, 019H) blev *S. zooepidemicus* isolater fra klitoris og vagina, men ikke uterus karakteriseret, hvor det ved tre ud af fire var muligt at isolere den samme klon fra begge anatomiske lokalisationer.

Der ses en stigende grad af genetisk diversitet, jo længere caudalt i kønsorganerne prøven udtages. Alle undersøgte hopper havde kun en klon repræsenteret i endometriet, mens 50 % (4/8) af hopperne, hvorfra der kunne isoleres mere end et isolat af *S. zooepidemicus* fra vagina, havde mere end en klon repræsenteret. Klitorisisolaterne viste, at 67 % (6/9) havde mere end en klon repræsenteret (tabel 2).

## Diskussion

Det kan på baggrund af resultaterne i nærværende studie konkluderes, at diversiteten blandt de karakteriserede *S. zooepidemicus* er høj, når der sammenlignes mellem hopper. Der findes altså forskellige kloner hos forskellige hopper. Dette stemmer overens med resultater i andre studier (6,7,8), og kan forklares ved, at den undersøgte bakterie er vidt udbredt i hestens nærmiljø og er naturligt forekommende i de øvre luftveje og nedre reproduktionsorganer (5,9). Bakterien har en evne til konstant at tilpasse sig og kan forårsage infektion adskillige steder i en organisme, samt inficere flere forskellige værtsarter, heriblandt heste og mennesker, hvilket ydermere gør det vanskeligt at producere brugbare vacciner (5,10).

Resultaterne i nærværende studie indikerer ligeledes, at uterusisolater fra samme hoppe er klonale, hvilket stem-

mer overens med resultater fundet af Kuroiwa *et al.* (2006), men er modstridende med resultater fundet af Bindslev *et al.* (2008) og Luque *et al.* (2006). I nærværende studie adskiller uterusisolaterne sig genetisk fra stammer, som er isolerede andre steder i kønsorganerne. Dette indikerer, at det er afgørende for kvaliteten af en endometriebiopsi eller -svaber, at prøven udtages sterilt uden kontaminering fra de distale dele af kønsorganerne, idet der herved højst sandsynligt isoleres en anden klon end den som forårsager infektion i endometriet. Hvor betydningsfuldt dette er rent behandlingsmæssigt, må afgøres ved resistensundersøgelse af de enkelte kloner. Dette fund stiller spørgsmålstejn ved den udbredte opfattelse af, at infektion i uterus skyldes en ascenderende infektion. Der kan spekuleres i, hvorvidt en infektion i uterus kan opstå på anden vis end ved en ascenderende infektion – fx ved en hæmatogen spredning fra andre lokalisationer, som eksempelvis luftvejene. Kuroiwa *et al.* (2006) finder at 41 % af analyserede SzP-genotyper af *S. zooepidemicus* isoleret fra endometriet kan genfindes i luftvejene hos heste (8). Fortsat forskning i patogenesen for bakteriel endometritis er derfor nødvendig for at afklare dette forhold. Hopper med endometritis udviser ikke symptomer på septikæmi, hvilket indikerer, at det højst sandsynligt er tilstedeværelsen

af bestemte virulensfaktorer, som gør de enkelte kloner i stand til at inficere såvel endometriet som luftvejene hos heste. Det skal ligeledes bemærkes, at det ikke kan udelukkes, at identiske kloner findes i vagina og på klitoris hos hopper med endometritis, trods resultaterne i dette studie, men at de blot ikke har været blandt de tre kolonier, som er tilfældigt udvalgte fra hver plade med positiv vækst af *S. zooepidemicus*.

På baggrund af disse observationer vil en fortsat genotypisk og molekylærbiologisk karakterisering af uterusisolater og deres virulensfaktorer være indiceret. Af figur 1 ses det, at 24/31 uterusisolater danner en klynge, hvilket indikerer, at de i denne gruppe er indbyrdes tættere genetisk relaterede, end de er til de resterende isolater præsenteret i figuren. Dette til trods for, at isolaterne er isoleret fra individuelle hopper uden epidemiologisk relation. Disse observationer kunne indikere, at uteruskloner er i besiddelse af bestemte egenskaber, der gør dem i stand til at etablere en infektion i endometriet, men at det ikke er en specifik klon, som alene er ansvarlig for infektioner i uterus blandt forskellige hopper. Fx finder Kuroiwa *et al.* (2006) 16 forskellige SzP-profiler ved PCR-RFLP analyse af 55 isolater af *S. zooepidemicus*, isoleret fra cervix hos hopper med metritis. Dette indikerer, at SzP-proteinets »udseende« ikke er afgørende for patogenesen, men

SzP-proteinets anses fortsat som en afgørende virulensfaktor (8,11). Andre studier finder ligeledes ingen sammenhæng mellem SzP-proteinets sammensætning og bestemte lidelser hos heste (12). Relationen mellem genotype og bakteriens evne til at etablere infektion i endometriet er endnu uafklaret, og videre forskning på området er nødvendig for at afgøre, om der er en sammenhæng.

Dette studie indikerer, at de distale afsnit af kønsorganerne hos hopper huser *S. zooepidemicus* med en højere genetisk diversitet end i uterus, hvilket stemmer overens med resultater fundet af Bindslev *et al.* (2008). At diversiteten på klitoris er størst, kan forklares med dennes umiddelbare eksponering for hoppens fæces og omgivelser. Vulva og den vaginostibulære sphincter beskytter vagina mod kontaminering (9), mens den anatomiske barriere mellem vagina og uterus er cervix. Da identiske kloner kan genfindes på klitoris og i vagina, men ikke i uterus, indikerer resultaterne, at cervix er den vigtigste anatomiske barriere for beskyttelse mod ascenderende infektion. Dette er i modstrid med konklusioner af Hinrichs *et al.* (1988), der konkluderer, at den vaginostibulære sphincter er af størst betydning, idet de ikke er i stand til at isolere opportunistiske patogener fra vagina og uterus hos raske hopper. Forskellen mellem nærværende studie og resultaterne fundet af Hinrichs *et al.*

#### Referencer

(1) Albihn, A., Baverud, V., Magnusson, U. (2003). Uterine microbiology and antimicrobial susceptibility in isolated bacteria from mares with fertility problems. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 44(3/4): 121-129.  
 (2) Dimock, W. V. & Edwards, P. R. (1928). Pathology and bacteriology of the reproductive organs of mares in relation to sterility. *Research Bulletin of the Kentucky Agricultural Experimental Station*. 286: 157-235.  
 (3) Bain, A. M. (1966). The role of infection in infertility in the thoroughbred mare. *The veterinary record*. 78(5): 168-173.  
 (4) Nielsen, J.M. (2005). Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. *Theriogenology*. 64(3): 510-518.

(5) Timoney, J. F. (2004). The pathogenic quine streptococci. *Vet. Res.* 35: 397-409.  
 (6) Bindslev, M.M., Villumsen, M. H., Petersen, M.R., Nielsen, J.M., Bøgh, I.B., Bøjesen, A.M. (2008): Genetic diversity of *S. equi* subsp. *zooepidemicus* and *E. coli* isolated from the reproductive tract of the mare [Conference proceeding]. ICAR, June, Budapest, Hungary.  
 (7) Luque, I., Fernandez-Garayzabal, J. F., Blume, V., Maldonado, A., Astorga, R., Tarradas, C. (2006). Molecular typing and antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Streptococcus equi* ssp. *Zooepidemicus* from equine bacterial endometritis. *J. Vet. Med.* 53: 451-454.  
 (8) Kuroiwa, Y., Anzai, T., Higuchi, T., Sawada, T. (2006). A PCR-RFLP analyses of the SZP gene in *Streptococcus Zooepide-*

*micus* isolates from mares with metritis in Japan. *Journal Equine science*. 17(4): 97-100.  
 (9) Hinrichs, K., Cummings, M. R., Ser-tich, P. L., Kenney, R. M. (1988). Clinical significance of aerobic bacterial flora of the uterus, vagina, vestibule and clitoral fossa of clinically normal mares. *Journal of the American veterinary medical association*. 193(1): 72-75.  
 (10) Waller, A. S. (2010). Protecting against *Streptococcus zooepidemicus* opportunism: The challenge of vaccine design. Guest editorial. *The veterinary journal* 184: 128-129.  
 (11) Wittenbrink, M. M., Hoelzle, K., Hoelzle, L. E. (2008). What's new in bacteriology of the mare's genital tract. *Pferdeheilkunde* 24. 1 (January/February): 53-55.

(1988) kan muligvis forklares ved, at studiet af Hinrichs *et al.* (1988) udelukkende er baseret på raske hopper uden kliniske symptomer eller anamnese om reproduktionsproblemer, mens nærværende studie hovedsagelig er baseret på hopper med symptomer på endometritis og/eller lav drægtighedsprocent. Disse iagttagelser henleder opmærksomheden på, at etablering af infektion i uterus sandsynligvis er et samspil mellem bakterielle faktorer og hoppens anatomiske og immunologiske status.

### Konklusion

Blandt isolater af *S. zooepidemicus*, isoleret fra hoppens kønsorganer, findes en høj genetisk diversitet, når disse sammenlignes mellem forskellige hopper. Derimod findes uterusisolater at være klonale inden for hver enkelt hoppe. Dette afkræfter hypotesen om, at én bestemt klon af *S. zooepidemicus* er ansvarlig for infektion i endometriet, men det tyder på, at de kloner, som forårsager infektion, har bestemte egenskaber, der adskiller dem fra isolater fra hhv. vagina og klitoris. Flere studier, som omhandler diversitet, identifikation af virulensfaktorer samt faktorer som påvirker hoppens modtagelighed for infektion, er nødvendige før patogenesen for endometritis, forårsaget af *S. zooepidemicus*, kan endelig forklares. ■

(12) Walker, R. L. & Runyan, C. A. (2003). Identification of variations in SzP proteins of *Streptococcus equi* subspecies *zooepidemicus* and the relationship between protein variants and clinical signs of infection in horses. *AJVR*, vol 64, No. 8, August 2003.

(13) Blobel, H., Wleklinski, C. G., Blobel, K. (1980). Detection of beta-haemolytic streptococci in cervix and clitoris swab samples from mares. *Tierärztliche Umschau*. 35(12): 826-828, 830.

(14) Tenover, F. C., Arbeit, R. D., Goering, R. V. (1995). Interpreting chromosomal DNA restriction patterns produced by Pulsed-Field gel electrophoresis: Criteria for bacterial strain typing. *J. Clin. Microbiol.* 33(9): 2233-2239.